

# **Wechselwirkung der Transmembrandomäne des PDGF-Rezeptors $\beta$ mit dem Onkoprotein E5**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Diplom-Biologe Colin Ziegler**

aus

**Walzbachtal**

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Wenzel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2012 bis Juni 2015 am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die bereits angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Karlsruhe, den 01.08.2015

## Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Frau Prof. Anne S. Ulrich und Frau Dr. Birgit Langer für die herzliche Aufnahme im Arbeitskreis bedanken und für die Zustimmung, mit einer interessanten Themenstellung meine Doktorarbeit absolviert haben zu dürfen.

Meinem Betreuer Dr. Dirk S. Windisch danke ich für die Hilfe bei den NMR-Experimenten und für alles andere, was er in dieser Zeit für mich getan hat und für die Unterstützung in allen Dingen, die ich von ihm bekommen habe.

Dr. Johannes Reichert danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der FRET-Experimente und den vielen Ideen, mit denen er mir geholfen hat.

Für die gute Zusammenarbeit bei den fluoreszenzspektroskopischen Experimenten danke ich Prof. G. Ulrich Nienhaus, Florian Stockmar, René Dörlich und Benedikt Prunsche. René danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft und Florian danke ich für die gemeinsame Messzeit am Spinning-Disk Konfokalmikroskop.

Bei Dr. Parvesh Wadhvani und dem gesamten PepSy-Labor mit Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck bedanke ich mich für die Herstellung einiger Proteine.

Bei Dr. Sergii Afonin möchte ich mich herzlich für die MALDI-TOF-Messungen bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums und bei der Doktorarbeit.

Besonderer Dank gilt auch meiner Lebensgefährtin Irina, die ihr Möglichstes getan hat, um mich in dieser Zeit zu unterstützen.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Zuletzt danke ich allen, die ich vergessen habe aufzuzählen und die mich in dieser Zeit unterstützt haben!

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biologischer Hintergrund .....	1
1.1.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen .....	1
1.1.2 Der PDGF-Rezeptor.....	4
1.1.3 Die Aktivierung des PDGF-Rezeptors $\beta$ durch das Onkoprotein E5 .....	8
1.2 Strukturuntersuchung von $\alpha$ -helikalen Membranproteinen.....	10
1.2.1 Struktur und Eigenschaften von Membranproteinen.....	12
1.2.2 Interaktionsmotive von Membranproteinen.....	13
1.2.3 Modellmembransysteme .....	18
1.3 Theoretische Grundlagen .....	22
1.3.1 NMR – Kernmagnetresonanz-Spektroskopie .....	22
1.3.2 FRET – Förster-Resonanz-Energie-Transfer.....	26
1.3.3 FCS – Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie .....	32
<b>2 Aufgabenstellung .....</b>	<b>41</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>42</b>
3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	42
3.1.1 Arbeiten unter sterilen Bedingungen .....	42
3.1.2 Herstellen eines Cryostocks.....	42
3.1.3 Ansetzen einer Übernachtskultur für die Expression .....	42
3.1.4 Expression von unmarkierten Proteinen.....	42
3.1.5 Expression von $^{15}\text{N}$ Markierten Proteinen.....	43
3.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden.....	43
3.2.1 Zellaufschluss und Isolierung der Inclusion Bodies (IB).....	43
3.2.2 Proteolytischer Verdau des Fusionsproteins mittels Hydroxylamin.....	43
3.2.3 Kovalente Kopplung von Farbstoffen.....	44
3.2.4 Proteinaufreinigung mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	45

---

3.3	Analytische Arbeitsmethoden .....	47
3.3.1	MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	47
3.3.2	Festkörper-NMR Spektroskopie .....	48
3.3.3	Fluoreszenz-Mikroskopie .....	50
3.3.4	FRET – Förster-Resonanz-Energie-Transfer.....	52
3.3.5	FCS – Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie .....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
4.1	Rekonstitutionsverhalten und Tiltwinkelbestimmung in orientierten Modellmembranen mittels Festkörper-NMR .....	56
4.1.1	Bestimmung der Orientierung von E5 mittels <sup>15</sup> N-NMR 1D-Experimenten.....	58
4.1.2	Bestimmung der Orientierung von PDGFRβ-TMD mittels <sup>15</sup> N-NMR 1D- Experimenten.....	60
4.1.3	Tiltwinkelbestimmung von PDGFRβ-TMD mittels <sup>15</sup> N-NMR 2D-SAMMY Experimenten.....	64
4.2	Lokalisation der Proteine in zweiphasigen Riesen-Vesikeln .....	67
4.3	Bestimmung der Stöchiometrie durch FRET .....	72
4.4	Interaktion von PDGF-Rezeptor β-TMD und E5 .....	76
4.4.1	<sup>15</sup> N-NMR 1D-Interaktionsexperimente .....	76
4.4.2	Lokalisation des Komplexes PDGFR/E5 in Riesen-Vesikeln .....	79
4.4.3	Korrelation der Diffusion von TMDn in Lipidmembranen.....	81
4.4.4	Interaktionsanalyse der Proteine mittels FRET.....	86
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>118</b>
9.1	Materialien und Geräte.....	118
9.2	Chemikalien .....	120
9.3	Verbrauchsmaterialien .....	121
9.4	Detergenzien und Lipide .....	121
9.5	Bakterienstämme und Vektoren .....	121

---

9.6	Puffer und Lösungen.....	122
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>125</b>
10.1	$^{13}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD.....	125
10.2	$^{13}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren von $\Delta\text{E5}$ .....	126
10.3	$^{13}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren der Interaktionsexperimente .....	127
10.4	Simulationen der NMR-Spektren zur Tiltwinkelbestimmung .....	128
	<b>Publikationen .....</b>	<b>133</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der RTKn aus dem Menschen.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Aminosäuresequenz von PDGFR $\beta$ -TMD. ....	5
<b>Abbildung 3:</b> PDGFR $\beta$ -TMD in Mizellen aus der Flüssigkeits-NMR-Strukturanalyse. ....	5
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Signalkaskaden des PDGF-Rezeptors $\beta$ .....	7
<b>Abbildung 5:</b> Aminosäuresequenz von E5. ....	9
<b>Abbildung 6:</b> Hypothetischer Komplex von E5 und PDGF-Rezeptor $\beta$ . ....	10
<b>Abbildung 7:</b> Rechts- und linksgängige Interaktionsmotive zweier $\alpha$ -Helices .....	14
<b>Abbildung 8:</b> Dimerisierung der TMDn von GpA (A) und ErbB4 (B). ....	15
<b>Abbildung 9:</b> Dimerisierung der TMDn zweier EphA2 Rezeptormoleküle.....	16
<b>Abbildung 10:</b> Hypothetisches Interaktionsmodell zweier TMDn .....	17
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung zweier Modellmembransysteme.....	19
<b>Abbildung 12:</b> Multilamellare Vesikel (MLV).....	20
<b>Abbildung 13:</b> Betrachtung der GUV unter dem Fluoreszenzmikroskop.....	21
<b>Abbildung 14:</b> Orientierte Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen.....	21
<b>Abbildung 15:</b> Mechanisch orientierte Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen.....	23
<b>Abbildung 16:</b> Erklärung eines Pulverspektrums von $^{15}\text{N}$ -vollmarkierten Proteinen.....	24
<b>Abbildung 17:</b> Orientierung der Tensoren .....	24
<b>Abbildung 18:</b> Formen der Signale im 2D-Spektrum in Abhängigkeit des Helix-Tiltwinkels.	25
<b>Abbildung 19:</b> Schematische Darstellung der Absorptions- und Emissionsspektren .....	26
<b>Abbildung 20:</b> Abhängigkeit des Abstands $R$ der Fluorophore von der FRET-Effizienz. ....	27
<b>Abbildung 21:</b> Donor-Quenching.....	29
<b>Abbildung 22:</b> Donor-Quenching in Abhängigkeit des Molenbruchs $x_A$ . ....	31
<b>Abbildung 23:</b> Erzeugung der Intensitätsfluktuationsfunktion. ....	32
<b>Abbildung 24:</b> Berechnung der Autokorrelationsfunktion. ....	33
<b>Abbildung 25:</b> Einfluss der Parameter auf die Form der Autokorrelationsfunktion.....	34
<b>Abbildung 26:</b> Prinzip der Zwei-Fokus-FCS. ....	35
<b>Abbildung 27:</b> Prinzip der Zwei-Farben-FCS Methode.....	36

---

<b>Abbildung 28:</b> Prinzip der Linien-Raster-FCS. ....	38
<b>Abbildung 29:</b> Ermittlung der Intensitätsfluktuationsfunktion $I(t)$ . ....	38
<b>Abbildung 30:</b> Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins. ....	44
<b>Abbildung 31:</b> Aminosäuresequenz von E5 Wt und $\Delta E5$ . ....	48
<b>Abbildung 32:</b> Herstellung von Riesen-Vesikeln (GUV). ....	51
<b>Abbildung 33:</b> Absorptions- und Emissionsspektrum von Dansyl. ....	52
<b>Abbildung 34:</b> Schema der zeitlichen Signaldetektion der 2c2f IsFCS. ....	54
<b>Abbildung 35:</b> Übersicht und Gliederung der Fragestellungen. ....	56
<b>Abbildung 36:</b> $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von $\Delta E5$ in verschiedenen Membransystemen. ....	59
<b>Abbildung 37:</b> $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in verschiedenen Membranen. ...	61
<b>Abbildung 38:</b> $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in „Raft-ähnlichen“ Membranen. ...	62
<b>Abbildung 39:</b> 2D-Sammy Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in dicken Membranen. ....	65
<b>Abbildung 40:</b> 2D-Sammy Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in dünneren Membranen. ....	66
<b>Abbildung 41:</b> Lokalisation von E5_1-38-ATTO647N in zweiphasigen Riesen-Vesikeln. ....	70
<b>Abbildung 42:</b> Lokalisation von PDGFR $\beta$ -TMD_S495C-ATTO647N in zweiphasigen Riesen-Vesikeln. ....	71
<b>Abbildung 43:</b> Ergebnis zur Untersuchung der Lokalisation von PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5. ....	72
<b>Abbildung 44:</b> Bestimmung der Stöchiometrie von E5. ....	74
<b>Abbildung 45:</b> Bestimmung der Stöchiometrie von PDGFR $\beta$ -TMD. ....	75
<b>Abbildung 46:</b> Vergleich der $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD und dessen Komplex mit unmarkiertem $\Delta E5$ . ....	77
<b>Abbildung 47:</b> Vergleich der $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von $\Delta E5$ und dessen Komplex mit unmarkiertem PDGFR $\beta$ -TMD. ....	78
<b>Abbildung 48:</b> Lokalisation des Komplexes von PDGFR $\beta$ -TMD und E5. ....	80
<b>Abbildung 49:</b> Datenanalyse der Korrelationen von E5 bzw. PDGFR $\beta$ -TMD. ....	84
<b>Abbildung 50:</b> Datenanalyse der Korrelationen des Komplexes. ....	85
<b>Abbildung 51:</b> Heterointeraktionsanalyse der Proteine mittels FRET. ....	87
<b>Abbildung 52:</b> Schematische Darstellung der Stöchiometrie von PDGFR $\beta$ -TMD. ....	91
<b>Abbildung 53:</b> Schematische Darstellung der Stöchiometrie von E5. ....	92

---

<b>Abbildung 54:</b> Schematische Darstellung der Interaktion von PDGFR $\beta$ -TMD (R) und E5 (E) in dicken Membranen.....	93
<b>Abbildung 55:</b> Schematische Darstellung der Interaktion von PDGFR $\beta$ -TMD (R) und E5 (E) in dünnen Membranen.....	94
<b>Abbildung 56:</b> Aufsicht der schematischen Darstellung der postulierten Dimerstrukturen von E5 .....	96
<b>Abbildung 57:</b> Schematische Darstellung und Interaktion der hypothetischen Tetramere ...	97
<b>Abbildung 58:</b> Hypothetischer Komplex aus zwei Tetrameren .....	98
<b>Abbildung 59:</b> Der Expressionsvektor pMMHb-E5 bzw. pMMHb-PDGFR $\beta$ -TMD. ....	122
<b>Abbildung 60:</b> $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in verschiedenen Membranen. ....	125
<b>Abbildung 61:</b> $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren von $\Delta\text{E5}$ in verschiedenen Membranen.....	126
<b>Abbildung 62:</b> $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren der Interaktionsexperimente in verschiedenen Membranen. ....	127
<b>Abbildung 63:</b> $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von $\Delta\text{E5}$ (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen .....	128
<b>Abbildung 64:</b> $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen .....	129
<b>Abbildung 65:</b> $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen.....	130
<b>Abbildung 66:</b> $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen .....	131
<b>Abbildung 67:</b> $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von $\Delta\text{E5}$ (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen (rot).....	132

## Abkürzungsverzeichnis

ad	addieren, auffüllen auf
AN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
BMRB	Biological Magnetic Resonance Data Bank
BPV	<i>engl.</i> bovine papillomavirus (Rinder-Papillomavirus)
CD	Circulardichroismus
Chol	Cholesterin
CSF	<i>engl.</i> , colony stimulating factor (Kolonien stimulierender Faktor)
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
DEiPC	1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DErPC	1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DHB	Dihydroxybenzoesäure
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMoPC	1,2-Dimyristoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DNPC	1,2-Dinervonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPC	N-Dodecylphosphocholin
DPoPC	1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSS	2,2-Dimethyl-2-Silapentane-5-Sulfonsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>engl.</i> , epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGF	<i>engl.</i> , fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
FRET	Förster Radius Energy Transfer
GUV	Giant unilamellar vesicles (Riesen-Vesikel)
HPLC	<i>engl.</i> , High Performance Liquid Chromatographie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IB	<i>engl.</i> , Inclusion Bodies (Einschlusskörperchen)
IP	Isopropanol
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
LB	<i>engl.</i> , lysogeny broth (Vollmedium)
Ld	<i>engl.</i> , liquid disorderd (flüssig kristalline, ungeordnete Lipidphase)
Lo	<i>engl.</i> , liquid orderd (flüssig kristalline, geordnete „Raft“ Lipidphase)
MALDI-TOF	<i>engl.</i> , Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight (Bezeichnung einer Methode in der Massenspektroskopie)
MD	Moleküldynamik
NaPi	Natriumphosphat

---

NMR	<i>engl.</i> , Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinmagnetresonanz)
NMRSD	normalized mean root squared deviation (normierte mittlere Standardabweichung)
OCD	Orientierter Circular dichroismus
OG	N-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
ORD	optische Rotationsdispersion
PDB	Protein Data Bank
PDGF	<i>engl.</i> , platelet-derived growth factor (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
RP	<i>engl.</i> , reversed phase (Umkehrphase)
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RZ	Retentionszeit
$S_{mol}$	Ordnungsparameter
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SH2	Src homology 2
SM	Sphingomyelin
SOC	<i>engl.</i> , Super Optimal Catabolizer (Mediumbezeichnung)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TMD	Transmembrandomäne
UV	Ultraviolett

# 1 Einleitung

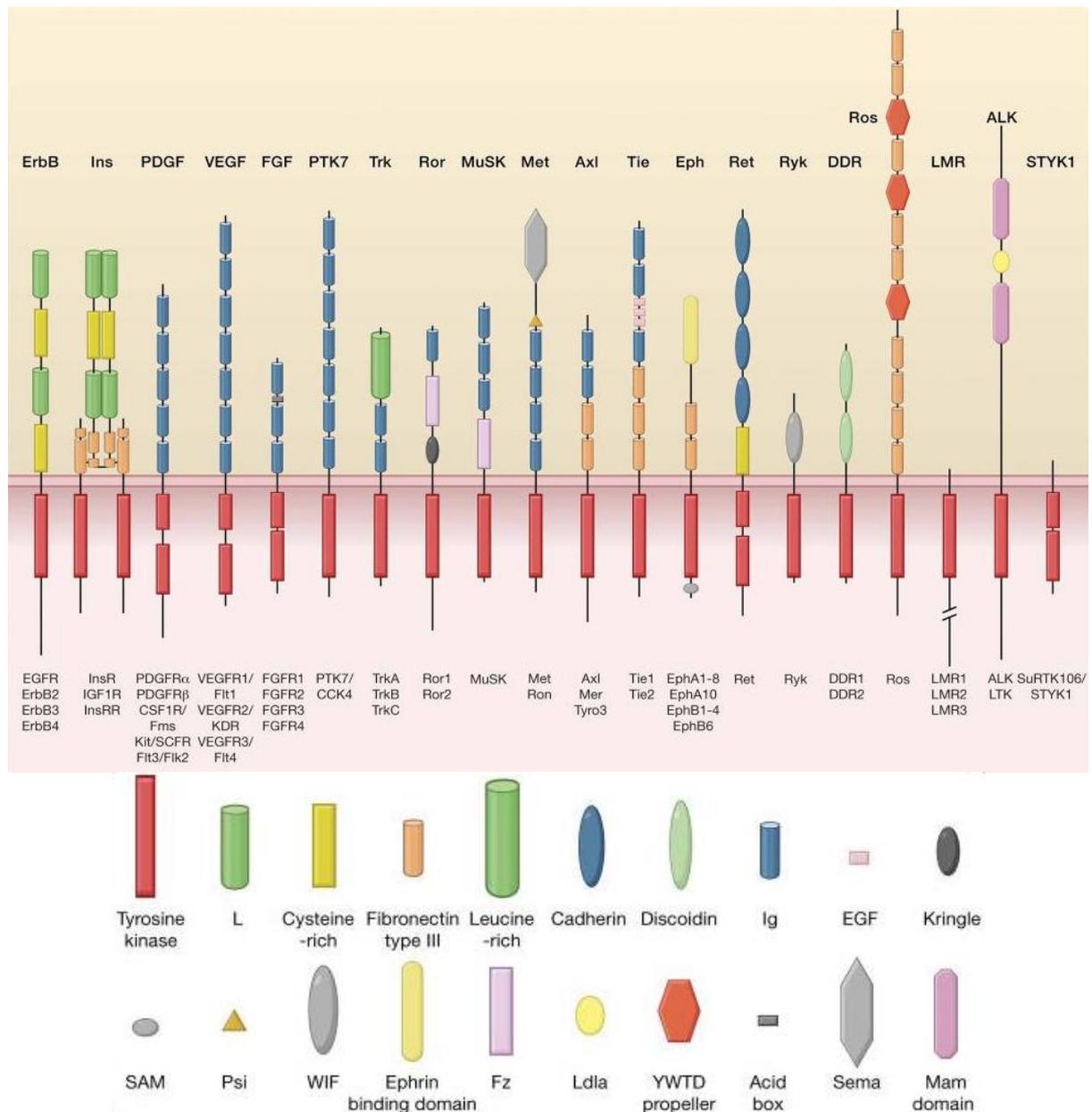
## 1.1 Biologischer Hintergrund

Die Kommunikation zwischen Zellen in einem Organismus ist ein sehr komplexes System. Bis heute sind viele Teile dieses Systems noch ungeklärt. Eine Schlüsselstelle der Kommunikation sind Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Diese sind in der Lage, extrazelluläre Botenstoffe zu binden, als Signal zu interpretieren und dieses über die Zellmembran hinweg ins Zellinnere weiter zu leiten. Die Diversität der Botenstoffe ist dabei vielfältig. So können kleine Ionen, komplexere Hormone oder Proteine wie Zytokine und Neurotransmitter auf kurze Distanz oder aber auch über weite Entfernungen im Organismus ihre Wirkung entfalten.

Eine große Familie von Zellmembranrezeptoren stellen die G-Protein gekoppelten Rezeptoren dar [1]. Neben einer Vielzahl von Funktionen sind sie auch für den Seh-, Geruchs- und Geschmackssinn verantwortlich [2]. Weiterhin kann man einige Krankheiten wie Krebs auf deren Fehlfunktion zurückführen, was sie zu einem wichtigen Ziel pharmazeutisch wirksamer Substanzen macht [3–6]. Schätzungsweise 30 – 40 % der Arzneimittel zielen bereits auf diese Rezeptoren [7]. Neben den G-Protein gekoppelten Rezeptoren übernehmen Rezeptor-Tyrosinkinasen wichtige regulatorische Funktionen in zellulären Prozessen bei dem Zellzyklus, bei der Embryonalentwicklung, bei der Differenzierung und Migration und dem Wachstum [8,9]. Der Mechanismus der Aktivierung dieser Rezeptoren ist bis heute nicht vollständig verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Struktur und das Verhalten der Transmembrandomäne (TMD) des Tyrosinkinase-Rezeptors PDGFR  $\beta$  untersucht werden, die eine Schlüsselstelle bei der Signalweiterleitung ins Zellinnere darstellt.

### 1.1.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKn) besitzen die intrinsische Fähigkeit,  $\gamma$ -Phosphatgruppen von ATP auf Hydroxylgruppen von Tyrosinresten zu übertragen, wodurch sie den Beginn einer Signalkaskade in der Zelle auslösen [10]. Das menschliche Genom trägt Gene für 58 verschiedene RTKn, verteilt auf 20 Unterfamilien (Abbildung 1), basierend auf Homologien der Sequenz, der Struktur oder gebundenem Ligand [11]. Im Allgemeinen bestehen RTKn aus drei Domänen: Einer extrazellulären Domäne, die meist glykosyliert ist und als Bindestelle für den Liganden dient, einer intrazellulären Domäne mit Kinaseaktivität und einem tyrosinreichen C-Terminus, sowie einer  $\alpha$ -helikalen TMD, die die extra- und intrazellulären Domänen miteinander verbindet [12].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der RTK aus dem Menschen. Sie sind in 20 Unterfamilien eingeteilt. Die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne ist als rotes Rechteck dargestellt und unterscheidet sich zwischen den Familien nur wenig. Die extrazelluläre, Ligandenbindende Domäne unterscheidet sich teils erheblich. Im Zuge dieser Arbeit wurde die TMD des PDGF-Rezeptors genauer untersucht (dritter von links), welcher ausschließlich Immunglobulin-ähnliche, extrazelluläre Domänen trägt (blauer Zylinder). Diese werden allgemein mit D1 bis D5 gekennzeichnet. Abbildung geändert entnommen aus [11].

Generell induziert die Bindung eines Liganden allosterisch getriebene Konformationsänderungen im Rezeptor, welche an die zytoplasmatischen Domänen übertragen werden. Die TMDn spielen dabei eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren verfügen die RTK nur über eine TMD. Daher reicht ein Rezeptormolekül nicht aus, um strukturellen Änderungen der Ligandenbindedomäne stabil an die Kinasedomänen zu übertragen. Aus diesem Grund müssen für die Aktivierung mindestens zwei Rezeptoren

miteinander interagieren [8]. Dabei wird angenommen, dass nicht nur die einfache Dimerisierung der Rezeptoren entscheidend ist, sondern dass auch die Veränderung der Ausrichtung der TMDn zueinander die Orientierung der intrazellulären Domänen beeinflusst [13].

Es gibt grundlegend zwei Interaktions- bzw. Aktivierungsprinzipien: Die Liganden-vermittelte Dimerisierung, bei der der Ligand maßgeblich an der Kontaktfläche der Rezeptoren beteiligt ist und damit erst die Dimerisierung ermöglicht. Das zweite Prinzip ist die Rezeptor-vermittelte Dimerisierung. Dabei induziert der Ligand durch die Bindung an den Rezeptor dessen Konformationsänderung, wonach sich deren Affinität zueinander drastisch erhöht. Das resultiert in einer Dimerisierung, wobei der Ligand keinen Beitrag zur Kontaktfläche liefert. Beide Prinzipien treten jedoch nicht immer streng getrennt voneinander auf.

Der Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF) vernetzt als Dimer zwei Tropomyosin kinase A (TrkA) Rezeptoren, ohne dass ein direkter Kontakt zwischen den Rezeptoren entsteht und nutzt so die extremste Form von Liganden-vermittelter Dimerisierung [14,15].

Der Stammzellfaktor (Stem cell factor, SCF) verbindet zwei KIT Rezeptoren, doch zusätzlich kommt es durch eine Strukturänderung zu einer lateralen Interaktion der Ig-ähnlichen Domänen D4 und D5 der zwei Rezeptoren, die sich außerhalb der Ligandenbindestelle befinden [16]. Sie stabilisieren so die Rezeptordimerisierung und ermöglichen dadurch die Aktivierung. So wird in diesem Fall Liganden-vermittelte und Rezeptor-vermittelte Dimerisierung kombiniert.

Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) repräsentiert die extremste Form der Rezeptor-vermittelten Dimerisierung. Hier tragen die aktivierenden, monomeren Liganden in keiner Weise zur Rezeptordimer-Kontaktfläche bei [17,18]. Die Rezeptoren verbleiben bis zur Aktivierung in einer intramolekularen Autoinhibition [19,20]. Bei der Aktivierung induziert die Bindung des Liganden eine Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne, so dass ein vorher verdeckter Arm freigelegt wird und mit dem zweiten Rezeptormolekül interagieren kann [21]. Bei einigen der humanen Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptoren (ErbB-Rezeptoren) liegt sogar ohne gebundenen Liganden ein nicht kovalentes Dimer vor, welches eine inaktive, autoinhibierende Konformation einnimmt [22]. Die Interaktion der TMDn ist dabei entscheidend und wird im Abschnitt 1.2.1 genauer betrachtet.

Zusätzlich zu den genannten Interaktionsprinzipien können auch weitere Moleküle wie Heparin oder Heparansulfat in den Dimerisierungsprozess mit einbezogen werden [23,24]. So ist der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast growth factor, FGF) alleine nicht in der Lage, den FGF-Rezeptor zu aktivieren [25]. Erst durch die Bindung von Heparin oder Heparansulfat kann der Ligand den dimeren Rezeptor stabilisieren und aktivieren [26].

Neben den löslichen Liganden der meisten RTK-Familien sind die Liganden der Ephrin (Eph) Rezeptor Familie in der Plasmamembran einer anderen Zelle verankert [27]. Somit muss es für die Aktivierung zu einem Zell-Zell Kontakt kommen [28]. Neben Dimeren Eph-Rezeptoren sind auch oligomere Zustände beobachtet worden [29,30].

Infolge der Rezeptoraktivierung werden die Kinasedomänen optimal zueinander orientiert und sie autophosphorylieren sich an den Tyrosinresten [31]. Diese phosphorylierten Bereiche dienen als Anlaufstelle für eine Vielfalt von cytoplasmatischen Adaptermolekülen, welche ihrerseits aktiviert werden. Das stellt den Beginn von Signaltransduktionskaskaden dar, die im Zellkern eine veränderte Genexpression induzieren.

Die Inaktivierung der RTK spielt eine entscheidende Rolle, sie wird streng geregelt und erfolgt durch Tyrosin-Phosphatasen, rezeptorvermittelte Endozytose oder Abbau. Sind die RTKn mutiert oder gerät die Aktivität außer Kontrolle, so kann dies eine Reihe von Krankheiten nach sich ziehen, darunter Diabetes, Arteriosklerose, Angiogenese, Autoimmunerkrankungen und Krebs [32,33]. Aus diesem Grund sind RTKn ein wichtiges Ziel bei der medikamentösen Behandlung von Krankheiten sowie bei der Medikamentenentwicklung.

Um die allosterisch regulierten Aktivierungsmechanismen von RTKn im Detail zu verstehen, genügt es nicht, die intra- und extrazellulären Domänen separat zu untersuchen. Die entscheidende Stelle bei der Signalübertragung stellen die TMDn dar. Es ist daher zu erwarten, dass erst nach genauer Kenntnis der Struktur und Eigenschaften dieser hydrophoben Bereiche, die RTKn in ihrer Gesamtheit verstanden werden.

### 1.1.2 Der PDGF-Rezeptor

Die Familie der Blutplättchen-Wachstumsfaktor Rezeptoren (Platelet-derived Growth Factor Receptor, PDGFR) wurde in den 1980er Jahren das erste Mal beschrieben [34]. Bisher sind zwei Isoformen bekannt, die mit  $\alpha$  bzw.  $\beta$  bezeichnet werden. Der PDGFR  $\alpha$  besitzt ein Molekulargewicht von ca. 170 kDa, wohingegen der PDGFR  $\beta$  mit 180 kDa etwas größer ist [35]. Er gehört zu der Klasse III der RTKn, welche fünf Mitglieder beinhaltet.

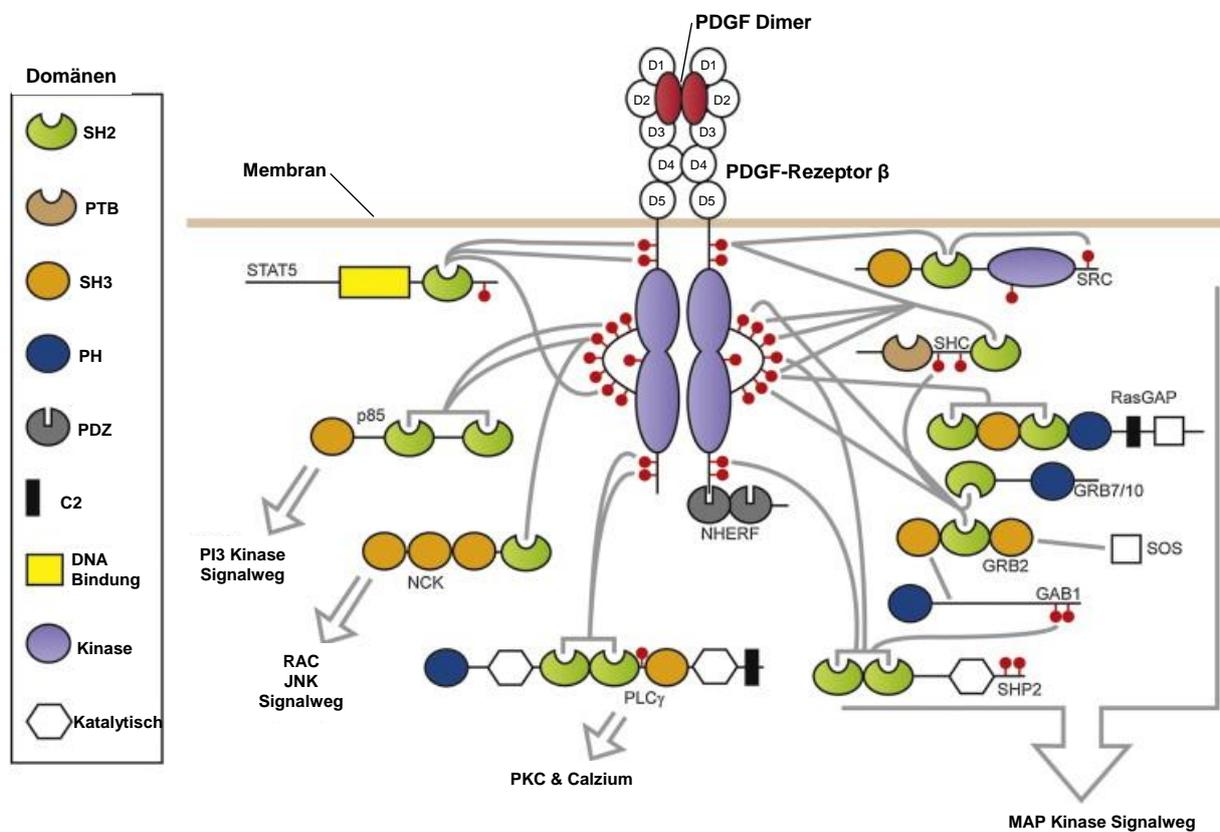
Der PDGF-Rezeptor, wie auch die anderen Mitglieder der Klasse, tragen extrazellulär fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen (D1 – D5) und intrazellulär zwei Tyrosinkinase-Domänen [36]. Verbunden sind sie durch eine TMD. Prinzipiell kann der C-Terminus innen oder außen liegen. Ausschlaggebend für die Richtung der Insertion ist die Eigenschaft der TMD, wobei häufig positiv geladene Aminosäuren an den flankierenden Bereichen der TMD ins Zytoplasma zeigen. Diese Regel gilt für Bakterien und wurde ebenfalls bei eukaryotischen TMDn entdeckt [37–40]. Der PDGF-Rezeptor  $\beta$  hat eine Typ I Orientierung, wonach der C-Terminus ins Zytoplasma zeigt. Mit drei positiv geladenen, C-Terminalen Aminosäuren direkt nach der TMD, folgt auch er der beschriebenen Regel (Abbildung 2).



Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt mit dem natürlichen Ligand, dem Wachstumsfaktor PDGF. Vor über 40 Jahren wurde er in menschlichen Blutplättchen identifiziert [42]. PDGF übernimmt wichtige Aufgaben im Zellwachstum und Migration, bei der Embryonalentwicklung und Wundheilung [35]. Die Überproduktion führt zu gesteigerter Zellproliferation, was beispielsweise Arteriosklerose oder Tumorstadium begünstigen kann [35]. Es sind vier Isoformen des PDGF bekannt, PDGF-A, -B, -C und -D, [43–48]. Diese sind hauptsächlich als Homo-, aber auch als Heterodimer biologisch aktiv [35,49]. Die Untereinheiten sind dabei in zwei verdrehten, antiparallelen Paaren von  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, die über drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [50]. Bei Aktivierung bindet der dimere Ligand an zwei Rezeptormoleküle und induziert damit die Dimerisierung des Rezeptors. Somit liegt hier eine Liganden-vermittelte Rezeptordimerisierung mit Rezeptor-vermittelter Aktivierung vor. Durch die Aktivierung bildet sich ein Komplex aus PDGF-BB mit der zweiten und dritten Ig-ähnlichen Domäne (D2, D3) des PDGFR  $\beta$ . Dabei durchläuft der Ligand eine Konformationsänderung, wodurch hydrophobe Aminosäurereste der zuvor unstrukturierten L1 Schleife an die Oberfläche gelangen. Diese kann nun mit einem hydrophoben Teil der D3 Domäne des Rezeptors interagieren. Dadurch wird die Kontaktfläche zwischen Ligand und Rezeptor hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert [51]. Die Domäne D1 ist nach außen verdreht und kommt dabei nicht mit dem Liganden in Kontakt [51]. Wichtig für die Aktivierung scheint noch die Interaktion der Domänen D4 zu sein. Die Entfernung einer Ladung durch Mutationen an einer von zwei Stellen in D4 haben gezeigt, dass die Dimerisierungsfähigkeit zwar nicht beeinflusst wird, jedoch die Kinaseaktivität [52]. Daher scheinen die Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung alleine nicht ausreichend für eine Aktivierung zu sein. Erst die laterale Interaktion der membranproximalen Domänen positioniert wahrscheinlich die TMDn optimal zueinander, wodurch sie im korrekten Motiv dimerisieren können, sodass der Rezeptor aktiv wird.

Die Aktivierung kann prinzipiell auch als eine Aufhebung der Autoinhibition des katalytischen Zentrums angesehen werden. Dabei gibt es mehrere Mechanismen der Autoinhibition. Wie bei vielen RTKs enthält der sog. „activation loop“ des katalytischen Zentrums wichtige regulatorische Tyrosinreste, die in der Abwesenheit des Liganden verborgen bleiben [53]. Die membranproximale Domäne könnte bei dieser Autoinhibition beteiligt sein, wie bei dem FLT3-Rezeptor (fms-like tyrosine kinase 3-Rezeptor) und Stammzellfaktor-Rezeptor gezeigt werden konnte [54,55]. Der C-terminale Ausläufer spielt ebenfalls eine Rolle bei der Autoinhibition [56]. Bei der Aktivierung werden durch Konformationsänderungen die inhibitorischen Interaktionen der drei beschriebenen Bereiche destabilisiert, darauffolgend wird der „activation loop“ freigelegt und kann phosphoryliert werden, was den Beginn weiterer Phosphorylierungen einleitet. Mutationen der Tyrosine (Tyr 857, Tyr 751) in der „activation loop“ zeigen eine verminderte Rezeptoraktivität [57,58]. An die phosphorylierten Tyrosine docken

nun verschiedene zytosolische Signalmoleküle an, die eine SH2 (src-homology-2) Domäne, oder eine PTB (Phosphotyrosin-binding) Domäne tragen. Sie bilden den jeweiligen Start einer Signaltransduktionskaskade, welche meist im Zellkern zu einer veränderten Genexpression führt. Die meisten dieser Signalmoleküle können selbst phosphoryliert sein und so eine weitere Bindestelle offenlegen, oder aktivieren sich durch Konformationsänderungen. Eine wichtige Signalkaskade, die der PDGF-Rezeptor aktiviert, ist der MAP-Kinase Signalweg (MAP, mitogen-activated protein), der u.a. durch Ras (Rat sarcoma) aktiviert wird (Abbildung 4). Ebenso binden die Enzyme Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase und Phospholipase C (PLC)- $\gamma$  an die phosphorylierten Tyrosine des aktiven Rezeptors, wodurch sie ihrerseits aktiviert werden. Sie besitzen das gleiche Substrat (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat), dessen Umsetzung aktiviert jedoch unterschiedliche Signalkaskaden.



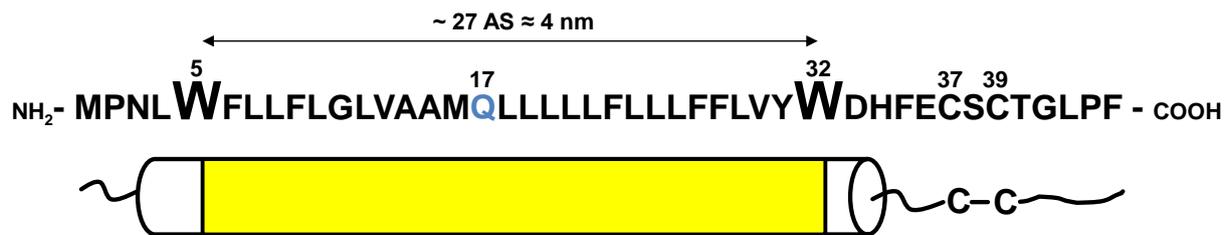
**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Signalkaskaden des PDGF-Rezeptors  $\beta$ . Das PDGF-Dimer induziert als Ligand eine Rezeptordimerisierung, mit nachfolgender Aktivierung durch Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste (rote Punkte) der intrazellulären Domänen. Diese sind Bindestellen von Signalmolekülen, die nach Bindung ihrerseits aktiviert werden und Signalkaskaden induzieren. Abbildung geändert entnommen aus [53].

Ebenso wichtig wie die Aktivierung des Rezeptors, ist dessen Inaktivierung. Dies kann durch Endozytose und Abbau des gesamten Ligand-Rezeptor-Komplexes in Lysosomen erfolgen. Dafür wird der Rezeptor markiert, indem er von der E3 Ubiquitin Ligase CBL (Casitas B-lineage Lymphoma) ubiquitiniert wird [59]. Außerdem kann der Rezeptor durch einen negati-

ven Rückkopplungsmechanismus inaktiviert werden. Dabei werden bei der Aktivierung mancher Signalkaskaden auch Signalmoleküle rekrutiert, die deren Hemmung begünstigen. Letzten Endes bestimmt die Kombination aus stimulierenden und inhibierenden Signalen die Stärke der Signalkaskade. Weiterhin wird die Aktivität durch Tyrosinphosphatasen verringert. Gerät diese Aktivität außer Kontrolle, so kann es zu schwerwiegenden Erkrankungen kommen. Medikamente wie „Imatinib“ können die Aktivität des PDGF-Rezeptors hemmen [53]. Der PDGF-Rezeptor  $\beta$  kann auch durch das Onkoprotein E5 aberrant aktiviert werden, was im nächsten Abschnitt genauer beleuchtet wird.

### 1.1.3 Die Aktivierung des PDGF-Rezeptors $\beta$ durch das Onkoprotein E5

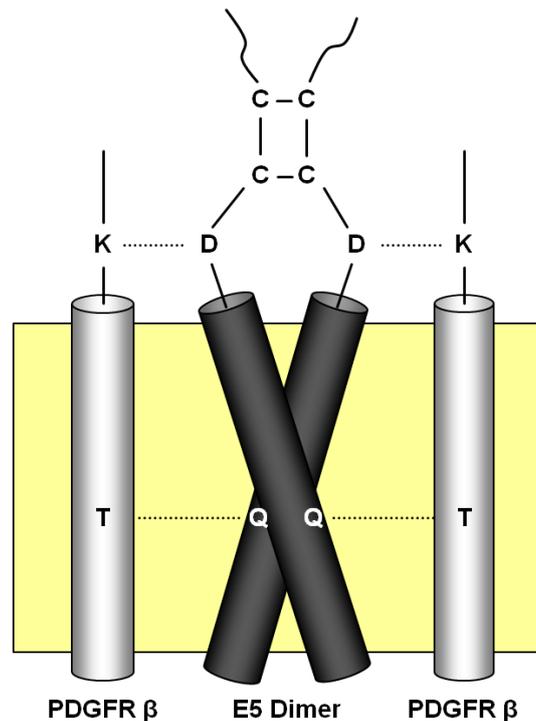
Das Rinderpapillomavirus vom Typ I ist in der Lage, bei Infektion der Epithelschichten der Haut von Rindern gutartige Fibropapillome hervorzurufen [60,61]. Dabei spielt das Onkoprotein E5, welches in der frühen Phase des Virus-Lebenszyklus exprimiert wird, eine entscheidende Rolle [62,63]. Auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass E5 maßgeblich an der Transformation der Zellen beteiligt ist [64–67]. Es besteht aus nur 44 hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren, wobei eine enzymatische Aktivität bisher nicht bekannt ist [68,69]. Damit gilt es als das kleinste bekannte Onkoprotein [70]. Durch den hydrophoben Charakter ist es ausschließlich in der Membran lokalisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Konzentration in der Golgi-Membran am höchsten ist [71]. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass das E5 Protein mit einigen Membranproteinen, wie z.B. der vakuolen ATPase, interagieren kann [72–74]. Seine wichtigste Funktion stellt jedoch die ligandenunabhängige Aktivierung des PDGF-Rezeptors  $\beta$  dar [75–77]. Dabei interagiert E5 wahrscheinlich mit einem Vorläufer-Molekül des Rezeptors, welcher ebenfalls in der Golgi-Membran lokalisiert ist und dem einige posttranslationale Modifikationen fehlen [78]. Der C-Terminus von E5 ragt dabei in das Lumen des Golgi-Apparats, weswegen es eine Typ II Membranorientierung einnimmt. Somit interagiert es antiparallel mit dem Rezeptor. Strukturuntersuchungen von E5 haben gezeigt, dass ca. zweidrittel des Proteins in einer vorwiegend  $\alpha$ -helikalen Struktur vorliegen [79]. Das letzte Drittel des C-Terminus ist unstrukturiert und ragt aus der Membran heraus. Die Aminosäuresequenz von E5 zeigt einige Besonderheiten (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Aminosäuresequenz von E5. Der  $\alpha$ -helikale Bereich erstreckt sich von ca. Leuzin 4 bis ca. Asparaginsäure 33, wobei sich die TMD vermutlich zwischen den beiden Tryptophanen W 5 und W 32 befindet (gelb).

Sie besitzt zwei Tryptophane, die die Begrenzung der TMD zeigen könnten. Bei anderen Membranproteinen konnte gezeigt werden, dass Tryptophane als eine Art Anker fungieren, um die TMD in der Membran zu stabilisieren [80–83]. Das bedeutet, dass die TMD mit einer Länge von ca. 27 Aminosäuren bzw. ca. 4 nm, im Gegensatz zu anderen Membranproteinen, besonders lang ist. In der TMD selbst ist ein Glutamin (Position 17) zu finden, was bei der ansonsten hydrophoben Sequenz ungewöhnlich ist. Tatsächlich scheint diese Aminosäure sowohl eine entscheidende Rolle bei der Homodimerisierung, als auch bei der Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor  $\beta$  zu übernehmen [84,85]. Hierbei könnte das Glutamin 17 mit Threonin 513 des Rezeptors eine Wasserstoffbrücke ausbilden [86]. Zusätzlich besitzt der Rezeptor ein Serin (Position 516), welches ebenfalls in der Lage wäre eine Wasserstoffbrücke auszubilden. An den äquivalenten Stellen im PDGF-Rezeptor  $\alpha$  sind diese Aminosäuren hydrophob. Dies könnte erklären, warum E5 nicht mit diesem Rezeptor interagiert [87]. Moleküldynamik (MD) Simulationen konnten zeigen, dass E5 wahrscheinlich linksgängig mit einem Leucin-zipper ähnlichen Motiv dimerisiert [88,89] und nur als Dimer den Rezeptor aktivieren kann [90,91]. Die beiden konservierten Cysteine (37 und 39) in der Sequenz könnten dabei über die Bildung von Disulfidbrücken das Dimer kovalent stabilisieren. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass ohne Disulfidbrücken ein stabiles Dimer gebildet werden könnte [79]. Weiterhin könnte die Asparaginsäure 33 mit dem Lysin 499 des PDGF-Rezeptors  $\beta$  eine Salzbrücke bilden (Abbildung 6) [92].

E5 ist dadurch in der Lage, nur mittels spezifischer Helix-Helix Wechselwirkung einen stabilen Komplex mit den TMDn des PDGF-Rezeptors  $\beta$  zu bilden, was zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führt. Diese permanente Aktivierung hat unkontrolliertes Zellwachstum und dadurch Krebs zur Folge [69,93]. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist bisher jedoch noch ungeklärt.



**Abbildung 6:** Hypothetischer Komplex von E5 und PDGF-Rezeptor  $\beta$ . E5 kann dabei wie ein molekulares Gerüst fungieren um so die TMDn des Rezeptors in einen aktiven Zustand zu versetzen. Zur Stabilisierung des Komplexes können sich Wasserstoffbrücken zwischen Threonin und Glutamin, sowie Salzbrücken zwischen Asparaginsäure und Lysin ausbilden. Die Cysteine können durch die Bildung von Disulfidbrücken das E5 Dimer kovalent verbinden. Die Membran ist hier in Gelb dargestellt. Abbildung angelehnt an [91].

## 1.2 Strukturuntersuchung von $\alpha$ -helikalen Membranproteinen

Die Membran spielt, als Grenzschicht zwischen Kompartimenten in der Zelle oder dem intra- und extrazellulären Raum, eine wichtige Rolle. Integrale Membranproteine erfüllen deshalb oftmals eine wichtige Funktion bei der Übermittlung von Signalen über diese Grenze hinweg. Ca. 20 – 30 % der menschlichen Gene kodieren für Membranproteine [94,95]. So wird der selektive Stoffaustausch von Molekülen und Ionen durch transmembrane Transport- und Kanalproteine reguliert [96,97]. Den Kontakt und die Stabilisierung von Zellen im Gefüge der extrazellulären Matrix wird durch Anker-, bzw. Adhäsionsproteine vermittelt, die ebenfalls fest in der Membran integriert sind [98–100].

Die Ausbildung eines funktionellen Membranproteins kann prinzipiell in zwei Abschnitte unterteilt werden. Zu Anfang bilden sich die  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturen unabhängig voneinander aus. Im nächsten Schritt treiben sequenzspezifische Motive die laterale Interaktion und mögliche Umorientierung der Helices zu höheren Komplexen voran (two-stage model) [101]. In einem dritten Schritt könnten weitere Teile des Proteins, als Reaktion auf die Interaktion, in die Membran eintauchen. Auch die Bindung organischer Kofaktoren könnte

dann stattfinden [102]. Die Strukturuntersuchung zielt somit auf einzelne  $\alpha$ -Helices, aber auch auf die Mechanismen der Komplexbildung mehrerer Helices. Erkenntnisse aus diesem Mechanismus sind z.B. für die Arzneimittelforschung wichtig [103].

Besonders der zweite Schritt, der Mechanismus von interagierenden TMDn am Beispiel einer RTK, steht in dieser Arbeit im Vordergrund. Wie im Abschnitt 1.1.1 beschrieben wurde, sind es Liganden-induzierte, allosterisch getriebene Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen von RTKn, die den Interaktionsmechanismus der TMDn einleiten oder ändern. So kann der Rezeptor in einen aktiven Zustand überführt werden.

Durch die Einbettung in die hydrophobe Membran müssen die Proteine selbst eine hohe Hydrophobizität besitzen. Dies führt zu unspezifischer Aggregation, sobald die TMDn mit dem wässrigen Milieu in Kontakt treten. Bei der Strukturuntersuchung von TMDn stehen daher Methoden im Vordergrund, die es erlauben, die Proteine in möglichst nativen Systemen zu untersuchen. Neben organischen Lösungsmitteln bieten Detergenzmizellen und künstliche Lipiddoppelschichten eine gute, membranimitierende Umgebung. Die Kristallisation von Membranproteinen zur Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie, ist in diesen Systemen oftmals nicht möglich. Mit der NMR-Spektroskopie steht jedoch eine sehr hochauflösende Methode zur Verfügung, mit der sich transmembrane Proteine in geeigneten Bedingungen sehr gut untersuchen lassen. Dabei kann man grundlegend zwischen der Flüssigkeits- und Festkörper-NMR-Spektroskopie unterscheiden. In einem gewissen Rahmen kann die Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie dazu genutzt werden, die Membranproteine in Detergenzmizellen oder in membranähnlichen Bizellen zu untersuchen. Durch die schnelle Bewegung der Moleküle mittelt sich die chemische Verschiebung zur isotropen Position aus und führt so zu scharfen Peaks im Spektrum. Die dabei genutzten Membransysteme zeichnen sich durch eine geringe Größe aus und können sich daher schnell bewegen. Zudem schirmen sie Membranproteine mit ihrem hydrophoben Kern sehr gut vom wässrigen Milieu ab. Doch der Nachteil liegt darin, dass Detergenzmizellen nur bedingt echte Biomembranen imitieren. Eine gerichtete Kraft, die durch Detergenzien auf Membranproteine einwirkt ist nicht vorhanden; so ordnen sich Detergenzmoleküle um die Proteine und schirmen so lediglich das Wasser ab. Biomembranen hingegen besitzen, je nach Lipidart, eine in engen Grenzen definierte, hydrophobe Dicke und passen sich nur sehr wenig den Proteinen an. Vielmehr wirkt vertikal ein gewisser Zwang auf die Proteine, sich in die Membran zu integrieren. Die Strukturuntersuchung der TMDn von GpA und dem M2 Protonen Kanal in Mizellen und Membranen haben gezeigt, dass beim direkten Vergleich strukturelle Unterschiede festzustellen sind [104,105]. Es ist weiter davon auszugehen, dass auch die Wahl und Zusammensetzung der Lipide einen weiteren Einfluss auf die Struktur nehmen kann.

Das hat weitreichende Auswirkungen auf Funktion, Faltung und sogar Sortierung der Membranproteine in der Zelle [106–112].

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, Membranproteine in künstlichen Lipiddoppelschichten zu untersuchen, die natürlichen Membranen sehr ähneln. Die Zusammensetzung der Lipidmembranen kann dabei in Grenzen beliebig variiert werden. Der Hauptunterschied zur Flüssigkeits-NMR liegt in zusätzlichen anisotropen (orientierungsabhängigen) Wechselwirkungen wie chemische Verschiebungsanisotropie (CSA) und magnetischen Dipol-Dipol Wechselwirkungen. Dadurch kommt es zu einer Verbreiterung der Peaks im Spektrum. Außerdem müssen die Membranen für die Untersuchung mechanisch oder magnetisch orientiert werden [113].

Eine weitere, gängige Methode in der Strukturaufklärung von Membranproteinen ist die CD-Spektroskopie. Sie liefert zwar keine atomaren Details der Strukturen, doch lassen sich mit ihr Sekundärstrukturanalysen durchführen. Dabei wird linear polarisiertes Licht aus gegenläufig zirkularer polarisierter Komponenten durch die Probe geschickt, wobei die Peptidbindung durch ihre Chiralität die Komponenten unterschiedlich absorbiert. Aus dieser Differenz lassen sich Erkenntnisse der Sekundärstruktur gewinnen [114,115].

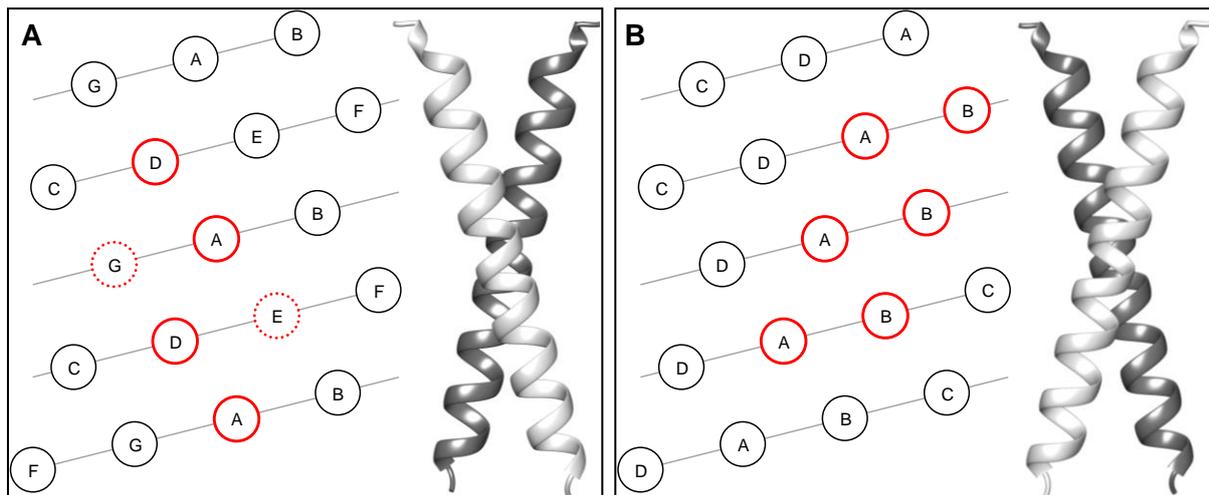
### **1.2.1 Struktur und Eigenschaften von Membranproteinen**

Durch das vertikal begrenzte, hydrophobe Milieu in einer Biomembran bestehen TMDn im allgemeinen aus 20-25 hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren [116–118]. Die intermolekularen Interaktionskräfte der wasserlöslichen Proteine haben in einer Membrenumgebung eine andere Bedeutung. So spielt in hydrophober Umgebung der hydrophobe bzw. entropische Effekt, welcher z.B. die Bindung von PDGF an den Rezeptor stabilisiert [51], keine Rolle mehr [119]. Wasserstoff- und Salzbrücken hingegen gewinnen enorm an Bedeutung, da polare oder geladene Seitenketten nicht mehr vom Wasser abgeschirmt werden können [120]. Da eine  $\alpha$ -Helix durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen einem Carbonylsauerstoff und einem vier Aminosäuren entferntes Amidproton stabilisiert wird, ist diese Sekundärstruktur in der Membran sehr stabil. Das Potential an Wasserstoffbrücken ist ausgeschöpft und der Aufwand an freier Energie von ca. 80 kcal/mol wäre nötig, um die Helix in der Membran vollständig zu entfalten [121]. Dennoch können  $\alpha$ -Helices vereinzelt Knicke bzw. Unterbrechungen der  $\alpha$ -helikalen Struktur aufweisen, um die Funktion von Kanälen zu unterstützen indem die Polarität und Flexibilität verbessert wird [122].

## 1.2.2 Interaktionsmotive von Membranproteinen

Die am weitesten verbreitete Sekundärstruktur von Membranproteinen ist die  $\alpha$ -Helix, weswegen in dieser Arbeit nur auf die laterale Interaktion dieser Strukturen eingegangen wird. Neben polaren Interaktionen sind es hauptsächlich Van-der-Waals-Kräfte die die Helix-Helix-Wechselwirkung und Komplexbildung von Membranproteinen begünstigen und stabilisieren. Diese Kräfte wirken nur über eine sehr kleine Distanz und nehmen mit der sechsten Potenz des Abstands ab. Häufig begünstigen deshalb kleine Aminosäurereste, wie bei Glycin oder Alanin, eine höhere Packungsdichte der Komplexe an der Kontaktfläche, als bei löslichen Proteinen [123]. Die Betrachtung der Entropie bei Helix-Dimeren zeigt grundsätzlich, dass die in der Kontaktfläche liegenden Aminosäurereste in ihren möglichen Mikrozuständen bzw. Freiheitsgraden eingeschränkter sind als im monomeren Zustand. Liegen jedoch Glycine (Wasserstoff als Seitenkette) oder  $\beta$ -verzweigte Aminosäuren (Valin, Isoleuzin etc.) in der Kontaktfläche, so gibt es im monomeren Zustand ohnehin wenig Konformere. Dadurch ist die energetisch ungünstige Verringerung der Entropie der Reste durch die Bildung der Kontaktfläche nur minimal. Weiterhin kann die Entropie der Lipide ebenfalls zur Assoziation von TMDn beitragen. Die Freiheitsgrade der Kohlenwasserstoffketten der Lipide nehmen durch die direkte Nachbarschaft einer Helix ab. Die dadurch gesenkte Entropie kann wieder erhöht werden, indem die Lipide aus der Kontaktfläche der interagierenden Helices freigesetzt werden.

Ziel der Forschung ist es daher, anhand der Aminosäuresequenzen von komplexbildenden  $\alpha$ -Helices, grundlegende Interaktionsmotive zu identifizieren [124]. Neben Interaktion mehrerer Helices, unterscheidet man bei der Wechselwirkung von zwei Helices grundsätzlich zwischen einer rechtsgängigen- oder linksgängigen Interaktion [125]. Bei einer linksgängigen Wechselwirkung benennt man die Aminosäuren gemäß Buchstaben im Alphabet von a bis g. So wird die Dimer-Kontaktfläche von den Aminosäuren a und d besetzt, wobei g und e den Kontakt flankieren bzw. stabilisieren können. Aufgrund dieser Zählweise spricht man auch von einem Heptadenmotiv [126]. Bei einer rechtsgängigen Interaktion benutzt man die Zählweise a bis d und bezeichnet das Motiv deshalb auch als Tetradenmotiv [127]. Die Kontaktfläche bildet sich dann aus den Aminosäuren a und b.



**Abbildung 7:** Rechts- und linksgängige Interaktionsmotive zweier  $\alpha$ -Helices in Membranen. **A:** Ein linksgängiges Dimer interagiert mit dem Heptadenmotiv ( $[a\dots g]_n$ ), wobei die Kontaktfläche durch die Aminosäuren a und d gegeben ist (rote Kreise). Die Interaktion kann mit den flankierenden Aminosäuren g und e stabilisiert werden (rot gepunktete Kreise). **B:** Ein rechtsgängiges Dimer wechselwirkt prinzipiell mit dem Tetradenmotiv ( $[a\dots d]_n$ ). Die Aminosäuren a und b bilden die Kontaktfläche (rote Kreise). Die involvierten Ebenen der Helix bei beiden Motiven können variieren und bestimmen die Affinität der Helices zueinander.

Das GxxxG Motiv ist ein weit verbreitetes Sequenzmotiv und wird häufig bei Membranproteinen gefunden [128,129]. Darin liegen mindestens zwei Glycine in der  $\alpha$ -Helix übereinander, die durch drei beliebige Aminosäuren getrennt sind. Diese formen eine Art Delle, in die sich die zweite  $\alpha$ -Helix optimal einbetten kann. Die Interaktion mit diesem Motiv ist meist rechtsgängig.

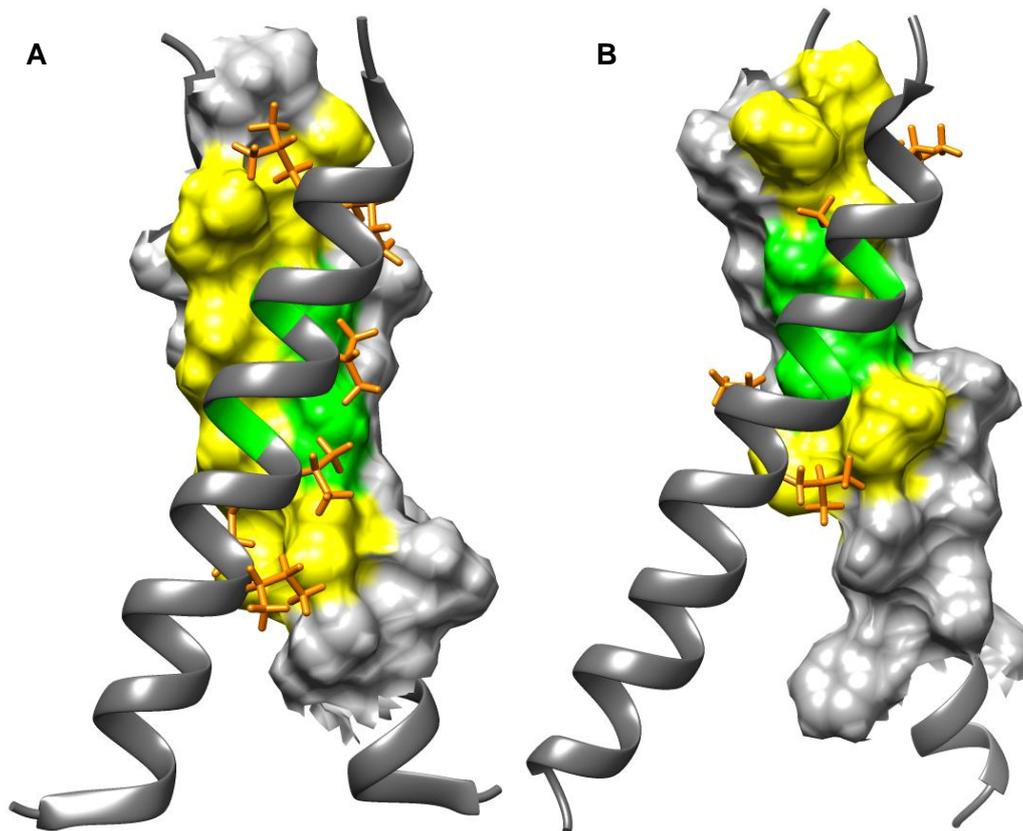
Das bekannteste Protein, in welchem dieses Motiv die TMDn dimerisieren lässt ist Glycophorin A (GpA) aus der Erythrozytenmembran [130]. Umfangreiche Mutationsstudien und Strukturuntersuchungen an diesem Modellprotein trugen zum Verständnis dieses Dimerisierungsmotivs bei [104,131,132]. So wird es heute noch als Referenzprotein für die Quantifizierung von Homodimerisierungszuständen in biologischen Dimerisierungs-Assays verwendet [133–135].

GpA besitzt ein Sequenzmotiv L1xxGVxxGVxxTI, bei welchem die Glycine der ersten Helix, den Valinen der zweiten Helix eine Vertiefung zur Anlagerung eröffnen [136,137]. Dadurch kommt es zu einem engen Kontakt zwischen den Helices und Van-der-Waals-Kräfte stabilisieren das Dimer [138–140]. Die mit x gekennzeichneten Aminosäuren liegen auf der gegenüberliegenden Seite der Helix und tragen nicht zur Interaktion bei. Mit Hilfe der flankierenden Aminosäuren kommt es zu zusätzlichen Kontakten zwischen den Helices (Abbildung 8) [136,141]. Ferner entstehen intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen dem C $\alpha$ -Wasserstoff der Glycine und der Carbonylgruppen des Helix-Rückgrats [142]. Eine weitere intermolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe von Threonin 87 und dem Carbonylsauerstoff von Valin 84 könnte sich ausbilden und ebenfalls stabilisierend wirken

[143]. Mutationsstudien haben auch gezeigt, dass die Glycine zwar eine wichtige Rolle spielen, doch auch durch Aminosäuren wie Alanin und Serin ersetzt werden können, die ebenfalls einen kleinen Rest tragen [144–146].

Auch der ErbB4 Rezeptor aus der Familie der EGF-Rezeptoren dimerisiert mit dem GxxxG Motiv [147]. Im Gegensatz zu GpA ist hier zu erkennen, dass die Glycine der Helices direkt aufeinander liegen und nur Aminosäuren der tieferen bzw. höheren Helix-Ebenen das Dimer stabilisieren (Abbildung 8 B). Daraus ergibt sich ein Sequenzmotiv LxxAGxxGGxxIL.

Trotz der Identifizierung des GxxxG Motivs in manchen Membranproteinen, konnte eine stabile Interaktion nicht bei all diesen Proteinen nachgewiesen werden [148]. Daher scheint das Auftreten dieses Motivs alleine noch kein Beweis für die Wechselwirkung der betroffenen Proteine zu sein. Wahrscheinlich wird die Interaktion erst durch ein Zusammenspiel und die Möglichkeit der dichten Packung aller umliegenden und beteiligten Aminosäurereste stabilisiert [131,149–151].

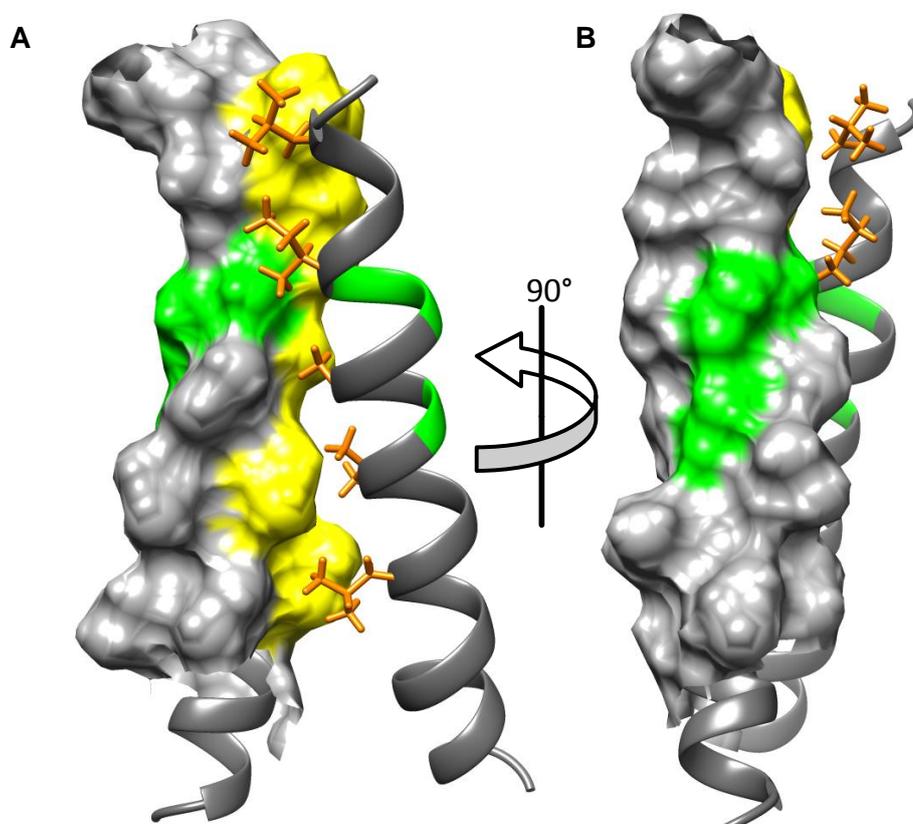


**Abbildung 8:** Dimerisierung der TMDn von GpA (A) und ErbB4 (B). Die vorderen Helices zeigen die Helix-Rückgrate als graue Spirale, mit den an der Interaktion beteiligten Aminosäureresten in Orange und die Position der Glycine in Grün. Die hinteren Moleküle veranschaulichen ihre Oberfläche, mit der Kontaktfläche des Dimers in Gelb und den Glycinen in Grün. Es ist zu erkennen, wie die Glycine von GpA (A), den Valinen der zweiten Helix eine Vertiefung bieten, in die sie sich einlagern können. Die angrenzenden Aminosäuren stabilisieren die Dimere durch zusätzliche Kontakte. Bei ErbB4 (B) liegen die Glycine lateral aufeinander und werden durch Aminosäuren über und unter den Glycinen stabilisiert. (GpA PDB-ID: 2KPF; ErbB4 PDB-ID: 2LCX).

Ein weiteres Interaktionsmotiv, welches auch auf der Stabilisierung durch Van-der-Waals-Kräfte basiert, ist der Leucin-Zipper. Dieses Motiv entdeckte man bei DNA-bindenden, also löslichen Proteinen [152]. Die Aminosäure Leucin trägt einen verzweigten Kohlenwasserstoffrest. Sind mehrere davon in einer  $\alpha$ -Helix übereinander angeordnet, so können sie durch die räumlich komplementäre Form wie Zähne eines Reißverschlusses agieren und so ineinander greifen. Dadurch kann die Interaktion eine sehr dichte Packung erreichen und sich stabilisieren. Bei Membranproteinen findet man sehr ähnliche Interaktionsmotive, die meist linksgängig im Heptadenmotiv interagieren [153].

Der EphA2 Rezeptor gehört zur Familie der Ephrin-Rezeptorthyrosinkinasen und besitzt ein solches, Leucin-Zipper ähnliches Dimerisierungsmotiv [154]. Die Kohlenwasserstoffreste von Valin, Alanin, Leucin und Isoleucin, im Sequenzmotiv LxxIGxxAxxxVxxL der transmembranen Helix, sind dabei so angeordnet, dass sich eine zweite Helix optimal in die Vertiefungen anlagern kann (Abbildung 9).

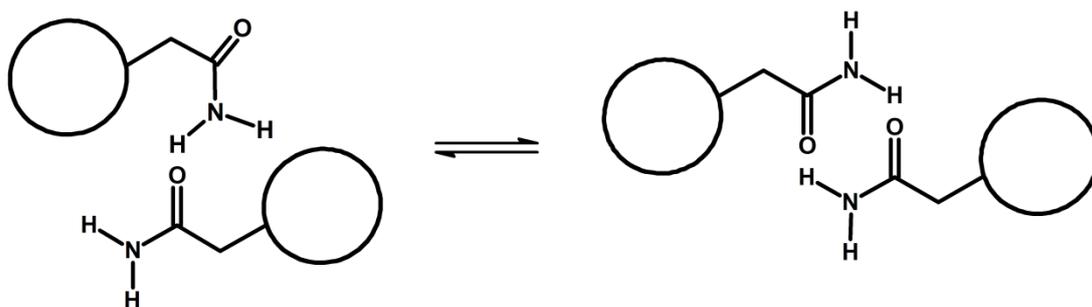
Zusätzlich besitzt die TMD ein potentielles GxxxG Motiv, was darauf hindeutet, dass sie mit zwei verschiedenen Interaktionsmotiven dimerisieren könnte. Diese zwei Konformationen des Dimers könnten den aktiven bzw. inaktiven Zustand des Rezeptors repräsentieren. Die treibende Kraft, die den Wechsel der Zustände induziert, ist bislang noch ungeklärt.



**Abbildung 9:** Dimerisierung der TMDn zweier EphA2 Rezeptormoleküle. **A:** Die Dimerisierung im Leucin-zipper ähnlichen, linksgängigen Heptadenmuster. **B:** Das Dimer ist um  $90^\circ$  gedreht, die grün gefärbten Glycine zeigen ein hypothetisch rechtsgängiges GxxxG-Motiv, mit welchem die Rezeptoren dimerisieren könnten, um so einen aktiven bzw. inaktiven Zustand zu erreichen (PDB-ID:2k9y).

Neben den hier beschriebenen Van-der-Waals-Kräften, können polare und geladene Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung bzw. Assemblierung von TMDn spielen [155]. Die Insertion dieser Aminosäurereste in die Membran ist energetisch ungünstig, da sie ihre Hydrathülle abstreifen müssen. Deshalb muss der Gewinn an freier Energie bei der Membranproteinbiogenese insgesamt überwiegen, sonst ist eine Insertion nicht möglich [121]. Durch die geringe Dielektrizität in einer hydrophoben Membran haben Wechselwirkungen von polaren und geladenen Aminosäuren eine viel höhere Bedeutung als in wässriger Lösung.

Es hat sich gezeigt, dass Aminosäuren mit Carbonsäureamid-Gruppen (Asn, Gln) in der TMD eine Interaktion über Wasserstoffbrücken begünstigen [156]. So konnte bei einer künstlichen Poly-Leuzin TMD festgestellt werden, dass sich bei dem Einbau von Asparagin an bestimmten Stellen, die Oligomerisierung verstärkte [157]. Die Carbonsäureamid-Gruppe könnte dabei gleichermaßen als Donor und Akzeptor der Wasserstoffbrücke fungieren (Abbildung 10). Weiterhin zeigten hydroxylierte Aminosäuren (Thr, Ser, Tyr) in Modell-TMDn einen schwächeren Effekt auf deren Interaktion [158]. Bei natürlichen Membranproteinen zeigt das Dimer der BNIP3-TMD, neben dem GxxxG Motiv, polare Reste in der Kontaktfläche, die zur Stabilisierung des Dimers beitragen [159]. Auch bei der Dimerisierung des Onkoproteins E5 und dessen Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor  $\beta$ , ist ein Glutamin nahe der Helixmitte entscheidend (Abschnitt 1.1.3). Darüber hinaus wird vermutet, dass bei TMDn mit polaren Aminosäuren bis heute unbekannte Mechanismen greifen, die eine unspezifische Interaktion verhindern [160].



**Abbildung 10:** Hypothetisches Interaktionsmodell zweier TMDn (schwarze Kreise) durch laterale Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Carbonsäureamid-Gruppen polarer Aminosäuren. Diese können als Donor oder Akzeptor fungieren (entnommen aus [161]).

Eine weitere Möglichkeit, die Interaktionen über relativ weite Entfernungen zulässt, ist die elektrostatische Wechselwirkung, die von komplementär geladenen Seitenketten der Aminosäuren gebildet werden kann. So postuliert die Arbeitsgruppe von Prof. Ulrich, KIT Karlsruhe, einen aus Salzbrücken aufgebauten „Charge-Zipper“ Mechanismus, bei dem die Interaktion der TMDn auf ionischen Wechselwirkungen basiert. Die ringförmige Assemblierung der

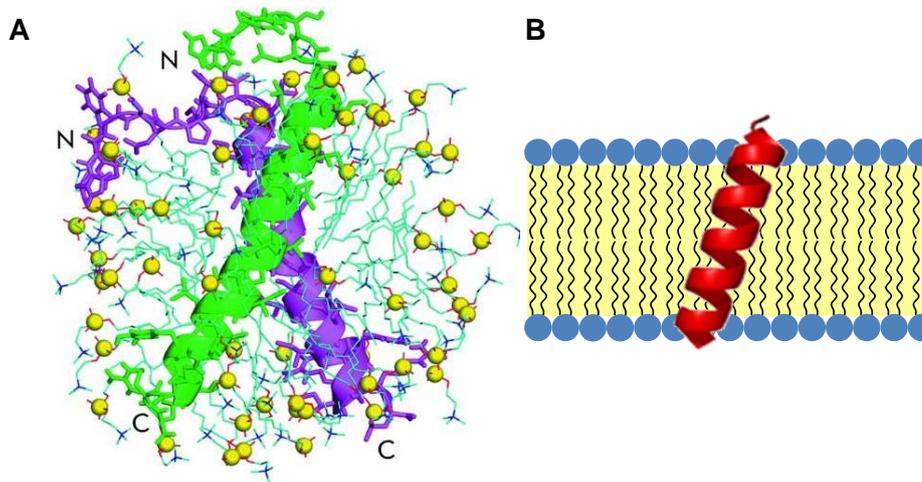
porenbildenden TatA Proteine stabilisieren sich dabei durch inter- und intramolekulare, komplementäre Ladungsmuster innerhalb der Membran [162].

In TMDn können somit Kombinationen aus Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoff- und Salzbrücken genutzt werden, um Interaktionen zu stabilisieren. Zusätzliche, potentielle Interaktionsmotive in TMDn liefern einen Hinweis darauf, dass allosterische Wechselwirkungen in Form von wechselnden Interaktionsmotiven ein natürlicher Mechanismus bei Rezeptoren sein könnte. Neben dem EphA2-Rezeptor, zeigt auch der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor ErbB2 mehrere Interaktionsmotive [154]. Die Besonderheit bei diesem Rezeptor liegt u.a. darin, dass er auch ohne Ligand im dimeren Zustand vorliegt (Abschnitt 1.1.1). So könnte er vermutlich bei der Aktivierung seinen Dimerisierungszustand in ein anderes Motiv ändern [163,164]. Darüber hinaus gibt es bei dieser Rezeptor-Familie Nachweise für eine Heterodimerisierung [165,166]. Die Struktur des Heterodimers von ErbB1 und ErbB2 konnte bestimmt werden, wobei der Vorteil dieser Heterodimerisierung der Rezeptoren in der zusätzlichen Variabilität in Bezug auf die Signalweiterleitung liegen könnte [167]. So könnten die verschiedenen Liganden mit der Förderung der Heterodimerisierung möglicherweise verschiedene Intensitätsstufen der Signale bilden [168].

### 1.2.3 Modellmembransysteme

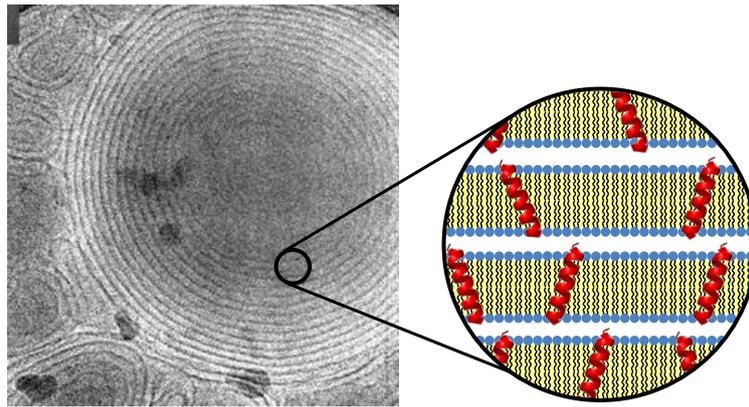
Für die Untersuchung  $\alpha$ -helikaler Membranproteine, müssen die zu untersuchenden TMDn in künstlichen Membransystemen rekonstituiert werden. Diese sollten ihre natürliche Membranumgebung möglichst gut imitieren. Hierbei haben sich, neben organischen Lösungsmitteln, prinzipiell zwei verschiedene Modellmembransysteme etabliert. Zum einen lagern sich Detergenzmoleküle in Wasser spontan zu Mizellen zusammen, welche im Inneren ein hydrophobes Milieu ausbilden und somit hydrophobe Membranproteine aufnehmen können (Abbildung 11). Zum anderen ordnen sich Lipide in Wasser, durch ihren amphipatischen Charakter und getrieben durch den Entropieeffekt, zu geschlossenen Doppelschichten bzw. Vesikel an. Diese Lipiddoppelschichten bilden ein sehr gutes, künstliches Membransystem, worin sich Membranproteine gut rekonstituieren lassen. Wie im Abschnitt 1.2 beschrieben, sind Mizellen ein sehr weiches und flexibles System und schirmen lediglich hydrophobe Bereiche der Proteine vom Wasser ab. Die darin bestimmte Struktur der Proteine muss nicht zwangsläufig ihrer natürlichen Struktur entsprechen. Der Vorteil dieser Systeme liegt in der leichten Handhabung und einfachen Probenpräparation. So lassen sich die Membranproteine mit Detergenzien sehr leicht aus Zellmembranen extrahieren. Zudem gibt es eine große Anzahl an verschiedenen Detergenzien. Lipiddoppelschichten hingegen sind prinzipiell als zweidimensionale, viskose Flüssigkeiten anzusehen und sind deshalb natürlichen Zellmembranen ähnlicher. Sie passen sich in ihren Dicken nur in sehr engem Rahmen den Membranproteinen an. Vielmehr sind die Proteine durch die vertikale Begrenzung des hydro-

phoben Milieus gezwungen, sich an die Struktur und Beschaffenheit der Membran anzupassen. Daher eignen sie sich besser, um die natürliche Struktur der Proteine zu untersuchen (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung zweier Modellmembransysteme. **A:** Mizellen mit rekonstituierten Membranproteinen. Hydrophobe,  $\alpha$ -helikale Membranproteine lassen sich sehr gut mit Detergenzien renaturieren. Dabei wird allerdings kein Konformationszwang auf die Proteine ausgeübt. Proteine mit intrinsischer Affinität zur Dimerisierung werden durch die Mizellen an ihrer Interaktion nicht gehindert (entnommen aus [104]). **B:** Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht mit einer transmembranen  $\alpha$ -Helix (rot). Hierbei ist das hydrophobe Milieu vertikal begrenzt.

Künstlich hergestellten Lipiddoppelschichten gibt es in verschiedenen Ausführungen. Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich um Vesikel mit geschlossenem Membransystem. Wirkt keine äußere Kraft, so ordnen sich Lipide in Wasser spontan zu mehrschichtigen Vesikeln (MLV = Multilamellar Vesicles) an, die 100 nm bis 1000 nm im Durchmesser betragen (Abbildung 12). In der Fluoreszenzspektroskopie ist diese Art von Vesikel weit verbreitet, da sie einfach herzustellen sind. Der Nachteil an diesen Systemen ist die relativ starke Lichtbrechung, sobald die Lipidkonzentration zu hoch wird. Für optische Messmethoden kann dieses Problem gelöst werden, indem die Proben mit starkem Ultraschall behandelt werden. Die Membranen werden dadurch zerrissen und neu geformt. Dabei entstehen hauptsächlich kleine, einschichtige Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm (SUV = Small unilamellar Vesicles). Eine andere Möglichkeit stellt das Extrudieren dar. Hierbei wird eine Lipidlösung mehrmals durch eine Polymermembran mit definierter Porengröße gepresst, wodurch Vesikel mit ca. 100 nm Durchmesser entstehen (LUV = Large unilamellar Vesicles).

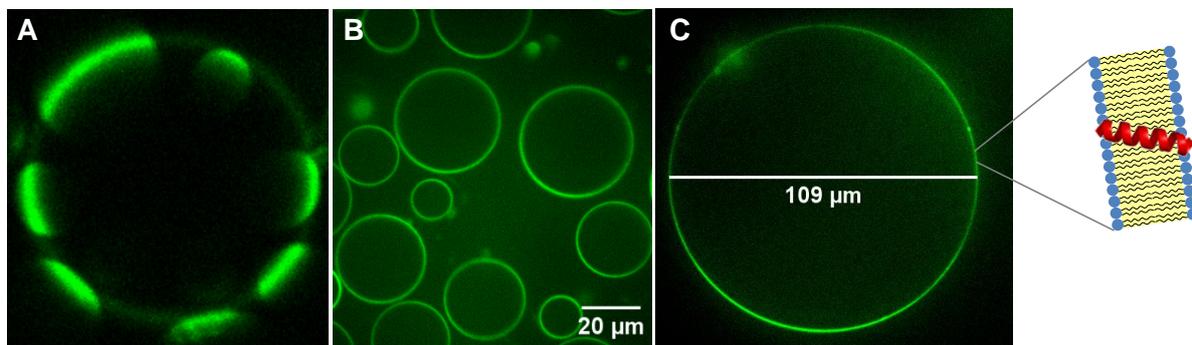


**Abbildung 12:** Multilamellare Vesikel (MLV). Viele Membranschichten sind ineinander verschachtelt. (entnommen aus [169]).

Für einige Bereiche der Fluoreszenzspektroskopie (Abschnitt 1.3.3) werden sehr große, einschichtige Vesikel verwendet. Diese sog. Riesen-Vesikel (GUV = Giant unilamellar Vesicles) können mit bis zu 100 µm die Größe einer eukaryotischen Zelle erreichen und sind gut unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Abbildung 13) [170]. Auch die inneren und äußeren Bedingungen wie Ionenstärke oder pH-Wert können eingestellt werden. Verwendet man für die Herstellung der Riesen-Vesikel einen Mix aus Sphingomyelin (SM), Phosphatidylcholin-Lipide und Cholesterin, so ist unterhalb einer gewissen Temperatur eine Lipidphasen-Separation zu beobachten. Spezielle Farbstoffe wie z.B. 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin (DiI) haben eine hohe Affinität zu der fluiden, Ld (liquid disorder) Phase, die hauptsächlich aus Phosphatidylcholin-Lipiden besteht und eine hohe Fluidität besitzt. Im Fluoreszenzmikroskop sind somit die Phasen unterscheidbar, wobei die Lo (liquid order) Phase, mit einem hohen Anteil an SM und Cholesterin als dunkle Bereiche ungefärbt bleiben (Abbildung 13). Diese Phase ist gekennzeichnet durch eine verringerte Fluidität und einen dickeren hydrophoben Bereich und ist deshalb den sog. „Lipid-Rafts“ eukaryotischer Zellmembranen nachempfunden [171,172].

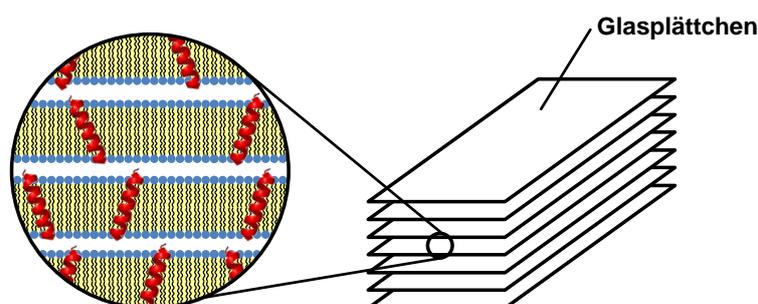
Es treten in mehrphasigen Vesikeln strenggenommen drei Bereiche auf: Die Lo und Ld Phase, sowie die Randbereiche zwischen den Phasen. Jeder dieser Bereiche zeichnet sich durch verschiedene Eigenschaften aus. Dieses Membransystem ermöglicht eine Untersuchung der Affinität von Membranproteinen zu den Lipid-Phasen. Voraussetzung dafür ist die kovalente Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffs an das Protein. Es wurde gezeigt, dass die hydrophobe Länge des Proteins und die Affinität zur Oligomerisierung maßgeblich an der Lokalisation der Proteine in den drei besprochenen Bereichen beteiligt sind [173]. Ein weiterer Vorteil dieser Systeme liegt in der benötigten Proteinkonzentration. Durch die hohe Empfindlichkeit der Fluorophore ist eine Detektion sehr geringer Mengen an Farbstoff möglich, weswegen man ein Protein zu Lipid (P:L) Verhältnis von 1:50000 verwenden kann. Das

hat den Vorteil, dass sich der Platz zwischen den Proteinen vergrößert und sie weniger zur Aggregation neigen.



**Abbildung 13:** Betrachtung der GUV unter dem Fluoreszenzmikroskop. **A:** Vesikel mit Phasenseparation. Darin ist die fluide, Ld (liquid disorder) Phase grün gefärbt. Die „Raft“, Lo (liquid order) Phase ist nicht angefärbt und erscheint so nahezu schwarz. **B, C:** Die durchschnittliche Größe der Vesikel beträgt ca. 30 µm und reicht von 10 µm bei den kleinsten, bis über 100 µm bei den größten.

Alle bisher aufgeführten Lipidsysteme haben gemeinsam, dass die Doppelschichten keine definierte Orientierung besitzen. Für Strukturuntersuchungen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie ist jedoch die Orientierung der Lipiddoppelschichten in Bezug auf das äußere Magnetfeld essentiell. Aus diesem Grund hat sich ein Verfahren etabliert, welches Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen zu orientieren vermag (Abbildung 14) [113]. Dabei werden die Lipide in organischem Lösungsmittel gelöst und auf Glasplättchen aufgetragen. Der daraus entstehende, trockene Lipidfilm auf der Glasoberfläche, entzieht bei hoher Luftfeuchtigkeit der Atmosphäre das Wasser und es bilden sich spontan hydratisierte Lipiddoppelschichten. Die Membrannormale ist dabei senkrecht zur Glasfläche ausgerichtet. Aufgrund dieser Ausrichtung ist es möglich, mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie die Orientierung von rekonstituierten,  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Proteinen zu bestimmen. Um ein ausreichend starkes  $^{15}\text{N}$ -NMR-Signal zu erhalten, sind P:L Verhältnisse von 1:200 bis maximal 1:50 erforderlich. Diese relativ hohe Proteinkonzentration kann die Rekonstitution negativ beeinflussen und somit Clusterung oder Aggregation der Proteine zur Folge haben.



**Abbildung 14:** Orientierte Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen. In einem feuchten Lipidfilm zwischen Glasplättchen ordnen sich Lipiddoppelschichten gleichmäßig an.

## 1.3 Theoretische Grundlagen

### 1.3.1 NMR – Kernmagnetresonanz-Spektroskopie

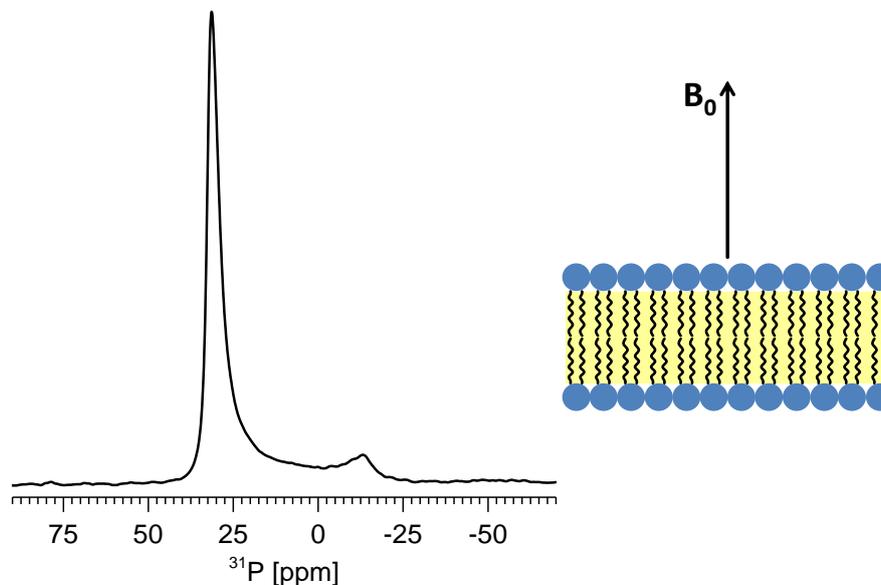
Bei der Strukturuntersuchung von Membranproteinen mittels NMR-Spektroskopie unterscheidet man grundsätzlich zwischen der Flüssigkeits-NMR und Festkörper-NMR. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Festkörper-NMR-Experimente durchgeführt, weswegen nur diese Methodik kurz beschrieben werden soll.

Um Informationen über die Orientierung des Proteins in der Membran zu erhalten, müssen die Membransysteme eine definierte Orientierung zum Magnetfeld besitzen. Das hat zur Folge, dass die Reorientierung der Moleküle deutlich langsamer ist, was sich in der Anisotropie der chemischen Verschiebung und der dipolaren Kopplung der untersuchten  $^{15}\text{N}$ -Atomkerne bemerkbar macht [174]. Es gibt mehrere Möglichkeiten Membranen im Magnetfeld zu orientieren. Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist die mechanische Orientierung der Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen (siehe Abschnitt 1.2.3).

- **$^{31}\text{P}$ -Experimente**

Um die Orientierung und Morphologie von Membranen zu untersuchen, sind  $^{31}\text{P}$  Experimente etabliert. Zum einen ist Phosphor ein natürlicher Bestandteil der Kopfgruppen von Phospholipiden, zum anderen erzeugt der  $^{31}\text{P}$ -Kern durch sein hohes gyromagnetisches Verhältnis ein starkes NMR Signal [175].

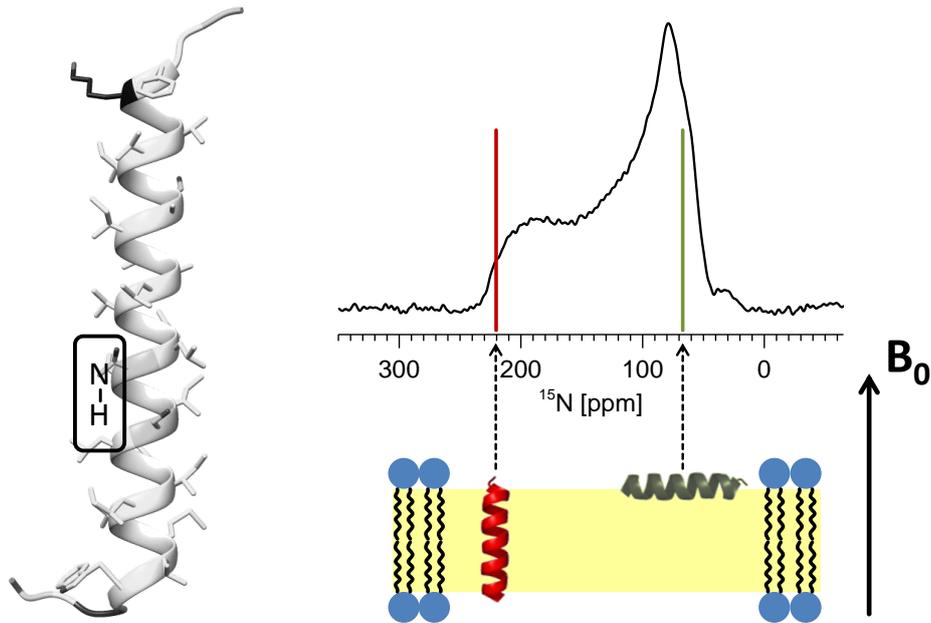
Die Interpretation der Spektren erfolgt anhand der chemischen Verschiebung. Legt man die Achse durch die Lipide von der Kopfgruppe bis zum Ende der Kohlenwasserstoffkette, so erzeugen die Lipide mit  $0^\circ$  Orientierung zum äußeren Magnetfeld  $B_0$  ein Signal bei ca. 30 ppm. Lipide mit der Orientierung von  $90^\circ$  zu  $B_0$  erscheinen im Bereich von -20 ppm. Lipide, die auf und zwischen diesen Orientierungen liegen, können anhand der Signalintensität quantifiziert werden. Abbildung 15 zeigt exemplarisch ein  $^{31}\text{P}$ -Spektrum mechanisch orientierter Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen. Die hohe Signalintensität bei ca. 30 ppm lässt eine Orientierung der Lipide von hauptsächlich  $0^\circ$  erkennen. Liegen die Lipide unorientiert vor, d.h. nehmen sie alle möglichen Orientierungen statistisch verteilt ein, äußert sich das in einem sog. „Pulverspektrum“. Dieses weist eine hohe Signalintensität bei ca. -15 ppm auf. In dem hier abgebildeten Spektrum ist dieser Pulveranteil gering. Gut orientierte Doppelschichten bilden die Grundlage für aussagekräftige  $^{15}\text{N}$ -Experimente der Proteine.



**Abbildung 15:** Mechanisch orientierte Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen. Sie nehmen hauptsächlich eine  $0^\circ$  Orientierung zum externen Magnetfeld  $B_0$  ein. Das sehr kleine Signal bei ca. 15 ppm zeigt einen geringen, unorientierten „Pulver“ Teil der Lipide. Vor und nach jedem  $^{15}\text{N}$ -Experiment wird diese Orientierung kontrolliert.

- **$^{15}\text{N}$  1D-Experimente**

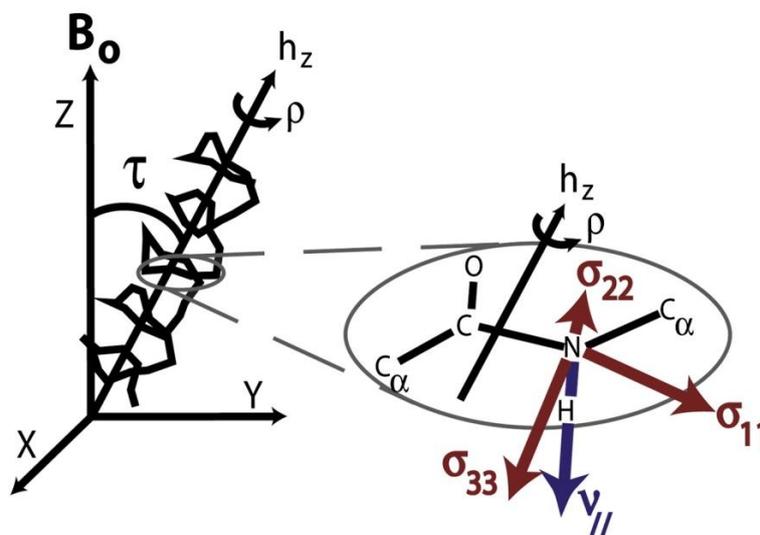
Ist die Orientierung der Lipide bekannt und überprüft, kann man anhand der Orientierungsabhängigkeit der chemischen Verschiebung (Anisotropie), die  $^{15}\text{N}$ -Signale im Spektrum einer Orientierung der  $\alpha$ -Helix in Bezug auf die Membrannormale zuordnen. Aus drei möglichen Orientierungen zum äußeren Magnetfeld  $B_0$  ergeben sich drei Komponenten ( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ ) des CSA-Tensors (**C**hemical **S**hift **A**nisotropy). Das  $\sigma_{33}$  Element, welches die größte chemische Verschiebung hat, ist dabei nahezu parallel zur NH-Bindung im Helix-Rückgrat. Die NH-Bindung wiederum ist, durch die Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Kohlenstoff, parallel zur Helix-Achse ausgerichtet. Dadurch erzeugen transmembran orientierte Proteine hauptsächlich ein Signal im Bereich von 160 – 230 ppm im Spektrum. Bei einer mangelhaften Rekonstitution der Proteine kommt es zu deren Aggregation, dabei sind alle möglichen Orientierungen statistisch verteilt vorhanden, was ein sog. Pulverspektrum zur Folge hat (Abbildung 16). Dieses Pulverspektrum überdeckt das Signal der orientierten Teile der Probe. Eine zuverlässige Aussage über den Neigungswinkel (Tilt) der rekonstituierten Proteine ist demnach nur möglich, wenn hauptsächlich eine einzige Orientierung des Proteins vorliegt. Bei gut rekonstituierten, transmembranen Proteinen kann man anhand der Position und der Breite des Signals durch einen Fit der Daten auf dessen Tiltwinkel  $\tau$  schließen. Weiterhin kann die Dynamik des Systems ebenfalls abgeleitet werden und wird mit dem Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  ausgedrückt. Dieser kann Werte zwischen 0 (mobil) und 1 (immobil) annehmen.



**Abbildung 16:** Erklärung eines Pulverspektrums von  $^{15}\text{N}$ -vollmarkierten Proteinen. Die NH-Bindung ist nahezu parallel zur Helixachse ausgerichtet (links). Durch die statistische Verteilung aller möglichen Orientierungen der Proteine ergibt sich das charakteristische Spektrum (rechts). (Abbildung angelehnt an [175]).

- $^{15}\text{N}$  2D-SAMMY Experimente

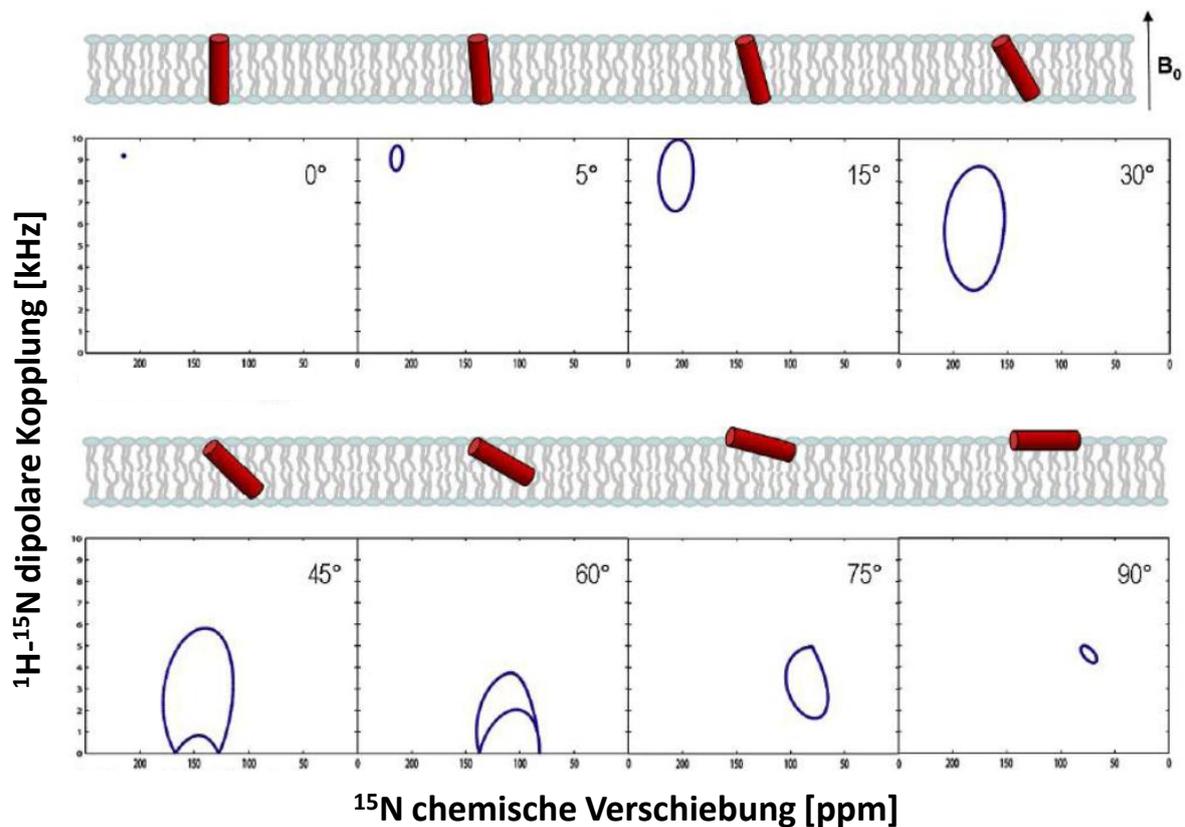
Eine weitere Methode zur Bestimmung der Orientierung einer  $\alpha$ -Helix in der Membran ist das 2D-SAMMY Experiment [176,177]. Dieses gehört zu den SFL-Experimenten (**S**eparated **L**ocal **F**ield), welche die chemischen Verschiebungstensoren ( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ ) mit der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolaren Kopplung in zwei Frequenzdimensionen korrelieren [178]. Die NH-Bindung ist dabei die Hauptachse des Dipoltensors  $v_{||}$ .



**Abbildung 17:** Orientierung der Tensoren der dipolaren Kopplung ( $v_{||}$ , blau) und der chemischen Verschiebung ( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ , rot). Die Orientierung jeder NH-Bindung in Bezug auf  $B_0$  kann bestimmt werden. Daraus lässt sich dann der Tiltwinkel  $\tau$ , sowie der Rotationswinkel  $\rho$  berechnen, da die Membrannormale parallel zu  $B_0$  ist [179].

Für jede  $^{15}\text{N}$ -markierte Aminosäure ergibt sich ein Signal im Spektrum, das in einem charakteristischen, ringförmigen Muster angeordnet ist. Dieser „Ring“ wird auch als „polarity index slant angle“ (PISA)-Wheel bezeichnet (Abbildung 18) [180,181]. Mit einem Fit der Daten ist es möglich, die entstandenen Wheels einem genauen Tiltwinkel  $\tau$  in der Membran zuzuordnen. Ist nur eine Aminosäure im Protein  $^{15}\text{N}$ -markiert, so ist es zusätzlich möglich, den Rotationswinkel  $\rho$  der Helix zu bestimmen.

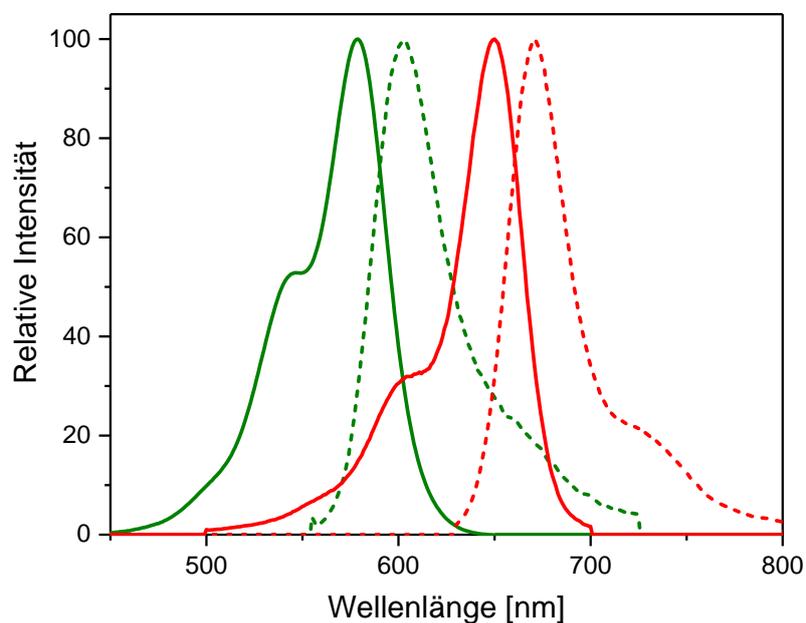
Die Form der PISA-Wheels im Spektrum hängt von verschiedenen Parametern ab. Neben dem Tiltwinkel  $\tau$  spielen die Phi und Psi Winkel im Helix-Rückgrat eine entscheidende Rolle. Sie sind bei einer „perfekten“, transmembranen  $\alpha$ -Helix mit  $\varphi = -60^\circ$  bzw.  $\psi = -45^\circ$  definiert [179]. Schwanken diese Werte, so deformiert sich das PISA-Wheel [179,182]. Bei einer zusätzlichen, schnellen Rotation des Proteins um die Helix-Achse, bewirkt der Parameter  $\rho$  der Azimuthalrotation ein Kollabieren der PISA-Wheel Signale [179].



**Abbildung 18:** Formen der Signale im 2D-Spektrum in Abhängigkeit des Helix-Tiltwinkels. Jedes der acht Spektren zeigt die Verteilung der Signale als Ringstruktur (PISA-Wheels) bei einem bestimmten Tiltwinkel der Helix in der Membran. Diese ist darüber in rot schematisch gezeigt. Parameter wie  $S_{\text{mol}}$ ,  $\rho$  oder Abweichungen bei Phi und Psi verändern die Lage und Form der PISA-Wheels zusätzlich.

### 1.3.2 FRET – Förster-Resonanz-Energie-Transfer

Absorbiert ein Fluorophor elektromagnetische Strahlung, so kann diese Energie auf verschiedene Weisen abgegeben werden. Zum einen kann sie in Form von Wärme oder Fluoreszenz abgegeben werden, zum anderen kann sie auch auf einen zweiten Fluorophor (Akzeptor) übertragen werden. Dieser Vorgang wird als FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) bezeichnet [183]. Voraussetzung für diesen Vorgang ist, dass sich der Akzeptor in räumlicher Nähe des angeregten Fluorophors (Donor) befindet. Eine weitere Voraussetzung ist die Überlappung des Absorptionsspektrums des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Donors (Abbildung 19) [184].



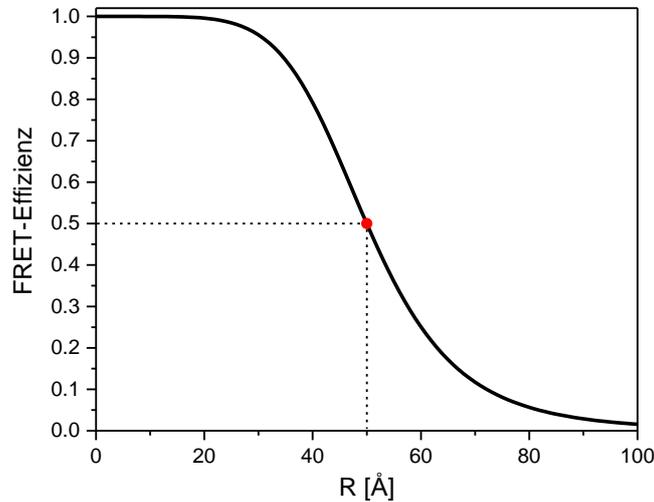
**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der Absorptions- und Emissionsspektren zweier Fluorophore. Das Emissionsspektrum von Fluorophore 1 (Donor, grün gestrichelt) überlappt mit dem Absorptionsspektrum von Fluorophor 2 (Akzeptor, rote Linie). Befinden sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe, wird die vom Donor aufgenommene Energie auf den Akzeptor übertragen und in Form von Fluoreszenz abgegeben (Emission Akzeptor, rot gestrichelte Linie).

Mittels FRET können somit Informationen über den Abstand zweier Fluorophore erhalten werden. Dies kann in der Biologie verwendet werden, um Wechselwirkungen, Bindungsaffinitäten oder auch Faltungsvorgänge von Molekülen zu untersuchen [185,186].

Die Effizienz des Energieübertrags  $E$  vom Donor auf den Akzeptor in Abhängigkeit vom Abstand  $R$  ist durch die Försterbeziehung gegeben:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (1)$$

Hierbei ist  $R_0$  der sog. Försterradius, eine für jedes Donor-/Akzeptorpaar charakteristische Größe, die im Bereich von 10 – 80 Å liegt. In Abbildung 20 ist die Försterbeziehung  $E(R)$  mit einem Försterradius von  $R_0 = 50$  Å exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 20:** Abhängigkeit des Abstands  $R$  der Fluorophore von der FRET-Effizienz. Der Försterradius  $R_0$  (roter Punkt) ist hier exemplarisch 50 Å und entspricht dem Abstand  $R$  bei einem Energieübertrag von 0,5.

$R_0$  kann bei Kenntnis der spektralen Parameter von Donor und Akzeptor berechnet werden:

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9(\ln 10)\kappa^2\Phi_D}{128\pi^5N_A n^4} J} \quad (2)$$

$\kappa^2$ : Orientierungsfaktor (= 2/3 für die isotrope Orientierung)

$\Phi_D$ : Quantenausbeute des Donors

$N_A$ : Avogadrokonstante

$n$ : Brechungsindex des Lösungsmittel

$J$ : Überlappungsintegral

Das Überlappungsintegral  $J$  ist definiert:

$$J = \int I_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (3)$$

$I_D$ : normierte Fluoreszenzintensität des Donors

$\varepsilon_A$ : Extinktion des Akzeptors

$\lambda$ : Wellenlänge

Darüber hinaus kann durch FRET Experimente die Stöchiometrie von Membranproteinen bestimmt werden [187,188]. Der in dieser Arbeit angewandte Formalismus hierzu soll nun

exemplarisch am Beispiel einer Homointeraktion eines  $\alpha$ -helikalen Membranproteins dargestellt werden, basierend auf Arbeiten von Adair und Engelman [188].

Folgende Annahmen liegen der Ableitung zugrunde:

- An das Protein ist kovalent ein Donor bzw. ein Akzeptor gekoppelt.
- Beide Farbstoffe haben keinen Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten.
- Alle Wechselwirkungen sind zufälliger Natur.
- Alle Proteine oligomerisieren.

Das Grundprinzip des Assays ist die partielle Abnahme der Fluoreszenzintensität des Donors (Fluoreszenzlöschung, engl. Quenching) durch Energieübertragung an den Akzeptor, die, wie nachfolgend gezeigt, in charakteristischer Weise vom Oligomerisierungszustand abhängig ist.

Die Fluoreszenzintensität des Donors  $I_D$  bzw. des gequenchten Donors  $I_{Dq}$  ist das Produkt aus Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_D$  bzw.  $\varepsilon_{Dq}$  und der Anregungswellenlänge  $\lambda_D^{ex}$ .

$$I_D = \varepsilon_D(\lambda_D^{ex}) \quad (4)$$

$$I_{Dq} = \varepsilon_{Dq}(\lambda_D^{ex}) \quad (5)$$

Für die Fluoreszenzintensitäten gelten ebenfalls:

$$I_D = f_D N_D \quad (6)$$

$$I_{Dq} = f_D(N_D - N_{Dq}) + f_{Dq}N_{Dq} \quad (7)$$

$f_D$ : molare Fluoreszenz des Donors

$f_{Dq}$ : molare Fluoreszenz des gequenchten Donors

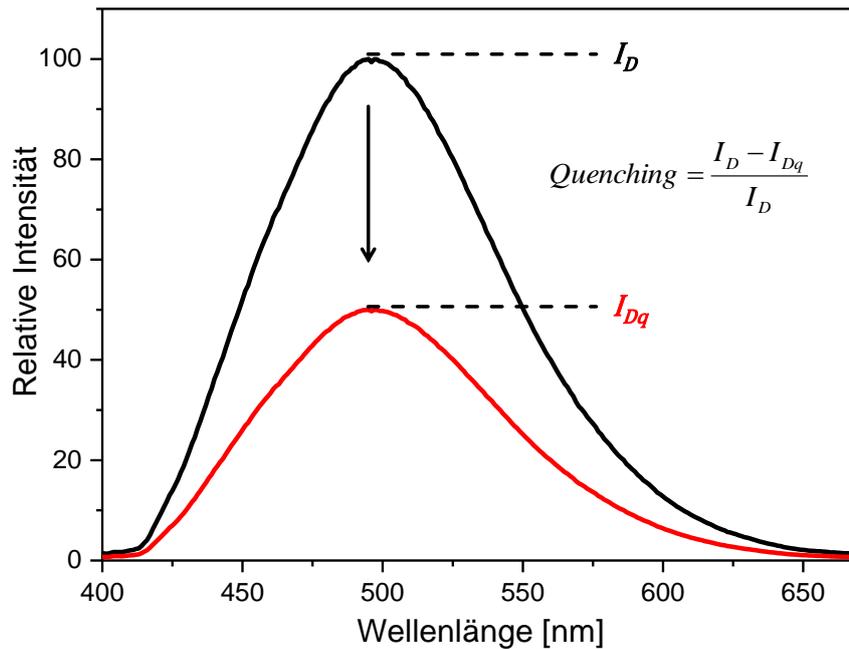
$N_D$ : Stoffmenge des gesamten Donors

$N_{Dq}$ : Stoffmenge des gequenchten Donors

Das Donor-Quenching ist definiert als:

$$E_{Quench} = \frac{I_D - I_{Dq}}{I_D} = 1 - \frac{I_{Dq}}{I_D} \quad (8)$$

und ist in Abbildung 21 schematisch dargestellt.



**Abbildung 21:** Donor-Quenching. Die Intensität  $I_D$  des Donors (schwarze Linie) wird durch Energieübertrag auf den Akzeptor um einen bestimmten Betrag abgeschwächt ( $I_{Dq}$ , Intensität des gequenchten Donors, rote Linie).

Fügt man die Gleichungen (6) und (7) in Gleichung (8), so ergibt sich:

$$E_{Quench} = 1 - \frac{f_D(N_D - N_{Dq}) + f_{Dq}N_{Dq}}{f_D N_D} = \left(1 - \frac{f_{Dq}}{f_D}\right) \frac{N_{Dq}}{N_D} \quad (9)$$

und man erhält:

$$E_{Quench} = E * \frac{N_{Dq}}{N_D} \quad (10)$$

Das Donor-Quenching ist also abhängig von der FRET-Effizienz  $E$  und der Anzahl an gequenchten Donoren. Die Anzahl an gequenchter Donoren ergibt sich aus der Binomialverteilung:

$$N_{Dq} = N_T \sum_{k=1}^{n-1} k \binom{n}{k} x_D^k x_A^{n-k} \quad (11)$$

$N_T$ : Anzahl an Oligomeren

$k$ : Anzahl der Donoren im Oligomer

$n$ : Anzahl der Untereinheiten im Oligomer

$x_D$ : Molenbruch Donor

$x_A$ : Molenbruch Akzeptor

Für die Anzahl der gesamten Donoren  $N_D$  gilt:

$$N_D = N_T n x_D \quad (12)$$

Drückt man die Gesamtdonorzahl mit der Binomialverteilung aus, so kann Gleichung (11) um die Anzahl an Oligomeren ohne Akzeptor erweitert werden ( $k = n$ ):

$$N_D = N_T \sum_{k=1}^n k \binom{n}{k} x_D^k x_A^{n-k} \quad (13)$$

Separiert man den letzten Term ( $k = n$ ) und setzt es gleich mit Gleichung (12) erhält man:

$$N_D = \left( N_T \sum_{k=1}^{n-1} k \binom{n}{k} x_D^k x_A^{n-k} \right) + N_T n x_D^n = N_T n x_D \quad (14)$$

Stellt man die Gleichung (11) um, so erhält man die Anzahl gequenchter Donoren:

$$N_{Dq} = N_T \sum_{k=1}^{n-1} k \binom{n}{k} x_D^k x_A^{n-k} = N_T n x_D - N_T n x_D^n \quad (15)$$

Setzt man nun Gleichung (12) und Gleichung (15) in Gleichung (10), so erhält man das Donor-Quenching in Abhängigkeit des Molenbruchs  $x_D$  und des Oligomerisierungszustands  $n$ :

$$E_{Quench} = E * \frac{N_T n x_D - N_T n x_D^n}{N_T n x_D} \quad (16)$$

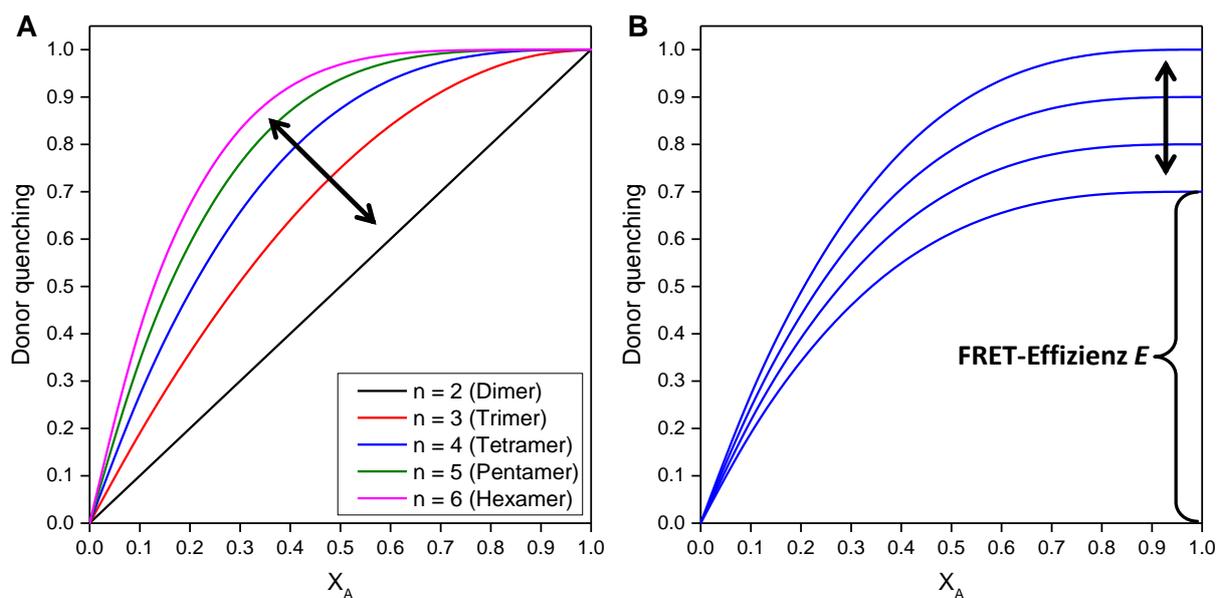
bzw.:

$$E_{Quench}(n, x_D) = E * (1 - x_D^{n-1}) \quad (17)$$

oder mit  $x_D = 1 - x_A$ :

$$E_{Quench}(n, x_A) = E * (1 - (1 - x_A)^{n-1}) \quad (18)$$

Berechnet man nach Gleichung (18) das Donor-Quenching in Abhängigkeit vom Akzeptormolenbruch  $x_A$  für verschiedene Oligomerisierungszustände, so erhält man die in Abbildung 22 dargestellten Kurvenverläufe. Für ein Dimer ( $n = 2$ ) erhält man somit eine Gerade. Die Effizienz des Übertrags  $E$  aus der Gleichung (1), die aus dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor berechnet werden kann, erhält man aus der Extrapolation für  $x_A \rightarrow 1$ .

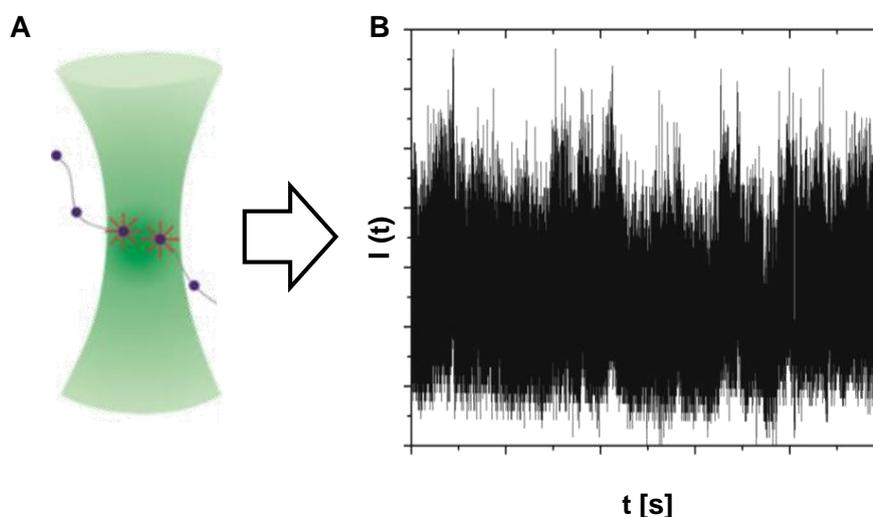


**Abbildung 22:** Donor-Quenching in Abhängigkeit des Molenbruchs  $x_A$ . **A:** Mit steigendem Oligomerisierungszustand  $n$  krümmt sich die Kurvenschar nach links oben. **B:** Nimmt der Abstand zwischen Donor und Akzeptor zu, so äußert sich das in einem geringeren Energieübertrag bzw. geringerer FRET-Effizienz  $E$ . Dies ist exemplarisch für ein Tetramer ( $n = 4$ ) dargestellt.

Die hier gezeigte Herleitung setzt voraus, dass bei Oligomeren mit nur einem Donor und mehreren Akzeptoren, nur ein Akzeptor die Energie des Donors aufnimmt und die anderen Akzeptoren diesen Vorgang nicht stören. Im umgekehrten Fall, in einem Oligomer aus vielen Donoren und nur einem Akzeptor, erfolgt die Anregung der Donoren zeitlich versetzt, sodass es für die Fluoreszenzlöschung unerheblich ist, wie viele Donoren sich in der Nachbarschaft aufhalten.

### 1.3.3 FCS – Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

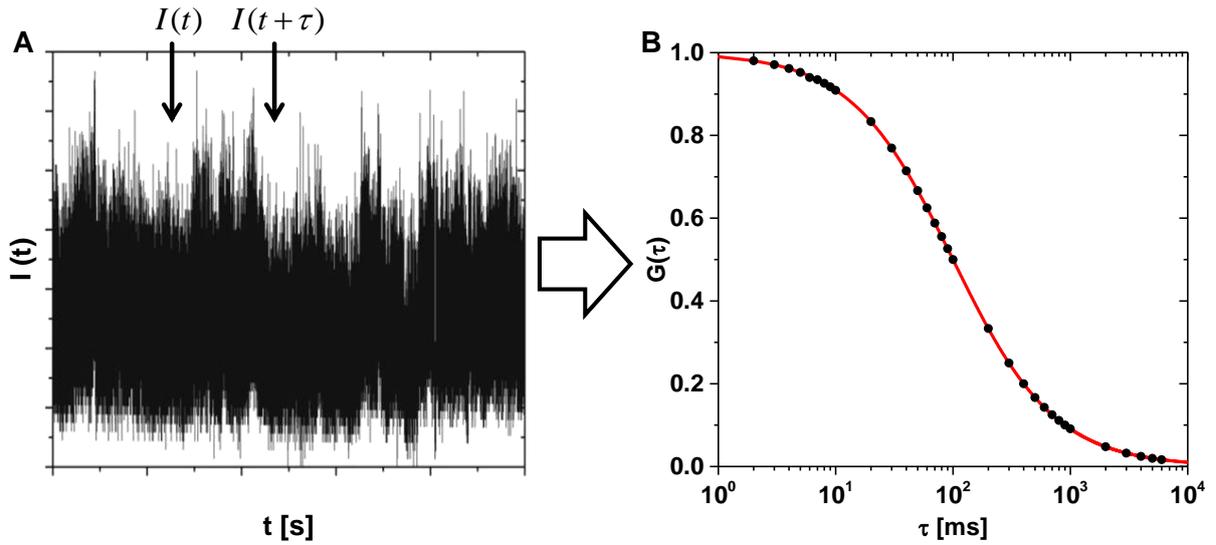
Mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. fluorescence correlation spectroscopy, FCS) lassen sich Dynamiken von lichtempfindlichen Molekülen *in vivo* oder *in vitro* zeitlich und örtlich hochauflösend darstellen [189]. Grundlage dafür ist ein definiertes Detektionsvolumen (Fokus). Diffundieren die fluoreszierenden Teilchen durch dieses Volumen, so kann die daraus resultierende Schwankung der Fluoreszenzintensität detektiert und als Funktion der Zeit verfolgt werden (Abbildung 23). Diese temporären Intensitätsfluktuationen geben Aufschluss über den Diffusionskoeffizienten und die Teilchenkonzentration.



**Abbildung 23:** Erzeugung der Intensitätsfluktuationsfunktion. **A:** Lichtempfindliche Moleküle diffundieren zufällig durch das Detektionsvolumen und erzeugen dabei Intensitätsschwankungen. **B:** Diese Fluktuation der Lichtintensität kann als Funktion der Zeit dargestellt werden.

Bei der statistischen Auswertung des Intensitätssignals wird die Intensität zum Zeitpunkt  $t$  mit der Intensität zum Zeitpunkt  $t + \tau$  korreliert.  $\tau$  ist dabei die Verzögerungszeit (Abbildung 24). Aus der Abhängigkeit der Intensitäten von verschiedenen Verzögerungszeiten  $\tau$  ergibt sich die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$ . Die Korrelation von zwei Variablen wird allgemein durch den Korrelationskoeffizient ausgedrückt. Im Falle der FCS sind diese Variablen zeitabhängige Intensitätsschwankungen  $\delta I(t)$  und  $\delta I(t + \tau)$  der Intensitätsfunktion  $I(t) = \delta I(t) + \langle I(t) \rangle$ . Die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  für die Verzögerungszeiten  $\tau$  ist deshalb definiert als [190]:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (19)$$



**Abbildung 24:** Berechnung der Autokorrelationsfunktion. **A:** Das Intensitätssignal wird mit einer Verzögerungszeit  $\tau$  mit sich selbst korreliert. **B:** Aus der Korrelation der Intensitäten mit verschiedenen Verzögerungszeiten ergibt sich die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$ . Je größer  $\tau$  ist, desto unwahrscheinlicher korrelieren die Intensitätssignale.

Für  $G(\tau = 0)$  ergibt sich die maximale Korrelation, welche ein Maß für die mittlere Teilchenzahl  $\langle N \rangle$  im Detektionsvolumen ist. Dabei ist:

$$\langle N \rangle = \langle C \rangle V_{eff} \quad (20)$$

Mit:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_0^2 z_0 \quad (21)$$

$\langle C \rangle$  ist die mittlere Konzentration der Fluorophore und  $V_{eff}$  die effektive Größe des Detektionsvolumens. Dieses wird mit guter Näherung als dreidimensionales Gaussvolumen beschrieben. Die laterale und axiale Ausdehnung  $\omega_0$  bzw.  $z_0$  sind definiert als die Entfernungen vom Mittelpunkt bis  $1/e^2$  der Gaussfunktion. Die mittlere Verweildauer  $\tau_d$  der Moleküle im Detektionsvolumen beeinflusst den zeitlichen Abfall von  $G(\tau)$  (Abbildung 25) und hängt vom Diffusionskoeffizient  $D$  ab:

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (22)$$

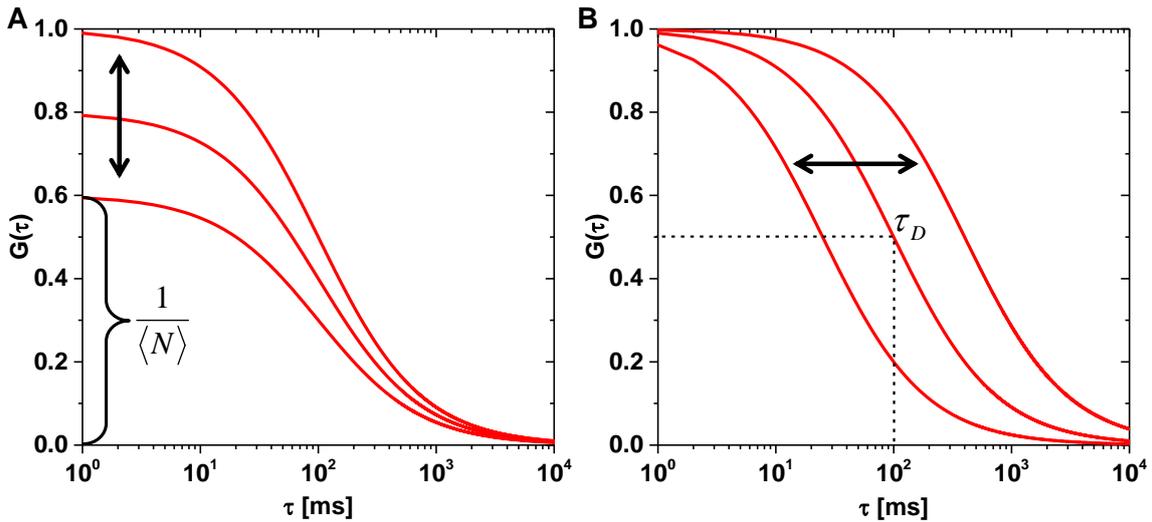
Die Autokorrelationsfunktion von einer freien, dreidimensionalen Diffusion der Moleküle durch ein Gaussvolumen kann zusammengefasst werden:

$$G_{3D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2}\right)^{-1/2} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2}\right)^{-1/2} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}\right)^{-1/2} \quad (23)$$

bzw. mit Gleichung (22):

$$G_{3D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad (24)$$

Dabei ist  $S = z_0/\omega_0$  und beschreibt die Elliptizität des Detektionsbereichs.



**Abbildung 25:** Einfluss der Parameter auf die Form der Autokorrelationsfunktion. **A:** Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  zum Zeitpunkt  $G(\tau = 0)$  ist von der mittleren Teilchenanzahl  $\langle N \rangle$  im Detektionsvolumen abhängig. **B:** Die horizontale Lage der Funktion ist von der mittleren Verweildauer  $\tau_D$  der Moleküle im Detektionsvolumen abhängig.

Gleichung (24) gibt jedoch nur das Verhältnis zwischen  $\omega_0$  bzw.  $z_0$  und dem Diffusionskoeffizient  $D$  an. Zur Ermittlung der einzelnen Werte müssen i.d.R. Referenzmessungen durchgeführt werden. Dies kann vermieden werden, indem ein zusätzlicher Fokus eingesetzt wird. Diese Methode der Zwei-Fokus-Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (engl. tf-FCCS) erlaubt es, Diffusionskoeffizienten und Konzentrationen an einer Probe unmittelbar zu bestimmen [191]. Dabei werden die Foki mit einem definierten Abstand  $d$  zueinander positioniert. Die erhaltenen Intensitätsfunktionen der beiden Foki  $I_1(t)$ ,  $\delta I_1(t)$  und  $I_2(t)$ ,  $\delta I_2(t)$  können miteinander kreuzkorreliert werden:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I_1(t) \delta I_2(t + \tau) \rangle}{\langle I_1(t) \rangle \langle I_2(t) \rangle} \quad (25)$$

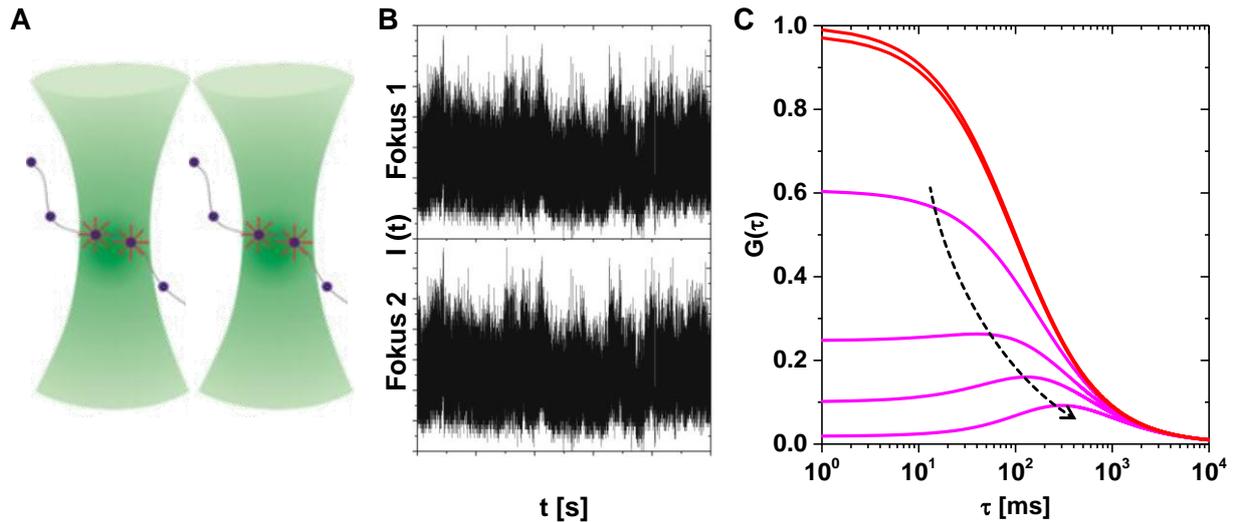
Dabei ergibt sich ein zusätzlicher Term für Gleichung (23):

$$G_{2f-3D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} \exp\left( -\frac{d^2}{\omega_0^2 + 4D\tau} \right) \quad (26)$$

bzw.:

$$G_{2f-3D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2} \exp\left( -\frac{d_r^2}{1 + \tau/\tau_D} \right) \quad (27)$$

Mit  $d_r = d/\omega_0$  als Abstand der Foki in der Einheit des Radius des Detektionsvolumens.



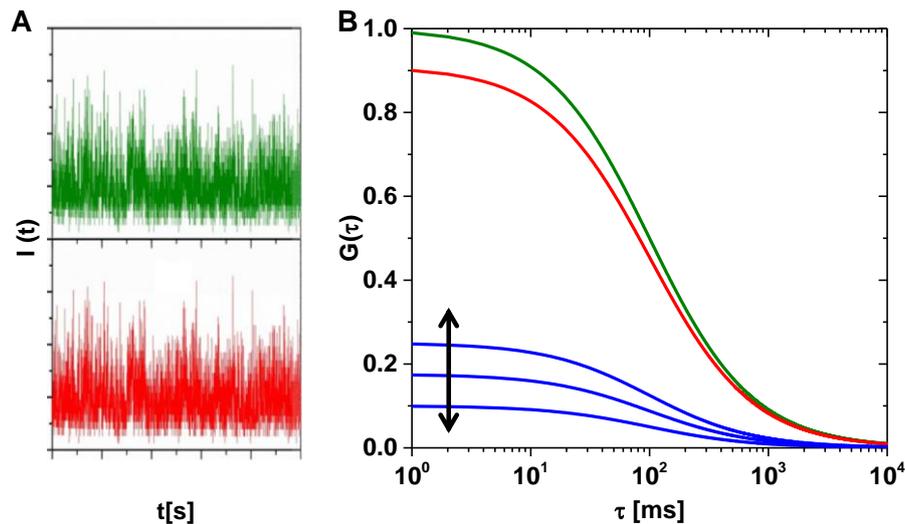
**Abbildung 26:** Prinzip der Zwei-Fokus-FCS. **A:** Zwei Foki werden mit einem definierten Abstand  $d$  zueinander positioniert. **B:** Mit jedem Fokus kann eine Intensitätsfluktuationsfunktion ermittelt werden. **C:** Die Autokorrelationsfunktionen der einzelnen Foki sind rot dargestellt. Die Lage der Zwei-Fokus-Kreuzkorrelationsfunktion (magenta) ist abhängig vom Abstand  $d$  der Foki. Für größere Werte von  $d$  verschiebt sich der Kurvenverlauf nach unten.

Neben der Messung der Diffusionskoeffizienten und Konzentrationen von fluoreszierenden Molekülen, ist es möglich mittels der Zwei-Farben-Fluoreszenzkorrelationspektroskopie bimolekulare Wechselwirkungen wie z.B. Bindungsaffinitäten von Molekülen zu untersuchen [192]. Dafür müssen die zu untersuchenden Moleküle mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren markiert vorliegen. Die Anregung der beiden Fluorophore mit einem Laser unterschiedlicher Wellenlänge erfolgt alternierend, wobei beide Moleküle charakteristische Intensitätsfluktuationsfunktionen erzeugen. Diese werden in getrennten Kanälen gespeichert und zur Auswertung miteinander korreliert.

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{\langle \delta I_a(t) \delta I_b(t + \tau) \rangle}{\langle I_a(t) \rangle \langle I_b(t) \rangle} \quad (28)$$

Mit  $a$  für Farbe 1 und  $b$  für Farbe 2.

Besteht zwischen den Molekülen eine Bindungsaffinität, wie z.B. zwischen DNA und DNA-Bindeproteinen, so diffundieren sie gemeinsam durch die Lösung. Die Quantifizierung der Bindungsaffinität erfolgt über die Höhe der Amplitude der Zwei-Farben-Korrelationsfunktion (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Prinzip der Zwei-Farben-FCS Methode. Sie bietet die Möglichkeit, Affinitäten von bimolekularen Systemen zu quantifizieren. **A:** Die Intensitätsfluktuationen der beiden Farbkanäle, hier exemplarisch in Rot und in Grün. **B:** Die Autokorrelationskurven (rote und grüne Linie) der beiden Farbkanäle geben die Information über die Diffusionskoeffizienten und mittlere Teilchenzahl der beiden Farbstoffe. Werden die Intensitäten der beiden Kanäle miteinander korreliert, so ergibt sich die Zwei-Farben-Kreuzkorrelationsfunktion (blaue Linie). Die Höhe der Amplitude gibt den Grad der Bindung der farbstoffgekoppelten Moleküle an.

In diesem Fall muss berücksichtigt werden, dass die beiden Kanäle der Farbstoffe durch die verschiedenen Wellenlängen unterschiedliche, effektive Größen der Foki besitzen. Die effektive Größe des Detektionsvolumens aus Gleichung (21) muss angepasst werden und ist:

$$V_{2f-eff} = \pi^{3/2} \omega_{eff}^2 z_{eff} \quad (29)$$

mit:

$$\omega_{eff} = \sqrt{\frac{(\omega_a^2 + \omega_b^2)}{2}} \quad (30)$$

$$z_{eff} = \sqrt{\frac{(z_a^2 + z_b^2)}{2}} \quad (31)$$

Die Zwei-Farben-Kreuzkorrelationsfunktion  $G_{a,b}(\tau)$  der beiden Farbstoffe a und b ist somit definiert als:

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{4D\tau}{\omega_{eff}^2} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{4D\tau}{z_{eff}^2} \right)^{-1/2} \quad (32)$$

bzw. mit  $\tau_D = \omega_{eff}^2/4D$ :

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D} \right)^{-1/2} \quad (33)$$

Um die Affinität der Bindungseinheiten zueinander charakterisieren zu können, eignet sich der Dissoziationskoeffizient  $K_d$ . Er ist definiert:

$$K_d = \frac{C_a C_b}{C_{ab}} \quad (34)$$

Er gibt Information darüber, auf welcher Seite sich das Gleichgewicht der Bindungsreaktion befindet:

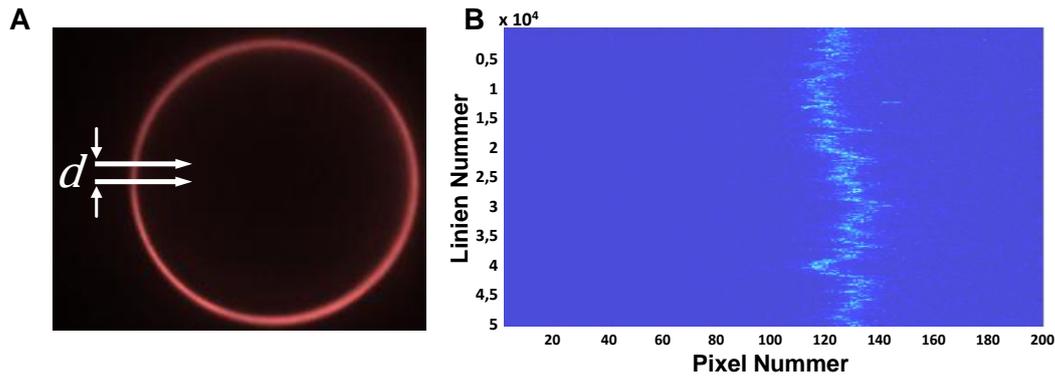


und verhält sich umgekehrt proportional zur Affinität der Bindungspartner.

Die hier vorgestellten Methoden sind jedoch nur auf lösliche Moleküle anwendbar. Prinzipiell können Zellmembranen bzw. künstliche Vesikelmembranen als zweidimensionale Flüssigkeiten betrachtet werden, weswegen FCS im Grunde auch auf farbstoffgekoppelte Membranproteine oder Lipide angewandt werden kann [193–195]. Die technische Umsetzung ist hierbei deutlich aufwendiger, da sich die Membran, durch ihre Dynamik aus dem statischen Fokus bewegen würde. Die Immobilisierung der Membran hätte den Nachteil, dass die Fluorophore ggf. bleichen würden, da sie sich, aufgrund der langsameren Diffusion in Membranen, deutlich länger im Fokus aufhalten würden.

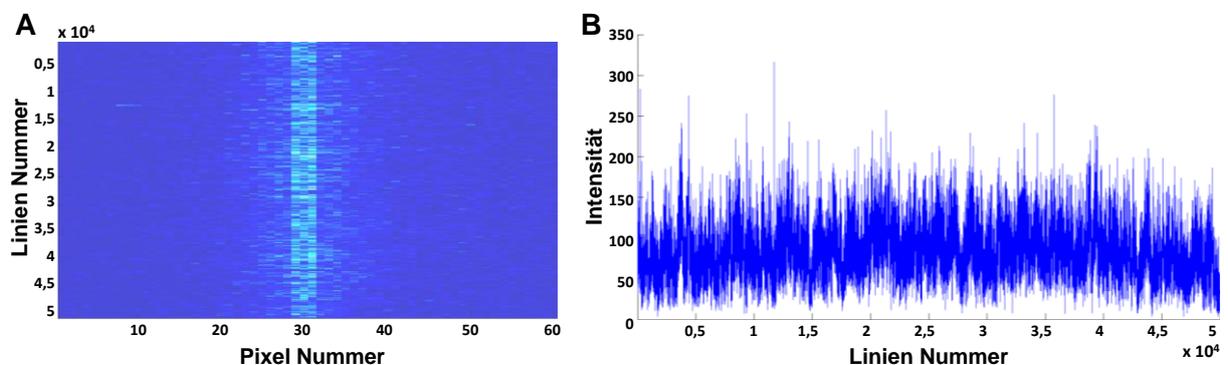
Die Methodik der Linien-Raster-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*engl. line-scanning FCS, lsFCS*) löst dieses Problem, indem der Fokus während der Detektionszeit entlang einer Linie mit definierter Länge (ca. 10  $\mu\text{m}$ ) bewegt wird [196]. Als Membransystem kommen hier Riesen-Vesikel zum Einsatz, da sie unilamellar sind und eine relativ kleine Krümmung der Membran besitzen. Die Raster-Linie des Fokus wird dabei so positioniert, dass sie entlang der Membrannormalen durch die Membran ins Innere des Vesikels verläuft (Abbildung 28 A). Wird innerhalb dieser Strecke die Fluoreszenzintensität eines Kanals aufgezeichnet, so befindet sich die Membran, trotz kleiner Bewegungen, innerhalb dieser Raster-Linie. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, die Zwei-Fokus-FCS Methode zu implementieren. Dabei wird eine zweite, parallele Raster-Linie mit dem Abstand  $d$  positioniert. Die Detektion entlang der Linien erfolgt hierbei alternierend.

Der Linien-Raster-Vorgang wird bei einem Messvorgang ausreichend oft wiederholt, um statistisch signifikante Daten zu erhalten. Bei der Auswertung der Daten wird jede Linie in Pixeln unterteilt, wobei jeder Pixel eine definierte zeitliche Verweildauer des Fokus besitzt. Alle Linien werden nachfolgend untereinander gesetzt. Daraus entsteht ein Diagramm, bei welchem die Ordinate die Linien-Nummer zeigt und die Abszisse die Pixel-Nummer angibt (Abbildung 28 B).



**Abbildung 28:** Prinzip der Linien-Raster-FCS. **A:** Der Fokus rastert bei einem Messvorgang eine definierte Strecke ab (weiße waagrechte Pfeile), wobei diese in Pixel mit definierter Fokus-Verweildauer eingeteilt wird. Innerhalb dieser Linie befindet sich die Membran (roter Kreis). Dabei kann auch das Prinzip der Zwei-Fokus-FCS angewendet werden, indem der Fokus alternierend zwei definierte, parallele Linien rastert, die im Abstand  $d$  positioniert sind. **B:** Alle detektierten Linien werden untereinander gesetzt, mit der Linien-Nummer als Ordinate und der Pixel-Nummer als Abszisse. Dabei ist an der Signalintensität jeder Linie zu erkennen, wann der Fokus über die Membran gefahren ist. Ebenfalls ist zu erkennen, wie sich die Position der Membran während des Messvorgangs verändert hat.

Um die Bewegung der Membran auszugleichen wird die genaue Position der Membran anhand der Intensitätsspitzen in den Linien identifiziert und untereinander positioniert (Abbildung 29 A). Aus diesem Intensitätsmaximum jeder Linie kann nun die Berechnung der Intensitätsfluktationsfunktion  $I(t)$  erfolgen (Abbildung 29 B).



**Abbildung 29:** Ermittlung der Intensitätsfluktationsfunktion  $I(t)$ . **A:** Die gemessenen Intensitätsmaxima jeder Linie aus dem Linien-Raster-Bild (Abbildung 28 B) werden vertikal ausgerichtet. **B:** Das Intensitätsmaximum aus jeder Linie wird für die Berechnung der Intensitätsfluktationsfunktion  $I(t)$  herangezogen.

Die statistische Auswertung mittels der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  erfolgt analog der Gleichung (19). Ein Unterschied zwischen IsFCS an Membranen und statischem FCS in Lösung liegt in der unterschiedlichen Dimension der Bewegung der Moleküle. In einer Membran findet lediglich eine zweidimensionale Diffusion statt, dies ist bei der mathematischen Auswertung zu berücksichtigen. Aus Gleichung (23) ergibt sich ein Modell für die zweidimensionale Diffusion:

$$G_{2D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2} \right)^{-1/2} \left( 1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} \quad (36)$$

bzw.:

$$G_{2D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2\tau_D} \right)^{-1/2} \quad (37)$$

Das effektive Detektionsvolumen lässt sich aus Gleichung (21) ableiten:

$$V_{eff2D} = \pi\omega_0 z_0 \quad (38)$$

Kombiniert man alle hier beschriebenen Techniken, Zwei-Farben-, Zwei-Fokus-, Linien-Raster-FCS (engl. dual-color dual-focus line-scanning FCS, 2c2f lsFCS), so ist man in der Lage, neben den Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten von Lipiden und Membranproteinen, auch bimolekulare Wechselwirkungen in der Membran zu untersuchen. Die Korrelation und Dynamik einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung oder Helix-Helix-Wechselwirkungen integraler Membranproteine werden damit zugänglich gemacht. Dabei entstehen vier verschiedene Intensitätsfluktuationfunktionen, da zwei Foki und zwei Detektionswellenlängen zum Einsatz kommen. Die minimale Verzögerungszeit  $\tau_{min}$  ist dabei durch die Linienzeit  $t_{Linie}$  limitiert, die der Fokus für die Detektion einer Linie benötigt. Aufgrund der deutlich langsameren Diffusionszeiten der Moleküle in einer Membran, können dennoch aussagekräftige Autokorrelationsfunktionen erhalten werden. Für das mathematische Modell der Auto- und Kreuzkorrelationen werden die Ansätze jeder einzelnen Technik kombiniert. So können sechs verschiedene Korrelationen bestimmt werden:

- Die Autokorrelationen der beiden Kanäle eines Fokus: Gleichung (36), (37).
- Die Kreuzkorrelationen aus zwei Foki eines Kanals: Gleichung (26) für zwei Dimensionen:

$$G_{2f-2D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2} \right)^{-1/2} \left( 1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} \exp\left(-\frac{d^2}{\omega_0^2 + 4D\tau}\right) \quad (39)$$

bzw.:

$$G_{2f-2D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2\tau_D} \right)^{-1/2} \exp\left(-\frac{d_r^2}{1 + \tau/\tau_D}\right) \quad (40)$$

- Die zwei-Farben-Kreuzkorrelation eines Fokus: Gleichung (32) für zwei Dimensionen:

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{4D\tau}{\omega_{eff}^2} \right)^{-1/2} \left( 1 + \frac{4D\tau}{z_{eff}^2} \right)^{-1/2} \quad (41)$$

bzw.:

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \quad (42)$$

Dabei wird das effektive Detektionsvolumen aus Gleichung (29) angepasst:

$$V_{2f-eff2D} = \pi \omega_{eff} Z_{eff} \quad (43)$$

Die mittlere Teilchenzahl ist hier gegeben mit  $\langle N \rangle = \langle C_x \rangle V_{2f-eff2D}$ , wobei  $\langle C_x \rangle$  die mittlere Komplexkonzentration ist.

- Die zwei-Farben-zwei-Fokus-Kreuzkorrelation: Gleichung (41) wird durch den Exponentialterm erweitert:

$$G_{2c2f-ls}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_{eff}^2}\right)^{-1/2} \left(1 + \frac{4D\tau}{Z_{eff}^2}\right)^{-1/2} \exp\left(-\frac{d^2}{\omega_{eff}^2 + 4D\tau}\right) \quad (44)$$

bzw.:

$$G_{2c2f-ls}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-1/2} \exp\left(-\frac{d_r^2}{1 + \tau/\tau_D}\right) \quad (45)$$

Mit diesen Gleichungen kann ein Modell für das zu untersuchende System erstellt und die Daten somit global gefittet werden. Als Resultat erhält man die gewünschten Parameter ( $\langle N \rangle, \langle C \rangle, D$ ).

## 2 Aufgabenstellung

Membranrezeptoren spielen eine wichtige Rolle im Kommunikationsprozess einer Zelle mit dem äußeren Milieu. Der PDGF-Rezeptor  $\beta$ , aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen, übernimmt während der Embryonalentwicklung und der Zellproliferation wichtige Aufgaben. Während der Aktivierung des Rezeptors induziert die Bindung des natürlichen Liganden eine Homodimerisierung, wobei die Transmembrandomänen (TMDn) das extrazelluläre Signal ins Zellinnere übertragen. Der Rezeptor kann in Abwesenheit des Liganden ebenfalls durch Bindung des kleinen E5 Onkoproteins aus dem Rinder-Papillomavirus aktiviert werden, was zu einer unkontrollierten Zellvermehrung und Krebs führen kann. Dabei wechselwirkt E5 direkt mit der TMD des Rezeptors. Die Details dieser Interaktion sind bisher nicht bekannt, weshalb die Aufklärung der molekularen Aktivierungsmechanismen von Rezeptor-Tyrosinkinasen und die Rolle der TMD bei der Signaltransduktion über die Membran hinweg erforderlich sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, wie die PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5 sich nach Rekonstitution in verschiedenen Lipidsystemen orientieren, in welchen Lipidphasen sie bevorzugt lokalisiert sind und welchen oligomeren Zustand sie ausbilden. Darüber hinaus sollten ggf. erfolgende Änderungen der Orientierung in der Membran und der Lokalisation bei der Wechselwirkung beider Proteine Einblicke in den Aktivierungsmechanismus vermitteln. Zudem soll diese Wechselwirkung in verschiedenen Lipidsystemen untersucht werden, um den hetero-oligomeren Zustand näher zu charakterisieren.

Um diese Fragestellungen zu beantworten soll PDGFR $\beta$ -TMD und E5  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkiert hergestellt und in Membranmodellsystemen mittels Festkörper-NMR-Experimenten untersucht werden. Darüber hinaus müssen geeignete Fluoreszenzfarbstoffe kovalent mit den Proteinen gekoppelt werden, um mittels Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation in künstlich hergestellten, mehrphasigen Riesen-Vesikeln zu ermitteln. Für die Untersuchung des homo-oligomeren Zustands soll ein FRET-Assay genutzt werden, mit Hilfe dessen die Stöchiometrie und der Abstand der Untereinheiten in dem jeweiligen Komplex bestimmt werden können. Dieser FRET-Assay soll auch genutzt werden, um die Interaktion von PDGFR $\beta$ -TMD und E5 zu charakterisieren und um Informationen über den hetero-oligomeren Zustand zu erhalten. Um die Interaktion über die simultane Co-Diffusion der Proteine in Membranen zu untersuchen, sollen erste Experimente mit einer neu entwickelten fluoreszenzkorrelations-spektroskopischen Methode durchgeführt werden. Diese sollte es erlauben, die Wechselwirkung von Membranproteinen in zellähnlichen Riesen-Vesikeln aufzuzeigen.

## **3 Methoden**

### **3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden**

Die Zusammensetzungen sämtlicher Medien (Puffer etc.) finden sich im Anhang (Abschnitt 9).

#### **3.1.1 Arbeiten unter sterilen Bedingungen**

Damit Kontaminationen der Bakterienkulturen vermieden werden, ist es erforderlich, alle Arbeiten unter einer Reinraumbank durchzuführen, da dort sterile Bedingungen herrschen. Die verwendeten Lösungen und Medien, sowie Spitzen, Eppis und Gefäße werden zuvor im Autoklaven bei 1 bar Druck und 121 °C für 20 min sterilisiert. Lösungen, die nicht unter diesen Bedingungen sterilisiert werden können, werden mit einem Cellulosefilter (Porengröße von 0,22 µm) steril filtriert.

#### **3.1.2 Herstellen eines Cryostocks**

Für die Langzeitlagerung von Bakterien werden Cryostocks hergestellt. Hierfür wird von den transformierten Bakterien eine Übernachtskultur angesetzt. Am nächsten Tag wird 1 ml der Kultur in ein Eppi überführt und abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird danach mit der Flüssigkeit aus dem Cryostock resuspendiert und zurück in den Cryostock gegeben. Nach 5 – 10 min setzen sich die Bakterien in den Kügelchen fest und die Flüssigkeit kann verworfen werden. Der Cryostock kann nun bei -80 °C gelagert werden.

#### **3.1.3 Ansetzen einer Übernachtskultur für die Expression**

Für die Übernachtskultur werden 200 ml LB Medium, 200 µl Ampicilin Stammlösung (AMP, 300 mM) und ein Bakterien-Cryokügelchen in einen 1L Erlenmeyerkolben gegeben. Diese Kultur wird über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

#### **3.1.4 Expression von unmarkierten Proteinen**

Für die Hauptkultur der Expression von unmarkierten Proteinen werden 8 x 2L Erlenmeyerkolben mit je 500 ml LB-Medium und 500 µl AMP gefüllt. Nun werden 20 – 25 ml Übernachtskultur zur Hauptkultur dazugegeben, um die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD600) auf den Wert von ca. 0,1 einzustellen. Für eine Dauer von ca. 5 Stunden wird die Hauptkultur im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 220 rpm gelassen. Die OD600 steigt in dieser Zeit auf ca. 0,6 – 0,7. Nun kann die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 ml 200 mM IPTG pro Kolben erfolgen. Es wurde empirisch festgestellt, dass 4 Stunden nach der Induktion die Proteinkonzentration am höchsten ist, sodass die Bakterien geerntet werden können. Hierzu werden sie 15 Minuten mit 600 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Der

Überstand wird verworfen, das Pellet kann nun bei -80 °C gelagert werden oder es kann der Zellaufschluss beginnen.

### 3.1.5 Expression von <sup>15</sup>N Markierten Proteinen

Bei der Expression von <sup>15</sup>N isotopenmarkierten Proteinen wird kein LB-Medium verwendet, sondern M9-Minimalmedium. Die einzige Stickstoffquelle in diesem Medium ist <sup>15</sup>N-Ammoniumsulfat ((<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Die Durchführung erfolgt analog der Expression von unmarkierten Proteinen.

## 3.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden

### 3.2.1 Zellaufschluss und Isolierung der Inclusion Bodies (IB)

Der erste Aufreinigungsschritt nach der Bakterienernte ist der Zellaufschluss. Dazu wird das Zellpellet in Lösung 1 resuspendiert und 3 x 3 min mit Ultraschall behandelt. Die dabei entstehenden Kavitationskräfte zertrümmern die Zellen. Um eine zu starke Wärmeentwicklung zu vermeiden, wird das Gerät mit 65 % seiner Leistung betrieben und das Aufschlussgefäß mit Eiswasser gekühlt. Danach werden die Zelltrümmer und IB eine Stunde bei 4 °C und 26.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand kann verworfen werden und das Pellet wird in Lösung 2 resuspendiert. Es folgt eine weitere Behandlung mit Ultraschall wie im ersten Schritt. Die in Lösung 2 enthaltenen Detergenzien (Ipegal und Desoxycholat) lösen die Membranbestandteile. Nachfolgend wird nochmal für eine Stunde bei 4 °C und 26.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet enthält nun die IB, der Überstand wird verworfen. Nach der Aufnahme des Pellets in Lösung 3, wird mindestens das 10-fache an H<sub>2</sub>O dazugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert, damit die IB aus der Lösung ausfallen. Am nächsten Tag werden die IB bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet wird gefriergetrocknet. Es folgt der proteolytische Verdau mit Hydroxylamin (s.u.) oder die Lagerung bei -20 °C.

### 3.2.2 Proteolytischer Verdau des Fusionsproteins mittels Hydroxylamin

Die proteolytische Spaltung mit Hydroxylamin dient dazu, das E5 oder die PDGFRβ-TMD vom trp-ΔLE und His9-Tag zu trennen. Hierbei wird die Peptidbindung zwischen Asparagin und Glycin gespalten. N-Terminal bleibt das Glycin erhalten (Abbildung 30). Die IB werden in 10 ml Hydroxylamin-Verdauungslösung gelöst und über Nacht bei 45 °C unter Rühren verdaut. Der Verdau wird durch Verringerung des pH-Werts auf 3 mit Ameisensäure gestoppt. Danach wird die Lösung mit einem Spritzenfilter (0,45 µm, unsteril) gefiltert.



**Abbildung 30:** Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins. Es besteht aus dem  $\text{trp-}\Delta\text{LE}$ , dem His9-Tag und dem E5 Protein oder der PDGFR $\beta$ -TMD. Die Peptidbindung zwischen Asparagin und Glycin wird durch Hydroxylamin gespalten, dabei bleibt ein N-terminales Glycin am Protein (geändert entnommen aus [197]).

### 3.2.3 Kovalente Kopplung von Farbstoffen

Um Fluoreszenzmessungen durchführen zu können, mussten geeignete Farbstoffe kovalent mit PDGFR $\beta$ -TMD und E5 gekoppelt werden.

**Tabelle 1:** Farbstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Methoden	Farbstoff	Anregungswellenlänge [nm]	Detektionswellenlänge [nm]
Lokalisation/FCS	ATTO647N	647	680
Lokalisation/FCS	Alexa647	647	680
Lokalisation/FCS	Alexa568	568	607
FRET	Dansyl	344	500
FRET	DABCYL	450	-

Als Kopplungsreaktion wurde hier die Thiol-Maleimid-Kopplung verwendet [198]. Aus diesem Grund mussten Mutanten der Proteine hergestellt werden, die ein endständiges Cystein beinhalteten. Bei E5 konnte das unmittelbar erfolgen, da der Wildtyp bereits zwei endständige, C-terminale Cysteine, an Position 37 und 39, aufwies. Es wurden daher sechs C-terminale Aminosäuren von E5-Wt entfernt und diese Mutante E5\_1-38 für die Farbstoffkopplung verwendet. Da E5 ein Typ II, und der PDGF-Rezeptor  $\beta$  ein Typ I Membranprotein ist, findet deren Interaktion antiparallel statt, sodass bei PDGFR $\beta$ -TMD das N-terminale Serin 495 gegen ein Cystein ausgetauscht wurde. Damit war sichergestellt, dass die Fluorophore bei der Interaktion auf der gleichen Seite der Membran lokalisiert sind. Die rekombinante Herstellung der Mutante PDGFR $\beta$ -TMD\_S495C ergab keine ausreichenden Mengen und wurde deswegen synthetisch, unter der Leitung von Dr. Parvesh Wadhvani, KIT Karlsruhe, hergestellt.

Das Standardprotokoll der Maleimid-Kopplungsreaktion konnte bei den hier verwendeten Proteinen nicht befolgt werden, da es eine Reaktion in wässrigem Puffer vorsieht. E5 und

PDGFR $\beta$ -TMD lösen sich jedoch nur in organischen Lösungsmitteln, weswegen ein alternatives Protokoll genutzt wurde [199].

Es wurden 0,5 mg lyophilisiertes Protein in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und in 100  $\mu$ l Trifluorethanol (TFE) gelöst. Anschließend wurde 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l TCEP und 2  $\mu$ l Triethylamin hinzugegeben. Um die Bildung von Disulfidbrücken durch Oxidation zu vermeiden, wurde jede Chemikalie vor der Verwendung mit Stickstoff durchspült, um den Sauerstoff dadurch aus der Lösung zu verdrängen. Bei jeder Reaktion wurde ein zehnfach molarer Überschuss an Farbstoff verwendet, der im letzten Schritt mit 100  $\mu$ l TFE zu dem gelösten Protein überführt wurde. Die Reaktionsdauer betrug drei Tage, lichtgeschützt bei 4 °C. Nach der Reaktion konnte das Lösungsmittel mit Stickstoff abgedampft werden. Um die Reste des Lösungsmittels zu entfernen, wurde die Probe über Nacht lyophilisiert. Die trockene Probe konnte so bei -20 °C gelagert oder mittels HPLC aufgereinigt werden.

### 3.2.4 Proteinaufreinigung mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ist ein chromatographisches Trennverfahren von Substanzen in Stoffgemischen. Es kann dabei analytisch oder präparativ eingesetzt werden.

Das Gemisch fließt dabei mit einer mobilen Phase (Lösungsmittel) entlang einer stationären Phase (Säule). Da die Substanzen unterschiedliche Polaritäten aufweisen, ist auch deren Affinität zur Säule unterschiedlich. Moleküle mit höherer Affinität zum Lösungsmittel als zur Säule werden mit dem Lösungsmittel sofort aus der Säule gespült. Alle anderen Moleküle eluieren erst dann von der Säule, wenn sich die Polarität der mobilen Phase ändert. Hierzu dient ein Gradient zweier Lösungsmittelgemische, welcher die unterschiedliche Retentionszeit der Substanzen begünstigt. Dabei wird ein Chromatogramm erzeugt, welches die Elution der Moleküle über die Zeit des Gradienten bildlich darstellt. Die Detektion der Substanzen übernimmt ein UV-Detektor, wobei Proteine eine starke Absorption bei 220 nm, sowie die aromatischen Aminosäuren bei 280 nm aufweisen.

Es gibt zwei Arten der HPLC. Bei der Normalphasen (NP) HPLC besteht das Säulenmaterial der stationären Phase aus polarem Silicagel. Zu Beginn des Gradienten ist das Lösungsmittelgemisch apolar (z.B. Pentan). Substanzen mit der höchsten Polarität eluieren demnach als letztes von der stationären Phase.

Bei der Umkehrphasen (RP) HPLC ist das Prinzip genau umgekehrt. Das Säulenmaterial der stationären Phase ist apolar (z.B. 4, 8 oder 18-C-n-Alkane). Das Lösungsmittelgemisch zu Anfang polar. Da reines Wasser praktisch nicht mit dem Säulenmaterial wechselwirken würde, verwendet man hier kein reines Wasser, sondern ein sehr wässriges Gemisch. Die Polarität des Lösungsmittelgemisches nimmt mit der Zeit ab, sodass apolare Substanzen später von der Säule eluieren, als polare. Dabei hat jede Substanz ihre spezifische Reten-

tionszeit im Lösungsmittelgradienten, was in einer scharfen Auftrennung resultiert. Diese Schärfe bzw. die Auflösung der Auftrennung der Substanzen hängt nicht nur von dem verwendeten Lösungsmittelgradienten ab, sondern auch von der Flussrate, der Säulentemperatur sowie der Menge und Diversität der aufgetragenen Substanzen.

E5 und PDGFR $\beta$ -TMD wurden mit einer semipräparativen C18 Säule (Grace Vydac Semi-Prep, 218TPS10, 250 x 10/4,6 mm) aufgereinigt. Farbstoff gekoppelte Proteine wurden wegen der sehr geringen Menge mit der analytischen C18 Säule aufgereinigt. Der Gradient der Laufmittel und deren Zusammensetzung wurden empirisch optimiert und sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Lösungsmittelgradient und Fließgeschwindigkeit bei der Aufreinigung von E5 mittels einer semipräparativen oder analytischen C18 Säule.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	40	60	6
5	80	20	6
12	80	20	6
18	100	0	6
21	40	60	6
25	40	60	6

**Tabelle 3:** Laufmittelzusammensetzung für die Analyse und Aufreinigung von E5.

Lösungsmittel	Laufmittel A	Laufmittel B
Acetonitril	3 %	38 %
Isopropanol	2 %	57 %
H <sub>2</sub> O	95 %	5 %
HCl	5 mmol	5 mmol

**Tabelle 4:** Lösungsmittelgradient und Fließgeschwindigkeit bei der Aufreinigung von PDGFR $\beta$ -TMD mittels einer semipräparativen oder analytischen C18 Säule.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	40	60	6
5	70	30	6
12	70	30	6
18	100	0	6
21	40	60	6
25	40	60	6

**Tabelle 5:** Laufmittelzusammensetzung für die Analyse und Aufreinigung von PDGFR $\beta$ -TMD.

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Laufmittel A</b>	<b>Laufmittel B</b>
Acetonitril	2,5 %	47,5 %
Isopropanol	2,5 %	47,5 %
H <sub>2</sub> O	95 %	5 %
HCl	5 mmol	5 mmol

### 3.3 Analytische Arbeitsmethoden

#### 3.3.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight) Massenspektrometrie ist eine sehr empfindliche, analytische Methode, mit deren Hilfe die genauen Massen von einzelnen Proteinen oder DNA Fragmenten bestimmt werden können [200]. Ebenfalls ist es möglich, komplexe Proteingemische zu analysieren [201]. In dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt um eine erfolgreiche Expression der Proteine bzw. eine erfolgreiche Kopplung der Farbstoffe an die Proteine zu bestätigen.

Grundlage dieser Messung ist die Ermittlung der Flugzeitdauer von Molekülen der Probe, die durch Laserimpulse ionisiert wurden. Somit lässt sich das Masse/Ladungs-Verhältnis der Moleküle errechnen.

Für eine Durchführung muss eine kleine Menge an Testsubstanz mit einer Matrix kokristallisiert werden [202]. Beschießt der Laser die Probe, so überträgt die Matrix die Energie auf die zu untersuchenden Moleküle, welche schonend und effizient ionisiert werden, ohne dabei in Fragmente zu zerfallen. Danach können die Ionen durch ein elektrostatisches Feld im Hochvakuum beschleunigt werden. Die Zeit, welche die Moleküle brauchen um den Detektor zu erreichen hängt von ihrer Masse ab und wird für die Berechnung der genauen Molekülmasse herangezogen.

Bei der Präparation der Probe wurde eine kleine Menge an Protein in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden 10  $\mu$ l der Matrixlösung dazugegeben und für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Als Matrixlösung wurde gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in Acetonitril/H<sub>2</sub>O (1:2) mit 0,1 % TFA verwendet. Aus der abzentrifugierten Probe-lösung wurde danach 1  $\mu$ l entnommen und auf einen Metallträger aufgetragen. Nach dem Auskristallisieren war die Probe bereit für die Messung.

### 3.3.2 Festkörper-NMR Spektroskopie

Die Messungen der Festkörper-NMR-Spektroskopie wurden mit Geräten von Bruker mit 600 MHz und 500 MHz durchgeführt. Die Steuerungs-, sowie Auswertungssoftware war *Topspin*. E5 Wt besitzt einen unstrukturierten C-Terminus von mehr als zehn Aminosäuren, welcher aus der Membran herausragt und somit einen erheblichen Beitrag zum Pulver- bzw. Isotropen Spektrum leisten würde. Zusätzlich zeigte E5 Wt ein starkes Aggregationsverhalten bei jeglicher Probenpräparation, bedingt durch die zwei natürlichen Cysteine in der Aminosäuresequenz. Aus diesem Grund wurde eine Modifikation vorgenommen, um die Probenpräparation reproduzierbar zu gestalten, ohne dabei die TMD zu beeinflussen. Daher wurde jedes NMR-Experiment mit einer zehn Aminosäuren kürzeren Mutante ( $\Delta E5$ ) durchgeführt (Abbildung 31). Vergleichende Sekundärstrukturanalysen mittels CD-Spektroskopie, sowie  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Experimente von E5 Wt und  $\Delta E5$  zeigten keine Beeinflussung der TMD durch die Mutation [135].



**Abbildung 31:** Aminosäuresequenz von E5 Wt und  $\Delta E5$ . In Rot sind die Aminosäuren gekennzeichnet, die entfernt wurden.

- **Probenpräparation**

Die Präparation der NMR Proben verlief für jedes Lipidsystem in gleicher Weise. Zu Anfang wurden die gewünschten Mengen an Lipid und Protein mit einem P:L Verhältnis von 1:50 in je ein Eppendorfgefäß gegeben und mit Chloroform/Methanol (Mischung 1:1) gelöst. Unlösliche Bestandteile ließen sich durch Zentrifugation abtrennen. Der Überstand wurde zu den trockenen, abgewogenen Lipiden dazugegeben und durchmischt. Anschließend konnte die Lipid/Proteinlösung auf Glasplättchen aufgebracht werden, die die Maße 7,5 x 9 mm hatten. Die Lipidmenge pro Glasplättchen sollte 0,9 – 1 mg nicht überschreiten. Nach dem Trocknen wurde die Probe über Nacht ins Vakuum gelegt, um restliches Lösungsmittel zu entfernen. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Stapelung der Glasplättchen und Rehydratisierung bei hoher Luftfeuchtigkeit im Ofen. Nach 24 Stunden waren die Lipide ausreichend hydratisiert, die Lipidschichten bildeten sich aus und die Probe wurde mit Parafilm luftdicht eingeschlossen.

- **<sup>31</sup>P-Experimente**

Um aussagekräftige <sup>15</sup>N-Spektren zu erhalten, ist die gleichmäßige Orientierung der Lipide essentiell. Dies wurde vor jedem Experiment durch die Aufnahme eines <sup>31</sup>P-Spektrums überprüft. Die Temperatur wurde so gewählt, dass sich die Lipide über der Phasenübergangstemperatur befanden. Dabei kam ein HFX-Probenkopf mit Flachspule zum Einsatz. Das Hahn-Echo-Experiment lieferte die Grundlage für das Pulsprogramm [203], wobei 256 Scans ausreichten um ein gutes Spektrum zu erhalten. Die Referenzierung auf 0 ppm erfolgte mittels 85 %iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Der <sup>1</sup>H-Kanal wurde dabei entkoppelt, um die Linienverbreiterung durch heteronukleare dipolare Kopplung zu vermindern.

- **<sup>15</sup>N-Experimente**

Vor jeder Messung wurden die <sup>1</sup>H und <sup>15</sup>N Signale referenziert. Die Referenzierung der <sup>1</sup>H-Dimension erfolgte auf 4,8 ppm für H<sub>2</sub>O. Bei der <sup>15</sup>N-Dimension wurde auf 26,8 ppm referenziert, wobei <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> genutzt wurde. Dies ist mit einer Referenzierung von flüssigem Ammoniak auf 0 ppm gleichzusetzen.

Bei den <sup>15</sup>N-Experimenten wurde ein <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N Probenkopf „LowE“ verwendet, dessen Spule im Arbeitskreis von Prof. Ulrich, KIT Karlsruhe, entwickelt und optimiert wurde um die Hitzeentwicklung während des Experiments niedrig zu halten. Die Magnetfeld-Inhomogenität ließ sich mittels „shimmen“ des H<sub>2</sub>O-Signals reduzieren.

Da der <sup>15</sup>N-Atomkern ein relativ niedriges gyromagnetisches Verhältnis hat, würde die Signalintensität nicht ausreichen um in angemessener Zeit ein gut aufgelöstes Spektrum zu erhalten. Aus diesem Grund wurde die Technik der Kreuzpolarisation (CP) verwendet, mit deren Hilfe die Signalintensität verstärkt werden kann [204]. Dabei wird Magnetisierung von dem <sup>1</sup>H-Atomkern auf den <sup>15</sup>N-Atomkern übertragen.

In den 1D-Experimenten wurde die CP-MOIST Pulssequenz verwendet [205]. Wie auch bei den <sup>31</sup>P-Experimenten wurde auch hier der <sup>1</sup>H-Kanal mit 50 kHz entkoppelt. Dabei fand die SPINAL-16 Pulssequenz Anwendung [206,207]. Für ein Spektrum wurden mindestens 10.000 Scans benötigt.

Bei den 2D-Experimenten wurde die <sup>15</sup>N-chemische Verschiebung mit der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-dipolaren Kopplung korreliert. Hierbei wurde das SAMMY-Experiment verwendet [208], welches auf einer verbesserten SAMPI4 Pulssequenz basiert [177]. Die <sup>1</sup>H-Pulslänge wurde an der Probe bestimmt, wobei die <sup>1</sup>H-carrier-Frequenz auf 9 ppm, und die <sup>15</sup>N-carrier-Frequenz auf 180 ppm gesetzt wurde. Die Dauer eines Experiments sollte nicht länger als vier Tage in Anspruch nehmen, da sonst die Gefahr bestand, dass die Probe austrocknet. Deswegen musste ein Kompromiss zwischen der Anzahl an Inkrementen (Auflösung) und der Anzahl der Scans (Signalintensität) gefunden werden. Es stellte sich heraus, dass 2048 Scans bei 72 Inkrementen gute Spektren lieferten.

- **Simulationen**

Für die Bestimmung des Tiltwinkels  $\tau$  und Ordnungsparameters  $S_{\text{mol}}$ , wurden die experimentellen Spektren mit Simulationen verglichen. Alle 1D-Simulationen wurden von Dr. Stephan Grage, KIT Karlsruhe, durchgeführt. Für die 2D-SAMMY Simulationen wurde das von ihm entwickelte Programm *Opisawheel* verwendet.

**Tabelle 6:** Werte der Parameter, die in der Simulation verwendet wurden.

Parameter	Werte
CSA-Tensor	$\sigma_{11}$ : 55 $\sigma_{22}$ : 78 $\sigma_{33}$ : 220
Dipolare Kopplungstensoren	$\nu_{11}$ : -4,4 kHz $\nu_{22}$ : -4,4 kHz $\nu_{33}$ : 8,8 kHz
Winkel zwischen $\sigma_{33}$ - NH-Bindungsvektor	$\delta$ : 17°

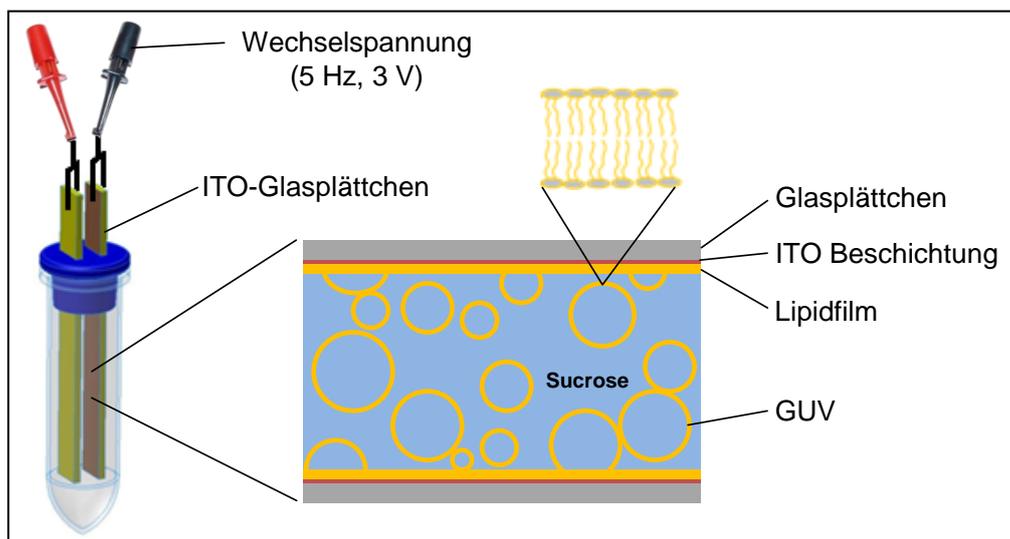
### 3.3.3 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Überprüfung der Lokalisation der Proteine in zweiphasigen Riesen-Vesikeln, wurde an einem Andor Revolution® XD Spinning-Disk Laser-Scanning Konfokalmikroskop (BFI OPTILAS, München) durchgeführt. Es basierte auf einem invertierten Mikroskop (Olympus IX81S1F-ZDC, Tokyo, Japan) ausgestattet mit einem Öl-Immersion Objektiv (APON 60XOTIRF, numerische Apertur 1.49, Olympus, Tokyo, Japan), einem CSU-X1 Scan Kopf (Yokogawa, Tokyo, Japan) und einer DU897 EMCCD Kamera (Andor, Belfast, UK) [209].

Als Fluorophor wurde ATTO647N (ATTO-TEC) und Alexa Fluor® 647 (Life Technologies) verwendet. Die Anregung erfolgte mit einer Wellenlänge von 640 nm und die Detektion der Emission fand bei 685 nm statt. Um die Lipid-Phasen sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff Dil verwendet. Er besitzt die Eigenschaft, sich in der Ld Phase der Membran zu akkumulieren. Die Anregung erfolgte bei 561 nm und die Detektion bei 607 nm. Um einen „crosstalk“ der beiden Kanäle zu vermeiden, erfolgte die Anregung der Kanäle alternierend und die Emission konnte als Intensitätseinheiten detektiert werden. Zur besseren Unterscheidung der beiden Kanäle wurden die Bilder nachträglich mit den entsprechenden Farben eingefärbt. Um den Kontrast der Aufnahmen zu erhöhen, wurden 20 Bilder einer Querschnittsebene aufgenommen und zu einem Bild fusioniert. Die Detektion der Kanäle erfolgte alternierend.

Die Riesen-Vesikel wurden entsprechend dem Protokoll der Elektroformation hergestellt [210]. Dafür wurde 0,4 mg Lipid oder Lipidmischung in 50  $\mu$ l Choloform/Methanol (1:1) gelöst und farbstoffgekoppeltes Protein mit einem molaren Protein/Lipid (P:L) Verhältnis von 1:1000 dazugegeben. Die Probelösung wurde auf dünnen Indiumzinnoxid (engl. indium tin oxide,

ITO) Glasplättchen verteilt, getrocknet und über Nacht im Vakuum das restliche Lösungsmittel entfernt. Die mit Lipid beschichteten Glasplättchen wurden in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß fixiert, welches mit einer Saccharose-Lösung gefüllt war (Abbildung 32). Danach wurde eine Wechselspannung (5 Hz, 3 V) angeschlossen, wobei sich das Eppendorf-Gefäß in einem Heizblock mit 50 °C befand. Bedingt durch die Wechselspannung begannen sich die Lipidschichten von der ITO-Oberfläche langsam zu lösen, wobei sich Riesen-Vesikel bildeten. Nach 1,5 Stunden wurde die Frequenz für etwa 30 Minuten auf 2 Hz verringert. Anschließend wurden die ITO-Plättchen vorsichtig entfernt und die Vesikellösung konnte in eine Probenkammer überführt werden. Dabei wurde 200 µl Vesikellösung mit 200 µl PBS Puffer gemischt, damit die mit Saccharose gefüllten Vesikel absinken. Die Osmolarität von Puffer und Saccharose-Lösung war dabei gleich. Nach dem Abkühlen der Vesikel auf Raumtemperatur konnten sie unter dem Konfokalmikroskop beobachtet werden.



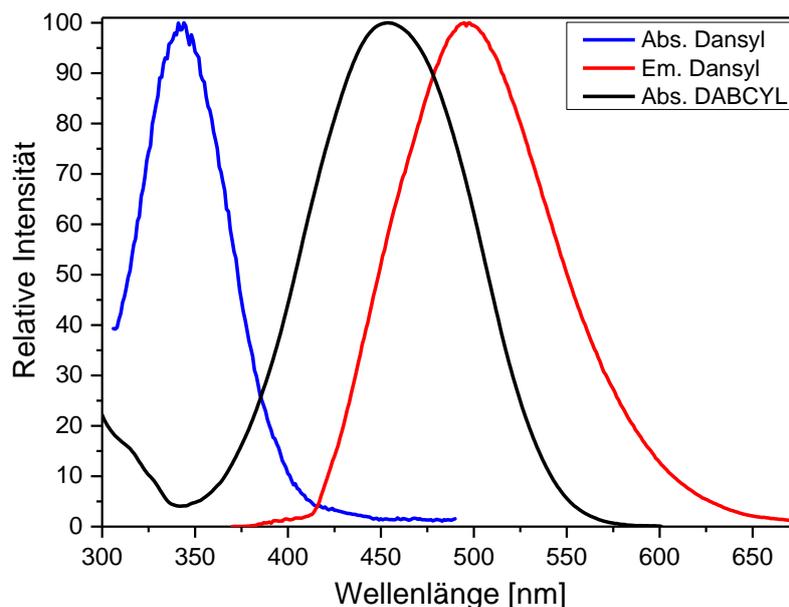
**Abbildung 32:** Herstellung von Riesen-Vesikeln (GUV). Eine Lipid/Proteinlösung wird auf ITO-beschichtete Glasplättchen gegeben, nach dem Trocknen werden zwei Plättchen in ein Eppendorfgefäß mit einer Saccharose-Lösung fixiert. Durch Anlegen einer Wechselspannung von 5 Hz und 3 V beginnen die Lipidschichten zu quellen und nach ca. zwei Stunden haben sich Riesen-Vesikel gebildet.

### 3.3.4 FRET – Förster-Resonanz-Energie-Transfer

Strukturuntersuchungen mittels CD (Sekundärstruktur) oder NMR (Tilt- und Rotationswinkel) geben Einblick in Details der Proteinstruktur. Doch die Bestimmung der Stöchiometrie bei Homo- oder Heterointeraktionen von  $\alpha$ -Helices sind damit nicht zugänglich. Um diese Frage zu beantworten, eignet sich der in Abschnitt 1.3.2 dargestellte FRET-Assay [187].

Bei der Wahl der Farbstoffe war zum einen zu beachten, dass sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt, zum anderen sollten die Farbstoffmoleküle möglichst klein sein, um strukturelle Störungen weitgehend ausschließen zu können. Weiterhin ist der Försterradius bei kleineren Farbstoffmolekülen in der Regel geringer, was bei der Messung von Distanzen unterhalb von 40 Å von Vorteil ist.

Als Donor wurde Dansyl verwendet, das über eine Maleimidgruppe an ein Cystein der Proteine kovalent gekoppelt wurde. Als Akzeptor wurde DABCYL eingesetzt, ein Farbstoff, welcher nicht fluoresziert und als Quencher fungiert. Dieser wurde ebenfalls über ein Cystein an die Proteine gekoppelt. Der Försterradius dieses FRET-Paares beträgt 40 Å [188].



**Abbildung 33:** Absorptions- und Emissionsspektrum von Dansyl (blau bzw. rot) und Absorptionsspektrum von DABCYL (schwarz). Dansyl besitzt ein Absorptionsmaximum bei 344 nm und emittiert maximal bei 500 nm. DABCYL zeigt ein Absorptionsmaximum bei ca. 450 nm, fluoresziert jedoch nicht. Der Försterradius dieses FRET-Paares beträgt 40 Å.

Beim FRET-Assay zur Bestimmung des oligomeren Zustands wird das Quenchen des Donors in Abhängigkeit vom Akzeptormolenbruch  $x_A$  quantitativ bestimmt. Für eine derartige Bestimmung werden zehn Proben angesetzt, wobei die Akzeptorkonzentration schrittweise erhöht wird (Tabelle 7). Um eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu erzielen, wird die Menge an Donor in jeder Probe konstant gelassen und nur der Akzeptoranteil

entsprechend erhöht. Da sich so die Gesamtkonzentration der Proteine erhöht, muss die Lipidkonzentration ebenfalls angeglichen werden, um ein konstantes P:L Verhältnis von hier 1:400 beizubehalten.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der Proben für den FRET-Assay. Die Donorkonzentration in jeder Probe ist konstant, während der Akzeptoranteil schrittweise erhöht wird. Um ein konstantes P:L Verhältnis zu erhalten, wird die Lipidkonzentration entsprechend angeglichen.

$x_A$	Anteil Akzeptor [%]	Anteil Donor [%]	Donor [nM]	Akzeptor [nM]	Lipid [ $\mu$ M]
0	0	100	125,0	0,0	50,0
0,1	10	90	125,0	13,9	55,6
0,2	20	80	125,0	31,3	62,5
0,3	30	70	125,0	53,6	71,4
0,4	40	60	125,0	83,3	83,3
0,5	50	50	125,0	125,0	100,0
0,6	60	40	125,0	187,5	125,0
0,7	70	30	125,0	291,7	166,7
0,8	80	20	125,0	500,0	250,0
0,9	90	10	125,0	1125,0	500,0

### 3.3.5 FCS – Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

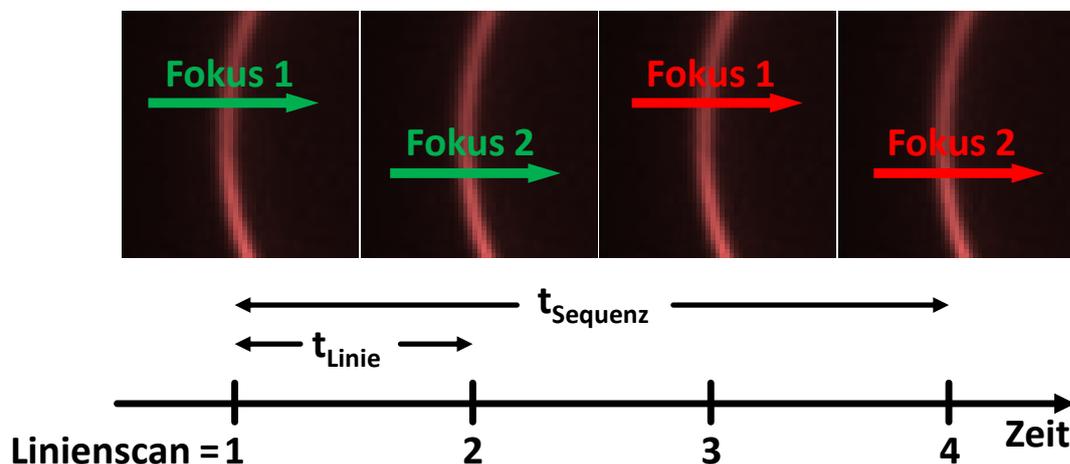
Mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*engl.* FCS) ist es möglich, neben Dynamiken von Molekülen, auch bimolekulare Interaktionen zu quantifizieren. Dafür wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Nienhaus, KIT Karlsruhe, eine Methode entwickelt, die es erlaubt, Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen in lebenden Zellen zu untersuchen. Das Grundprinzip basiert auf der Zwei-Farben-Zwei-Fokus Linien-Raster-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*engl.* dual-color dual-focus line-scanning FCS, 2c2f-lsFCS) und wurde im Abschnitt 1.3.3 dargestellt. Der experimentelle Aufbau besteht aus einem konfokalem (STED) Mikroskop und wurde in Eigenarbeit der zuständigen Arbeitsgruppe weiter optimiert [211]. Wie auch für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Lokalisation der Proteine (Abschnitt 3.3.3) fanden Farbstoffe Anwendung, die im grünen und roten Wellenlängenspektrum angeregt werden (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Verwendete Farbstoffe für die 2c2f-IsFCS Experimente, mit deren Anregungs- und Detektionswellenlängen.

Farbstoff	Anregungs-Wellenlänge [nm]	Detektionswellenlänge [nm]
ATTO647N	640	685
Alexa647	640	685
Alexa568	561	607

Die Probenpräparation der Riesen-Vesikel erfolgte nach dem in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Protokoll. Für die 2c2f-IsFCS-Experimente wurde jedoch das P:L Verhältnis auf 1:50000 verringert.

Durch die höhere Dichte der Saccharose-Lösung in den Vesikeln sedimentierten diese auf den Boden der Probenkammer und waren dort über mehrere Stunden stabil. Die Einstellung der Parameter und die Ansteuerung der Mikroskopkomponenten erfolgte mit der Software *Fluorescence Microscopy v.6.08*. Nach der Fokussierung der Membran, rasterte das Detektionsvolumen alternierend entlang zweier definierter Linien parallel zur Membrannormalen durch die Vesikelmembran. Nach zwei dieser Rastervorgänge wechselte die Anregungs- bzw. Detektionswellenlänge (Abbildung 34). Aus den Intensitätspitzen der Rasterlinien wurden die Intensitätssignale für die Auto- bzw. Kreuzkorrelationsfunktionen gewonnen (Abschnitt 1.3.3).



**Abbildung 34:** Schema der zeitlichen Signaldetektion der 2c2f IsFCS. Ein Detektionsvolumen rastert alternierend entlang zwei definierter Linien (Fokus 1 und 2) und durchquert dabei die Vesikelmembran (rote, senkrecht gebogene Linie). Dabei wird nach zwei Rastervorgängen die Anregungs- bzw. Detektionswellenlänge geändert (grün und rot). Die aufgenommenen Intensitätssignale können daraufhin miteinander korreliert werden (siehe Abschnitt 1.3.3). Die minimale Verzögerungszeit  $\tau_{\text{min}}$  für die Autokorrelation eines Fokus liegt bei  $4t_{\text{Linie}}$ , bzw. für die Zwei-Farben-Kreuzkorrelation bei  $2t_{\text{Linie}}$ . Der Abstand der Foki beträgt 400 nm.

## 4 Ergebnisse

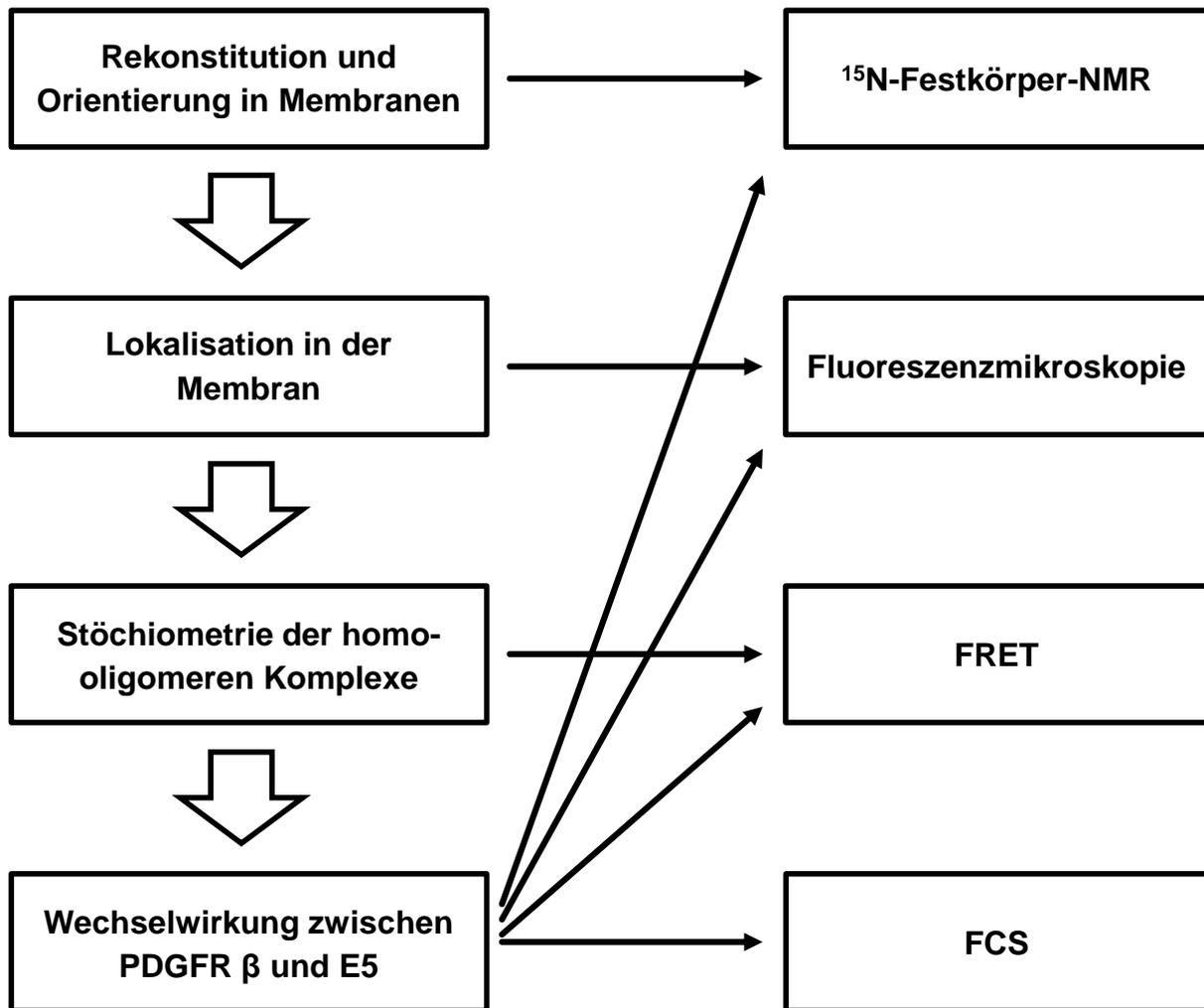
Für die Untersuchung des Verhaltens von PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5 wurden die Proteine  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkiert in orientierten Lipiddoppelschichten unterschiedlicher Dicke rekonstituiert und mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Dadurch kann ermittelt werden, ob und wie sich die Proteine durch ihre Orientierung an die Gegebenheiten der verschiedenen Membranen, z.B. deren hydrophobe Dicke, anpassen.

Da eukaryotische Zellmembranen heterogen sind, eignen sich mehrphasige Riesen-Vesikel, um diese zu imitieren. Dabei zeichnen sich die Phasen durch eine unterschiedliche hydrophobe Dicke und Fluidität der Lipide aus. Mit Fluoreszenzmikroskopie kann festgestellt werden, in welchen Bereichen der Membran sich die Proteine bevorzugt aufhalten. Durch den Vergleich mit den Ergebnissen aus den Festkörper-NMR-Experimenten können somit Rückschlüsse gezogen werden, in welcher Orientierung die Proteine in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen.

Neben der Orientierung und der Lokalisation in Zellmembranen kann der Oligomerisierungszustand von PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5 zum Verständnis ihrer Funktion beitragen. Aus diesem Grund wird im darauffolgenden Abschnitt die Stöchiometrie beider Proteine in Membranen verschiedener Dicke mittels FRET-Experimente bestimmt.

Nach der Bestimmung der Orientierung, der Lokalisation und der Stöchiometrie der Proteine unabhängig voneinander, wird im letzten Teil dieses Kapitels der Frage nachgegangen, wie sich die Wechselwirkung der beiden Proteine auswirkt. Hierzu wird durch Festkörper-NMR-Experimente die Veränderung der Orientierung quantifiziert und fluoreszenzspektroskopisch wird untersucht, ob sich die Lokalisation der Proteine durch die Interaktion verändert. Mittels FRET-Experimente sollen Hinweise erhalten werden, mit welcher Stöchiometrie die Interaktionspartner einen Komplex bilden und wie dieser Zustand von der Membrandicke beeinflusst wird.

Die genannten Fragestellungen und die Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fanden, sind in Abbildung 35 schematisch dargestellt.



**Abbildung 35:** Übersicht und Gliederung der Fragestellungen (links), die im Rahmen dieser Arbeit mit den entsprechenden Methoden bearbeitet wurden (rechts).

#### 4.1 Rekonstitutionsverhalten und Tiltwinkelbestimmung in orientierten Modellmembranen mittels Festkörper-NMR

Im Rahmen der Arbeiten von Dr. Silke Hoffmann und Dr. Dirk Windisch wurden bereits erste Festkörper-NMR-Experimente in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten durchgeführt [41,197]. Die im Zuge dieser Arbeit gezeigten Festkörper-NMR-Experimente sollen diese Ergebnisse erweitern und komplettieren. Zusätzlich wurde die Probenpräparation optimiert, was sich in einer besseren Rekonstitution und Orientierung des Proteins zeigte. Dazu wurde u.a. die um zehn Aminosäuren kürzere Mutante  $\Delta E5$  anstelle von E5 Wt benutzt (siehe dazu Abschnitt 3.3.2). Eines der Standardlipide für Festkörper-NMR-Experimente in orientierten Modellmembranen ist DMPC [105,175,212–214]. Mit einer hydrophoben Dicke dieser Membranen von ca. 25,4 Å können jedoch nur Proteine mit einer Länge ihrer TMD von 17 – 20

Aminosäuren in diese rekonstituiert werden. Da aber die TMDn des PDGF-Rezeptors  $\beta$  und E5 mit ca. 27 Aminosäuren deutlich länger sind, wurden hauptsächlich einfach ungesättigte Lipide verwendet, die eine entsprechend längere Kohlenwasserstoffkette tragen (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Lipidsysteme der Festkörper-NMR-Experimente. Die Orientierung der Membranen erfolgte mechanisch auf Glasplättchen und wurde vor jedem Experiment überprüft. Die Berechnung der Membrandicke erfolgte nach [215].

Lipidsystem	Lipid	Kohlenstoffkette	Membrandicke [Å]
1	DNPC	C24:1	38,2
2	DErPC	C22:1	34,4
3	DEiPC	C20:1	30,6
4	DOPC	C18:1	26,8
5	DPoPC	C16:1	23,0
6	DMPC	C14:0	25,4
7	DLPC	C12:0	21,0
8	DOPC/Sphingomyelin/Chol	Gemischt	-
9	Sphingomyelin/Chol	Gemischt	-

Bei den nachfolgend gezeigten  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D- und 2D-Experimenten wird angenommen, dass die Proteine prinzipiell drei verschiedene Beiträge zu einem Spektrum liefern:

- 1) Ist die Membrannormale parallel zum äußeren Magnetfeld ausgerichtet und die  $\alpha$ -Helix transmembran orientiert, so ergibt sich ein Signal im Tieffeld-Bereich um 200 ppm chemischer Verschiebung. Dieses erscheint kleiner und breiter und verschiebt sich Richtung Hochfeld mit zunehmendem Neigungswinkel.
- 2) In manchen Bereichen der Probe kann die Membran von der gewünschten Ausrichtung abweichen, die darin rekonstituierten Proteine können so Signale im gesamten Bereich des Spektrums hervorrufen. Diese Abweichung der Membranorientierung kann mit dem sog. „mosaic spread“ mathematisch charakterisiert werden [216,217]. Für die Proteine ist der mosaic spread eine Variation des äußeren Magnetfeldes  $B_0$  im Hauptachsensystem der CSA-Tensoren und kann als Wahrscheinlichkeitsverteilung beschrieben werden.
- 3) Wird das Protein mangelhaft in die Membran rekonstituiert und liegt deshalb aggregiert vor, so ist jede Orientierung statistisch verteilt vorhanden. Daraus resultiert die typische Form eines Pulverspektrum (siehe dazu Abschnitt 1.3.1, Abbildung 16).

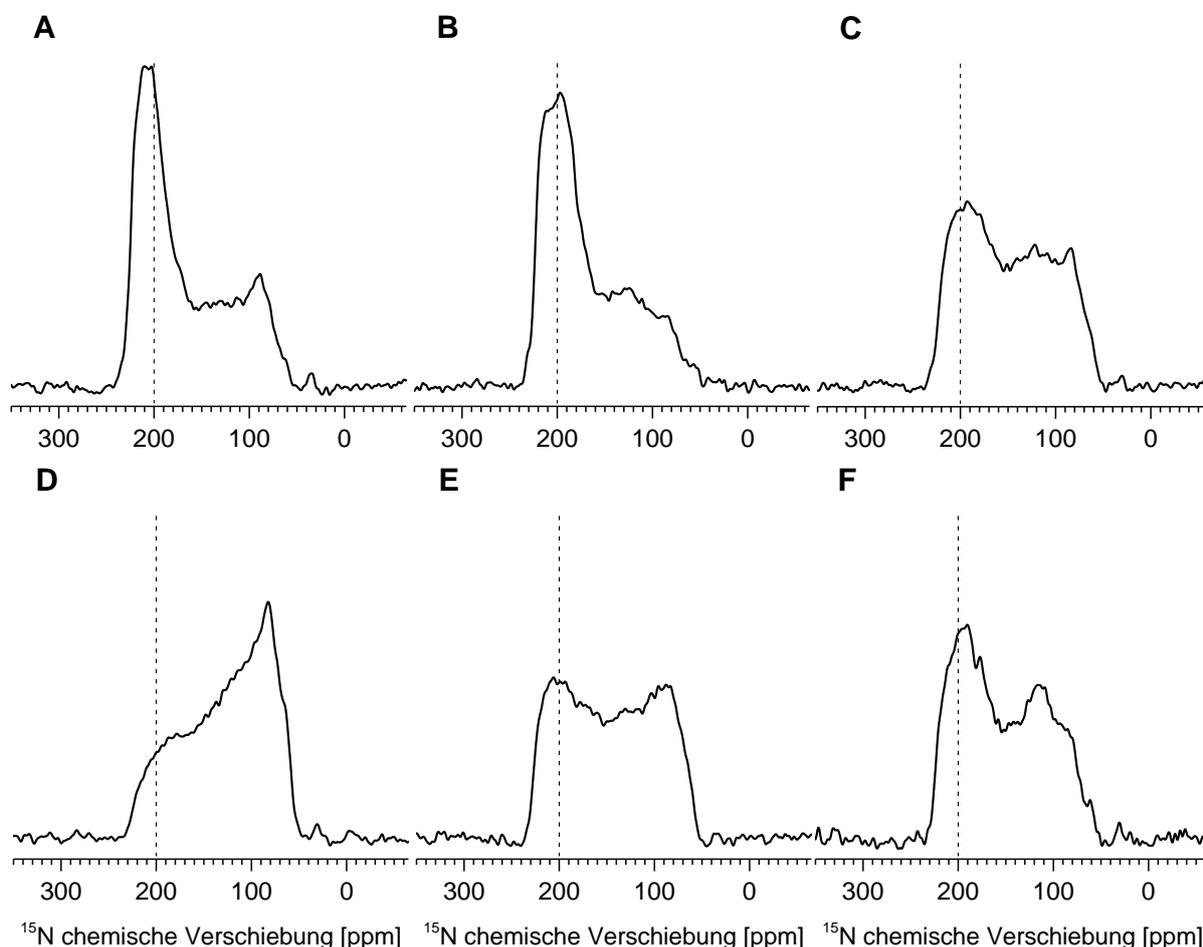
#### 4.1.1 Bestimmung der Orientierung von E5 mittels $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Experimenten

Für die Untersuchung der Rekonstitution und Orientierung von E5 in verschiedenen Membranen, wurden die Lipidsysteme 1 - 4 und 9 aus Tabelle 9 verwendet. Die ungenügende Rekonstitution von E5 in DOPC Membranen ließ weitere Experimente in dünneren Membranen nicht sinnvoll erscheinen.

Die 1D-Spektren der  $^{15}\text{N}$ -NMR-Experimente von  $\Delta\text{E5}$  zeigen nur in dicken Membranen (DNPC und DErPC) eine gute Rekonstitution mit einer hauptsächlich transmembranen Orientierung (200 ppm) und einem kleinen Pulveranteil (60 – 130 ppm, Abbildung 36 A und B). Das transmembrane Signal in DNPC Membranen liegt etwas über 200 ppm, wobei es sich in DErPC Membranen nach rechts verschiebt und etwas breiter und kleiner wird. Das bedeutet eine leichte Zunahme des Tiltwinkels. Die Rekonstitution in DEiPC Membranen verlief dagegen deutlich schlechter, was anhand der Zunahme der Pulverkomponente zu erkennen ist (Abbildung 36 C). Die Quantifizierung des Tiltwinkels ist deshalb mit einem gewissen Vorbehalt zu betrachten. Das Experiment in DOPC Membranen zeigt ein Pulverspektrum, verursacht durch Proteinaggregation anhand des zu großen hydrophoben Mismatch zwischen der Länge der TMD und der Dicke der Membran (Abbildung 36 D). Zusätzlich, zu der zehn Aminosäuren kürzeren Mutante  $\Delta\text{E5}$  wurde ein Kontrollexperiment mit E5 Wt in DErPC Membranen durchgeführt. Das Spektrum zeigt zwar einen gut orientierten Anteil, doch die Pulverkomponente sowie der isotrope Teil (115 ppm) sind stark ausgeprägt (Abbildung 36 E). Der Vergleich mit dem Spektrum von  $\Delta\text{E5}$  in DErPC Membranen bestätigt zum einen, dass durch die Mutation die relevante TMD von E5 in ihrer Orientierung wahrscheinlich nicht gestört wird. Zum anderen lassen sich, durch den reduzierten Pulver- und isotropen Anteil, Veränderungen der Rekonstitution und Orientierung der TMD in verschiedenen Membranen bei  $\Delta\text{E5}$  klarer erkennen.

Sphingomyelin (SM) und Cholesterin (Chol) spielen eine wichtige Rolle in eukaryotischen Zellmembranen und bilden zusammen den Hauptanteil der sog. „Lipid-Rafts“. Diese stehen in Verbindung mit vielfältigen Funktionen wie u.a. Proteinsortierung für Membranproteine mit langer TMD, da SM lange Kohlenwasserstoffketten besitzt [218]. Um das Verhalten von  $\Delta\text{E5}$  in diesen Mikrodomänen zu untersuchen, wurden orientierte Membranen aus SM und Chol (1:1 bzw. 2:1) hergestellt und  $\Delta\text{E5}$  darin rekonstituiert. Dabei hat sich gezeigt, dass in SM/Chol (1:1) Membranen eine Rekonstitution von  $\Delta\text{E5}$  nicht möglich war. In SM/Chol (2:1) Membranen hingegen, zeigt  $\Delta\text{E5}$  ein ähnliches Verhalten wie in DEiPC Membranen (Abbildung 36 F). Das Signal der orientierten Komponente ist zwar genauso stark ausgeprägt wie der Pulveranteil, doch das Signal bei 200 ppm zeigt eine leichte Verschiebung nach links. Daher kann angenommen werden, dass sich  $\Delta\text{E5}$  zwar schlecht rekonstituieren lässt, doch die orientierten Anteile besitzen wahrscheinlich einen geringen Tiltwinkel, der mit

dem in dicken DErPC Membranen vergleichbar ist. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit abnehmender Dicke der Membran der Anteil an orientierten Proteinen abnimmt und die Aggregation, sowie der Tiltwinkel zunimmt.



**Abbildung 36:**  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von  $\Delta\text{E5}$  in verschiedenen Membransystemen. **A:** In den dicken DNPC Membranen zeigt das transmembran orientierte Signal bei 200 ppm eine schmale und hohe Linienform. Das deutet auf einen geringen Tiltwinkel hin. Der Anteil der aggregierten Proteine (60 – 130 ppm) ist dabei relativ klein. **B:** In DErPC Membranen ist das Signal bei 200 ppm kleiner und breiter, zusätzlich wandert es leicht nach rechts. Das bedeutet, dass der Tiltwinkel, im Vergleich zu den dickeren Membranen, zunimmt. Am Pulversignal ist kaum eine Veränderung festzustellen. **C:** Die Rekonstitution in DEiPC Membranen verlief deutlich schlechter als in dickeren Membranen, was der deutlich höhere Pulveranteil zeigt. Ebenfalls ist zu erkennen, dass das Signal der transmembran orientierten Proteine nochmal breiter wird und sich auch weiter nach rechts verschiebt. Damit zeigt sich eine weitere Zunahme des Tiltwinkels. **D:** In DOPC Membranen erscheint ein Pulverspektrum. Das bedeutet, dass die Proteine aggregiert vorliegen. Auf Experimente in dünneren Membranen wurde deswegen verzichtet. **E:** In Sphingomyelin/Cholesterin (2:1) Membranen, die den natürlichen „Lipid-Rafts“ nachempfunden sind, zeigt  $\Delta\text{E5}$  eine schlechte Orientierung, jedoch einen wahrscheinlich geringen Tiltwinkel. **F:** Das Kontrollexperiment von E5 Wt in DErPC zeigt, dass im Vergleich mit  $\Delta\text{E5}$  in DErPC (B) der isotrope- sowie der Pulveranteil deutlich erhöht ist. Das würde die Quantifizierung der Orientierungsunterschiede in verschiedenen Membranen erheblich erschweren.

Für die Bestimmung des Tiltwinkels wurden 1D-Spektren mit verschiedenen Tiltwinkeln, Ordnungsparametern und Anteilen der aggregierten Proteine simuliert und an die experimentel-

len Spektren angefügt. Dabei ließen sich Informationen über die Qualität der Membranorientierung und über den „mosaic spread“ aus den  $^{31}\text{P}$ -Spektren jeder Probe entnehmen. Diese wurden in den Simulationen berücksichtigt. Die Ergebnisse der Simulationen (Tabelle 10) zeigen, dass in den drei dicksten Membranen (DNPC, DErPC und DEiPC) ein Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  von 0,92 ermittelt worden ist. Dieser gibt die Dynamik der Proteine an und liegt zwischen 0 (dynamisch) und 1 (statisch). Der Tiltwinkel erhöht sich dabei nahezu proportional zur abnehmenden Membrandicke (DNPC  $\rightarrow$  DErPC  $\rightarrow$  DEiPC,  $11^\circ \rightarrow 15^\circ \rightarrow 21^\circ$ ). In den relativ dicken SM/Chol (2:1) Membranen errechnet sich ein Tiltwinkel von  $23^\circ$ , doch durch den hohen Pulveranteil, bedingt durch eine Proteinaggregation, ist dieser mit einem deutlichen Fehler behaftet.

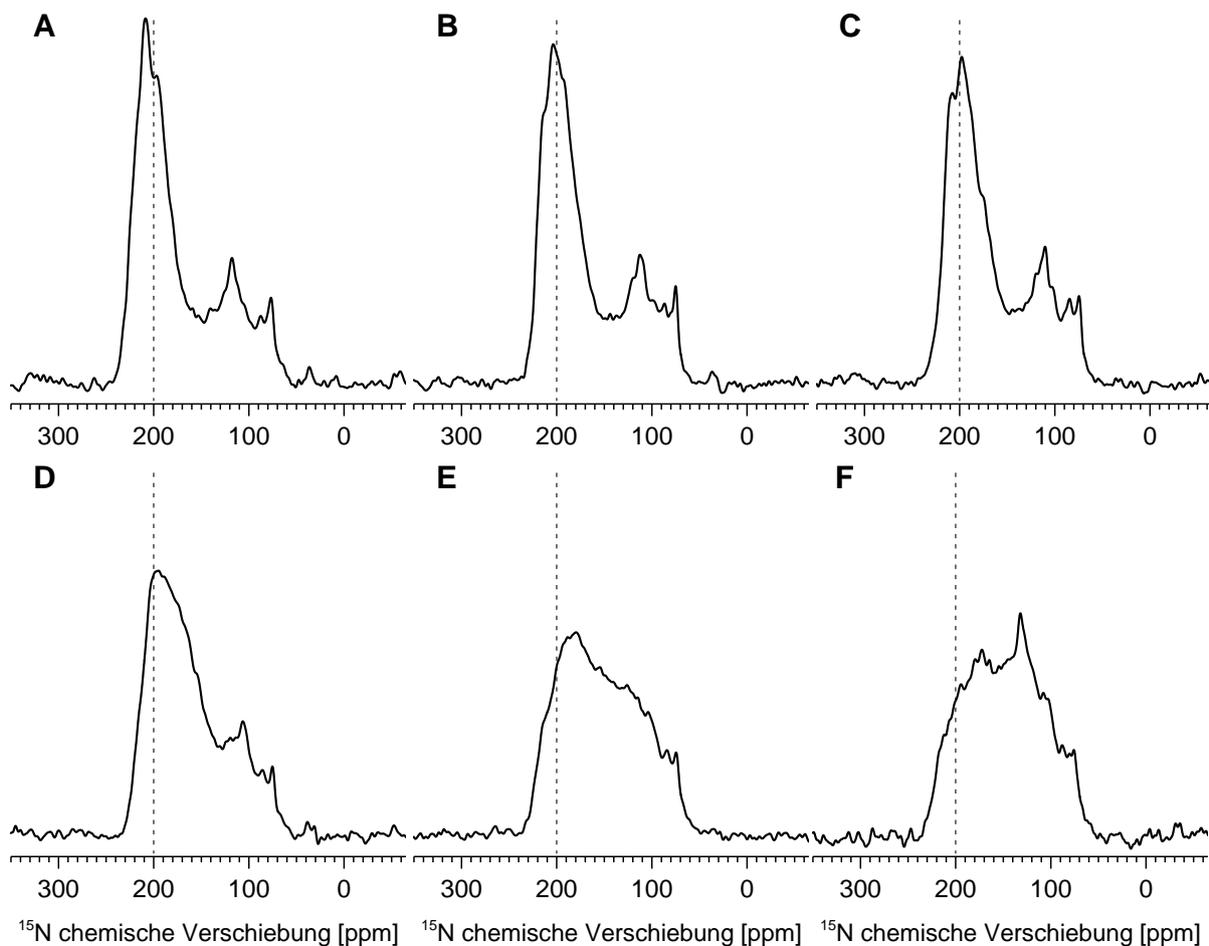
**Tabelle 10:** Ergebnisse der Simulation der  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren für Tiltwinkel und Ordnungsparameter von  $\Delta\text{E5}$  in verschiedenen Lipidsystemen. Es zeigt sich ein Unterschied des Tiltwinkels von ca.  $4^\circ$  zwischen Lipidsystem 1 und 2, sowie  $6^\circ$  zwischen Lipidsystem 2 und 3. Der Ordnungsparameter ist bei allen Lipidsystemen 0,92. Für das Spektrum von  $\Delta\text{E5}$  in DOPC war keine genaue Simulation möglich, da der Pulveranteil sehr hoch ist. Die Bestimmung des Tiltwinkels in SM/Chol (2:1) zeigt einen etwas größeren Tiltwinkel als in DEiPC, wobei aber der Pulveranteil höher ist. (Parameter der Simulation entnommen aus [219]).

Lipidsystem	Lipid	Tiltwinkel $\tau$	Ordnungsparameter $S_{\text{mol}}$	RMSD
1	DNPC	$11^\circ \pm 2^\circ$	0,92	0,00130
2	DErPC	$15^\circ \pm 1^\circ$	0,92	0,00130
3	DEiPC	$21^\circ \pm 2^\circ$	0,92	0,00148
4	DOPC	Aggregiert	Aggregiert	Aggregiert
5	SM/Chol	$23^\circ \pm 3^\circ$	0,98	0,00167

#### 4.1.2 Bestimmung der Orientierung von PDGFR $\beta$ -TMD mittels $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Experimenten

Analog zu den  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von  $\Delta\text{E5}$  wurden die Experimente ebenfalls mit PDGFR $\beta$ -TMD durchgeführt. In dicken Membranen aus DNPC, DErPC und DEiPC zeigen die Ergebnisse ein ähnliches Bild. Das schmale Signal der transmembranen Orientierung wandert mit abnehmender Membrandicke nach rechts, bleibt jedoch in der Form nahezu gleich. Der Pulveranteil ist dabei konstant niedrig (Abbildung 37 A – C). Zusätzlich zum Helixrückgrat, besitzt das Protein mit drei Lysinen und einem Arginin  $^{15}\text{N}$ -markierte Seitenketten, dadurch entsteht ein schmales, isotropes Signal bei ca. 115 ppm. Die Experimente in DOPC und DPOPC Membranen zeigen ebenfalls eine gute Rekonstitution und transmembranen Orientierung. Das Signal bei 200 ppm in DOPC Membranen ist nach rechts verschoben und zudem sichtbar breiter und kleiner als in den dickeren Membranen, was die

Zunahme des Tiltwinkels bedeutet (Abbildung 37 D). Das dünnste Lipidsystem aus einfach ungesättigten Lipiden (DPoPC) zeigt die breiteste und kleinste Linienform und die Position ist am weitesten rechts (Abbildung 37 E). Das lässt auf den größten Tiltwinkel der Membranserie schließen. Der Pulveranteil ist bei allen Spektren klein. In DMPC Membranen verhält sich PDGFR $\beta$ -TMD ähnlich wie in DPoPC Membranen, das transmembrane Signal ist sehr breit und klein, wobei der Pulveranteil etwas erhöht ist (Abbildung 37 F).

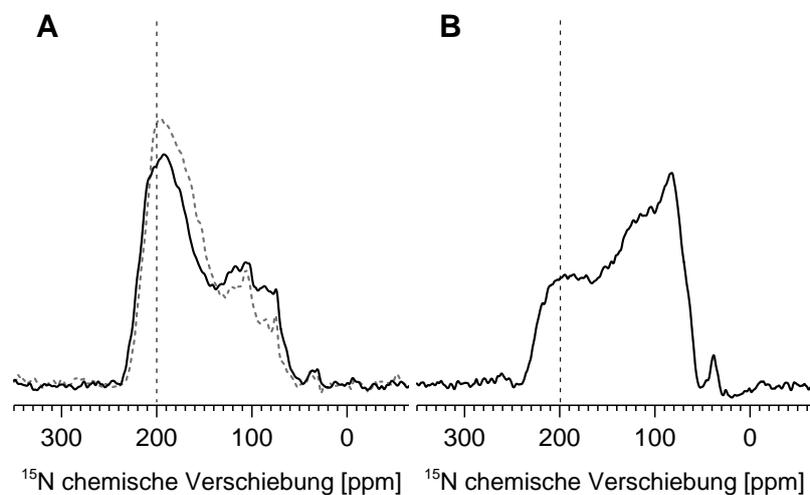


**Abbildung 37:**  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in verschiedenen Membranen. **A:** In DNPC Membranen ist PDGFR $\beta$ -TMD nahezu vollständig rekonstituiert, da der Pulveranteil niedrig ist. Lediglich die Termini und die Lysinseitenketten ergeben ein Signal bei 115 ppm. Das Signal der transmembranen Orientierung ist schmal, hoch und links von 200 ppm zu beobachten. Daher ist der Tiltwinkel niedrig. **B:** In DErPC Membranen zeigt sich ein ähnliches Spektrum. Die Höhe des Signals bei 200 ppm ist kleiner und wenig nach rechts verschoben. **C:** In DEiPC Membranen ist die Position des transmembranen Signals genau bei 200 ppm zu sehen, die Höhe ist dabei ähnlich wie in DErPC Membranen. **D:** In DOPC Membranen wird das transmembrane Signal sichtbar breiter und kleiner, ebenfalls verschiebt es sich nach rechts von 200 ppm. Die Pulverkomponente nimmt dabei nicht zu. Das zeigt eine Zunahme des Tiltwinkels im Vergleich zu den dickeren Membranen. **E:** In DPoPC Membranen verstärkt sich dieser Effekt der Linienverbreiterung und das Signal verschiebt sich noch weiter nach rechts. Das lässt auf eine weitere Zunahme des Tiltwinkels schließen. **F:** In den Membranen aus gesättigten Lipiden (DMPC) zeigt PDGFR $\beta$ -TMD ein ähnliches Bild wie in DPoPC Membranen. Zusammenfassend ist zu beobachten, dass in allen hier gezeigten Lipidsystemen eine Aggregation, bedingt durch eine unvollständige Rekonstitution, kaum auftritt.

Einige Wachstumsrezeptoren, wie auch der PDGF-Rezeptor, wurden in eukaryotischen Zellmembranen vermehrt in sog. „Lipid-Rafts“ lokalisiert [220]. Diese Mikrodomänen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an SM und Chol aus. Daher wurde eine Mischung von DOPC, SM und Chol (1:1:1), sowie nur SM und Chol (2:1) für zusätzliche Experimente in „Raft-ähnlichen“ Bedingungen verwendet. Diese Lipidsysteme zeichnen sich durch eine erhöhte hydrophobe Dicke aus, daher ist zu erwarten, dass sich die Proteine besonders gut rekonstituieren lassen und einen geringen Tiltwinkel besitzen.

Das Spektrum von PDGFR $\beta$ -TMD in DOPC/SM/Cholesterin (1:1:1) Membranen zeigt einen hohen orientierten Proteinanteil, dessen Signal schmäler und weiter nach links verschoben erscheint, im Vergleich zu reinen DOPC Membranen (Abbildung 38 A). Der Tiltwinkel ist daher geringer. Der Pulveranteil ist dabei jedoch etwas höher, was eine weniger gute Rekonstitution andeutet.

Die Rekonstitution in SM/Chol (2:1) Membranen verlief dagegen mangelhaft. Das Spektrum scheint zwar ein lokales Maximum bei 200 ppm zu haben, was auf ein geringen Tiltwinkel schließen lässt, doch dieses Signal ist mit einem gewissen Vorbehalt zu sehen, da der Pulveranteil ausgesprochen hoch ist (Abbildung 38 B). Es lässt sich daher keine verlässliche Aussage über den orientierten Teil der Probe und den Tiltwinkel machen.



**Abbildung 38:**  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in „Raft-ähnlichen“ Membranen. **A:** Im Lipidsystem aus DOPC/SM/Chol (1:1:1, schwarze Linie) zeigt sich eine schmalere Linienform des Signals bei 200 ppm, als in reinen DOPC Membranen (grau gestrichelte Linie). Die zusätzliche Verschiebung nach links bedeutet eine Abnahme des Tiltwinkels. **B:** In Membranen, die nur aus SM und Chol bestehen (2:1), ist ein sehr starkes Pulversignal zu beobachten, der transmembran orientierte Bereich um 200 ppm kann deswegen nicht zuverlässig ausgewertet werden.

Die Berechnung des Tiltwinkels erfolgte analog zum vorherigen Abschnitt. Der Ordnungsparameter  $S_{mol}$  beträgt in jedem Lipidsystem 1. Obwohl die Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in den drei dicksten Membranen (DNPC, DErPC und DEiPC) nahezu gleich erscheinen, ergibt die Berechnung des Tiltwinkels für DNPC Membranen mit 7° einen deutlich geringeren Wert als in DErPC und DEiPC Membranen (14° bzw. 15°), in denen das Protein beinahe identische Tiltwinkel aufweist (Tabelle 11). Erstaunlich ist die Differenz von ca. 9° bei einer weiteren Verringerung der Membrandicke (24° in DOPC Membranen). Hier könnte sich eine größere Strukturänderung von PDGFR $\beta$ -TMD ergeben oder der Oligomerisierungszustand ändern, da die Tiltwinkeländerung zuvor (DErPC  $\leftrightarrow$  DEiPC) nur 1° beträgt.

In DPOPC bzw. DMPC Membranen nimmt der Tiltwinkel um weitere 4° bzw. 5° zu. In „Raft-ähnlichen“ Membranen mit SM/Chol (2:1) konnte wegen des hohen Pulveranteils keine aussagekräftige Berechnung durchgeführt werden. Erst die Mischung von DOPC/SM/Chol (1:1:1) ergab ein Tiltwinkel von 18°.

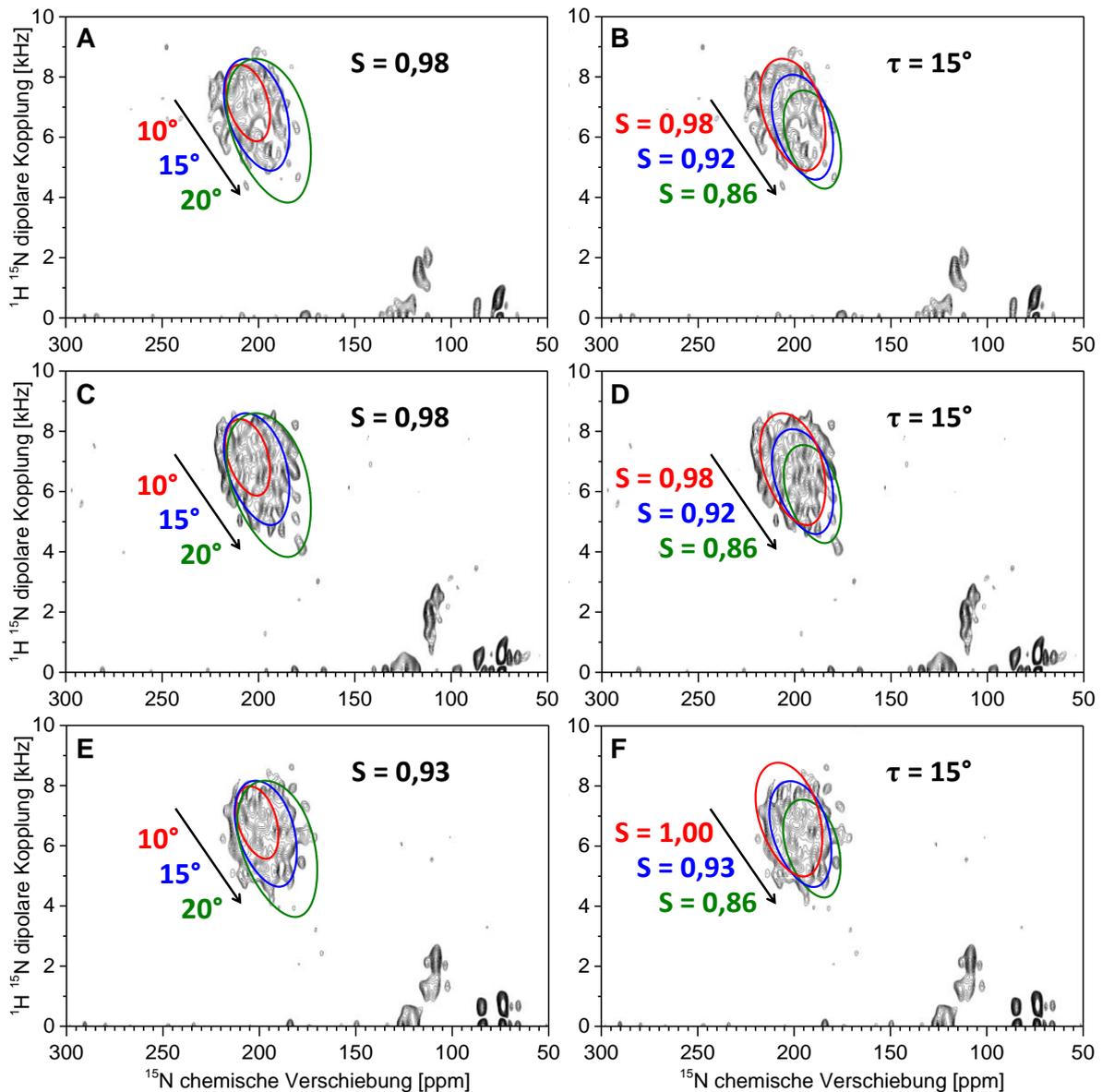
**Tabelle 11:** Ergebnisse der Simulation für Tiltwinkel und Ordnungsparameter von PDGFR $\beta$ -TMD in verschiedenen Lipidsystemen. Obwohl die Spektren in DNPC, DErPC und DEiPC Membranen sehr ähnlich sind, zeigt sich in DNPC ein deutlich kleinerer Tiltwinkel als in DErPC bzw. DEiPC. Weiterhin ist festzustellen, dass der Tiltwinkel von DNPC bis DMPC nicht linear zunimmt. (Parameter der Simulation entnommen aus [219]).

Lipidsystem	Lipid	Tiltwinkel $\tau$	Ordnungsparameter $S_{mol}$	RMSD
1	DNPC	7° $\pm$ 3°	1	0,00341
2	DErPC	14° $\pm$ 1°	1	0,00186
3	DEiPC	15° $\pm$ 1°	1	0,00162
4	DOPC	24° $\pm$ 1°	1	0,00162
5	DPOPC	29° $\pm$ 1°	1	0,00220
6	DMPC	30° $\pm$ 1°	1	0,00274
7	DOPC-SM-Chol	18° $\pm$ 2°	1	0,00207

### 4.1.3 Tiltwinkelbestimmung von PDGFR $\beta$ -TMD mittels $^{15}\text{N}$ -NMR 2D-SAMMY Experimenten

Als Ergänzung zu den  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Experimenten wurden mit PDGFR $\beta$ -TMD in ungesättigten Lipiden zusätzlich  $^{15}\text{N}$ -NMR 2D-SAMMY Experimente durchgeführt. Damit sollte die Orientierung des Proteins in der Membran genauer bestimmt werden. Zusätzlich bilden diese Experimente die Grundlage für die Bestimmung des Rotationswinkels. Im 2D-SAMMY-Spektrum ergeben sich ringförmig angeordnete Signale („PISA Wheels“) der einzelnen  $^{15}\text{N}$ -Atome, aus deren Anordnung die Orientierung abgeleitet werden kann (siehe dazu Abschnitt 1.3.1) [180].

In den dicksten Membranen aus DNPC, DErPC und DEiPC ergeben die Experimente keine ringförmig aufgelösten, einzeln zu erkennenden Signale. Es ist lediglich eine dichte Gruppe von Signalen zu erkennen, die sich nicht eindeutig voneinander separierten (Abbildung 39). Das ist ein Anzeichen dafür, dass die  $\alpha$ -Helix von PDGFR $\beta$ -TMD von der Struktur einer idealen  $\alpha$ -Helix abweicht. Weiterhin können nur sehr kleine Unterschiede der drei Spektren beobachtet werden. In DNPC und DErPC Membranen ergeben sich die Signale zwischen ca. 180 – 225 ppm der  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung und ca. 4,5 – 8,5 kHz  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolarer Kopplung. Dieser Signalbereich verschiebt sich im Spektrum des Proteins in DEiPC Membranen in den Bereich von ca. 170 – 220 ppm und ca. 4,5 – 8 kHz. Weiterhin tauchen in allen drei Spektren Signale zwischen 20 – 140 ppm und 0 – 3 kHz auf, die dem Pulveranteil, den Termini und den Aminen in der Seitenkette zuzuordnen sind. Die drei experimentell bestimmten Spektren wurden mit simulierten Spektren angefügt, die sich im Tiltwinkel ( $10^\circ$ ,  $15^\circ$  und  $20^\circ$ ) unterschieden. Die beste Übereinstimmung liegt im Bereich von  $12^\circ$  –  $15^\circ$ , woraufhin bei diesem Tiltwinkel zusätzlich eine Variation des Ordnungsparameters von 0,86, 0,92 und 0,98 (0,86, 0,93 und 1 bei DEiPC) durchgeführt wurde. Es zeigt sich daraufhin eine gute Übereinstimmung mit einem Ordnungsparameter von 0,98 für DNPC und DErPC Membranen und einem Ordnungsparameter von 0,93 bei DEiPC Membranen. Die Diederwinkel ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) im Helixrückgrat besitzen einen großen Einfluss auf die Form der PISA-Wheels. In vergangenen Arbeiten von Nevzorov und Opella wird ein Diederwinkel von  $\Phi = -65^\circ$  und  $\Psi = -40^\circ$  vorgeschlagen, der auch bei diesen Simulationen Anwendung fand [221].

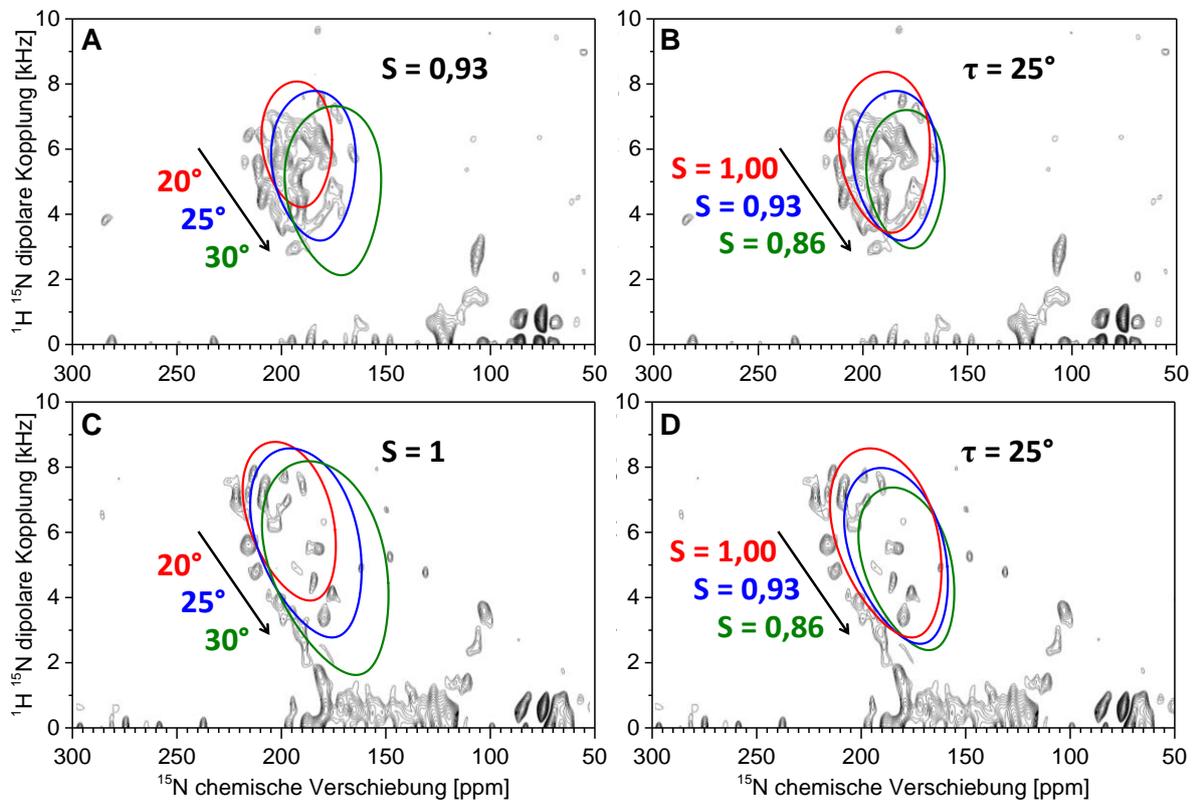


**Abbildung 39:** 2D-Sammy Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in dicken Membranen. **A, C und E:** In DNPC (A), DErPC (C) und DEiPC (E) Membranen ist eine Gruppe von Signalen bei ca. 170 – 225 ppm  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung und ca. 4,5 – 8,5 kHz  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolarer Kopplung zu erkennen. Diese überlappen sich jedoch, daher sind keine separaten, „PISA-Wheel“ angeordneten Signale zu erkennen. Eine exakte Zuordnung der Spektren zu einem Tiltwinkel ist daher nicht möglich und kann nur geschätzt werden. In allen Fällen zeigen simulierte Spektren von  $12^\circ$  –  $15^\circ$  eine gute Übereinstimmung. Der Ordnungsparameter beträgt 0,98 (0,93 bei DEiPC). **B, D und F:** Neben der Variation des Tiltwinkels wurde ebenfalls der Ordnungsparameter bei einem Tiltwinkel von  $15^\circ$  variiert. Dieser zeigt bei DNPC und DErPC bei 0,98 eine gute Übereinstimmung. Lediglich in DEiPC Membranen ist er mit 0,93 etwas tiefer. Der Pulveranteil, die Termini und die  $^{15}\text{N}$ -markierten Seitenketten der Aminosäuren ergeben Signale im Bereich von 20 – 140 ppm und 0 – 3 kHz.

Die Signale von PDGFR $\beta$ -TMD in dünneren DOPC und dünnen DPOPC Membranen zeigen ebenfalls keine charakteristischen „PISA-Wheel“ Anordnungen im Spektrum. In DOPC Membranen ist der Signalbereich bei ca. 170 – 215 ppm und ca. 3 – 7,5 kHz auffallend tief und weiter nach rechts verschoben (Abbildung 40 A und B). Das kann auf einen höheren Tiltwinkel oder niedrigeren Ordnungsparameter hindeuten. Zusätzlich wurden die Simulatio-

nen für dieses Spektrum mit Diederwinkel von  $\Phi = -60^\circ$  und  $\Psi = -45^\circ$  durchgeführt, da sie eine bessere Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum zeigen. In Arbeiten von Page und Kollegen wird dieser Winkel für Membranproteine vorgeschlagen [179]. Die Simulation der Spektren ergibt eine gute Übereinstimmung für Tiltwinkel von  $22^\circ$  bis  $25^\circ$ , bei einem Ordnungsparameter von 0,93. Das deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen aus den 1D-Simulationen.

Das Spektrum von PDGFR $\beta$ -TMD in DPOPC zeigt zwar einzelne Signalpunkte, doch sind diese nicht in Form des typischen „PISA-Wheels“ angeordnet. Mit einem Ordnungsparameter von 1 zeigen Simulationen der Tiltwinkel von  $22^\circ$  –  $25^\circ$  eine gute Übereinstimmung. Der Pulveranteil, die Termini und die Seitengruppen Amine erscheinen hier deutlich stärker bei ca. 50 – 200 ppm und ca. 0 – 2 kHz.



**Abbildung 40:** 2D-Sammy Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in dünneren Membranen. **A:** Im Gegensatz zu allen anderen simulierten Spektren, ist hier bei den Diederwinkeln von  $\Phi = -60^\circ$  und  $\Psi = -45^\circ$  eine bessere Übereinstimmung zu erkennen. Bei einem Ordnungsparameter von 0,93 zeigt die Simulation des Tiltwinkels zwischen  $22^\circ$  und  $25^\circ$  den besten Fit. **B:** Ebenfalls wurde der Ordnungsparameter von (A) variiert, so zeigt er bei 0,93 eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. **C und D:** Die Signale in DPOPC Membranen zeigen sich zwar separiert, doch nicht in der „PISA-Wheel“ Anordnung. Das simulierte Spektrum bei  $25^\circ$  und  $S_{mol} = 1$  ergibt einen guten Fit. Auffallend ist der große Bereich bei 50 – 200 ppm und ca. 0 – 2 kHz, der starke Signale zeigt. Diese sind auf den unorientierten Teil der Proteine, sowie die Seitenketten zurückzuführen.

**Tabelle 12:** Ergebnisse der 1D- und 2D-Simulationen für den Tiltwinkel  $\tau$  und Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$ . Der Vergleich zeigt nur in DErPC, DEiPC und DOPC eine Übereinstimmung des Tiltwinkels der 1D- und 2D-Simulationen. Die Ordnungsparameter liegen bei den 2D Simulationen etwas tiefer.

Lipidsystem	1D Tiltwinkel $\tau$	1D $S_{\text{mol}}$	2D Tiltwinkel $\tau$	2D $S_{\text{mol}}$
DNPC	$7^\circ \pm 3^\circ$	1	$12^\circ - 15^\circ$	0,98
DErPC	$14^\circ \pm 1^\circ$	1	$12^\circ - 15^\circ$	0,98
DEiPC	$15^\circ \pm 1^\circ$	1	$12^\circ - 15^\circ$	0,93
DOPC	$24^\circ \pm 1^\circ$	1	~25	0,93
DPoPC	$29^\circ \pm 1^\circ$	1	~25	1

## 4.2 Lokalisation der Proteine in zweiphasigen Riesen-Vesikeln

Im vorherigen Abschnitt wurde bereits beschrieben, dass sog. „Lipid-Rafts“ als Mikrodomänen in eukaryotischen Zellmembranen eine wichtige Rolle in der Funktion und Sortierung von Membranproteinen spielen. Die hydrophobe Dicke dieser Membrandomänen ist durch den hohen Anteil an Sphingomyelin (SM) und Cholesterin (Chol) erhöht, da die Kohlenwasserstoffketten eine dichtere Packung einnehmen. Das setzt jedoch auch ihre Fluidität herab. Einige Untersuchungen zeigen, dass die Funktionalität des PDGF-Rezeptors eng mit der Lokalisation in diesen Lipiddomänen korreliert [220]. So konnte gezeigt werden, dass der PDGF-Rezeptor eine geringere Aktivität aufwies, sobald er seine Lokalisation aus den „Raft-ähnlichen“ Domänen in die fluide Lipidphase verlagerte [222]. Es ist daher anzunehmen, dass PDGFR $\beta$ -TMD sich hauptsächlich außerhalb der Lipid-Rafts aufhalten sollte. Bei E5 ist dies ebenfalls zu vermuten, da es sich, trotz der langen TMD, in lebenden Zellen hauptsächlich im Golgi-Apparat aufhält. Damit trotz E5 allen Proteinsortierungsmechanismen der Zelle, die sicherstellen, dass Proteine mit einer langen TMD u.a. auch mit sog. „Raft-Carrier“ in die Zytoplasmamembran transportiert werden [107]. Weiterhin kann im nächsten Schritt untersucht werden, ob sich durch die Interaktion die Lokalisation ändert, da der Rezeptor durch das E5 Protein in einen aktiven Zustand versetzt wird (siehe dazu Abschnitt 4.4.2).

Um diese Lokalisation bzw. Affinität der Proteine zu den Mikrodomänen experimentell zu untersuchen, eignen sich Riesen-Vesikel. Diese künstlichen Modellmembransysteme für eukaryotische Zellen besitzen eine Zell-ähnliche Größe und die inneren bzw. äußeren Bedingungen können mit geeigneten Puffern dem Zytoplasma bzw. dem extrazellulären Milieu nachempfunden werden. Weiterhin ist es möglich Riesen-Vesikel herzustellen, bei denen zwei Lipidphasen koexistieren und in Mikrodomänen über das Vesikel verteilt sind. Dazu sind bei der Vesikelherstellung bestimmte Lipidmischungen aus SM, Chol und einem Phospholipid zu verwenden. Kühlt das Vesikel nach der Herstellung ab, so bilden sich die „Raft-ähnlichen“, SM- und Chol-reichen Domänen (Lo Phase). Diese Phasenseparation kann man

fluoreszenzspektroskopisch sichtbar machen. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde ausschließlich die fluide, Phospholipid-Phase (L<sub>d</sub>) mit dem Farbstoff Dil angefärbt. Dieser besitzt eine sehr hohe Affinität zu diesen Lipid-Phasen. An einem Spinning-Disk Laser-Scanning Konfokalmikroskop erfolgte die Anregung bei 561 nm und die Detektion bei 607 nm. Daher konnte auf eine Anfärbung der Raft-Domänen verzichtet werden, die als dunkle Bereiche der Membran zu erkennen sind. Ein molares Verhältnis von Dil zu Lipiden erwies sich mit 1:100000 als ausreichend bei diesen Experimenten.

Bei der Wahl des Sphingomyelins wurde darauf geachtet, eine Mischung zu verwenden, welche eine ausreichend hohe Menge an langen Kohlenwasserstoffketten beinhaltet. Hierzu eignete sich SM-Extrakt aus dem Schweinehirn (SMbrain). Wie in Tabelle 13 zu sehen ist, beinhaltet SMbrain einen hohen Anteil an 18:0 und C20:1 Kohlenstoffketten.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung des Sphingomyelins aus dem Schweinehirn (SMbrain) (von Avanti®).

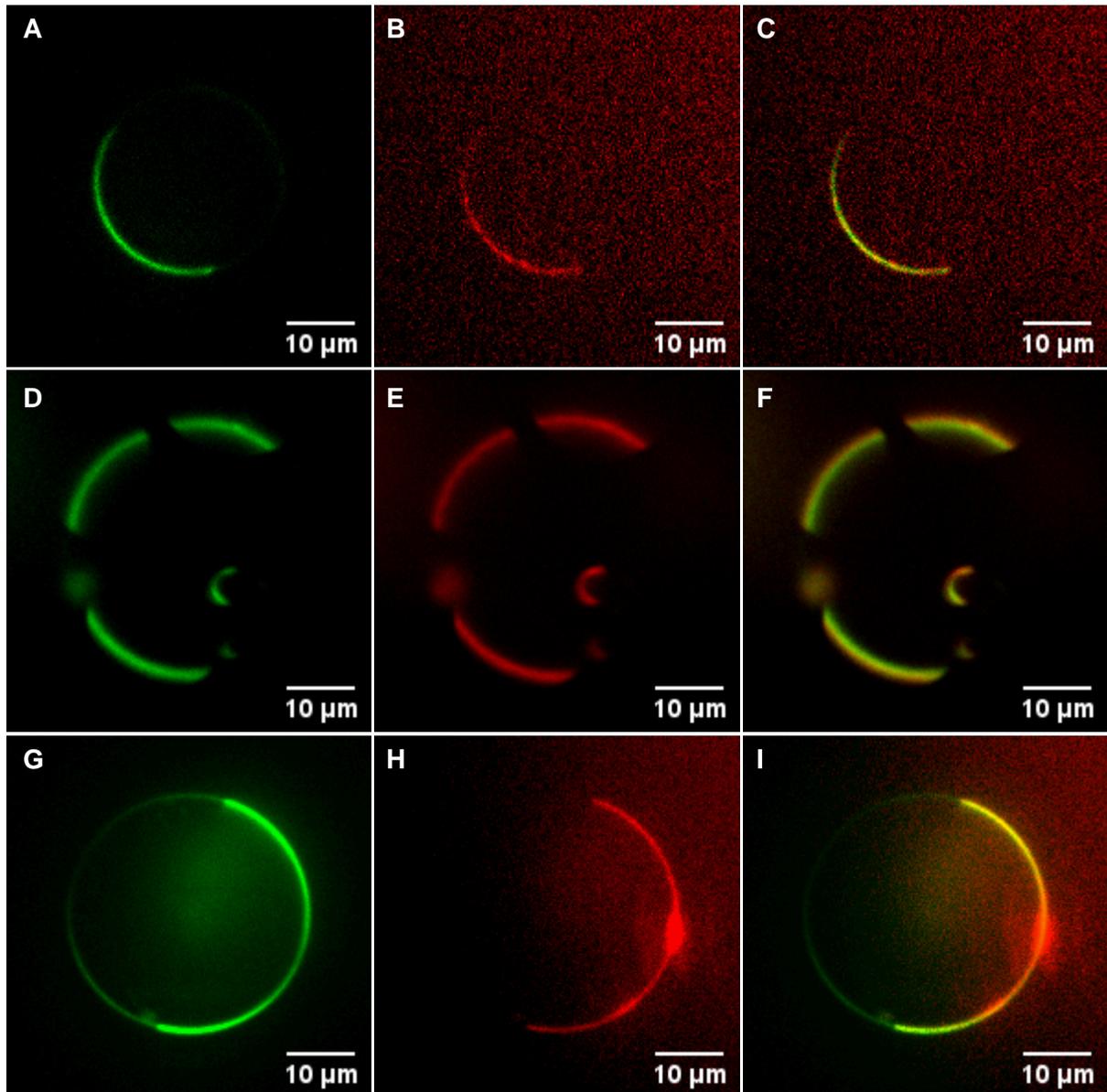
Kettenlänge	SM Brain Porcine [%]
16:0	2
18:0	50
20:0	5
22:0	7
24:0	5
20:1	21
Unbekannt	10

Ein gängiges Lipid für die L<sub>d</sub>-Phase ist DOPC (C18:1). Um aber den Dickenunterschied zwischen den verschiedenen Domänen noch zu vergrößern, wurde ebenfalls DPOPC (C16:1) und DMOPC (C14:1) verwendet. Somit ergaben sich drei Membransysteme (Tabelle 14), aus denen Riesen-Vesikel zur Untersuchung hergestellt wurden.

**Tabelle 14:** Verwendete Membransysteme zur Bestimmung der Lokalisation von E5 bzw. PDGFRβ-TMD.

Membransystem	Zusammensetzung	Verhältnis
1	DOPC/SMbrain/Cholesterin	(1:2:1)
2	DPOPC/SMbrain/Cholesterin	(1:2:1)
3	DMOPC/SMbrain/Cholesterin	(1:2:1)

Um die Proteine fluoreszenzspektroskopisch sichtbar zu machen, wurden sie kovalent mit ATTO647N markiert (siehe dazu Abschnitt 3.2.3). Dafür wurden E5\_1-38 und die Cysteinmutante PDGFR $\beta$ -TMD\_S495C genutzt (siehe Abschnitt 3.2.3). Die Anregung dieses Farbstoffs erfolgte bei 640 nm und die Detektion bei 685 nm. Nach erfolgter Aufreinigung der markierten Proteine wurden diese in den Vesikelmembranen rekonstituiert. Bei der Wahl des P:L Verhältnisses stellte sich heraus, dass eine zu hohe Proteinkonzentration die Ausbeute an Riesen-Vesikel dramatisch reduzierte. Ein P:L Verhältnis von 1:5000 bis 1:20000 ergab gute Ausbeuten an Riesen-Vesikel und das Fluoreszenzsignal war ausreichend hoch. Auffallend war dabei, dass sich die Konzentration der Farbstoffe in der Vesikelmembran innerhalb einer Probe teils erheblich unterschied. Da bei diesen Untersuchungen jedoch nur das qualitative Signal benötigt wurde, konnte dieser Umstand in Kauf genommen werden. Für die Bestimmung der Lokalisation von E5 wurden Riesen-Vesikel mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 40  $\mu\text{m}$  verwendet. Alle beobachteten Vesikel zeigten eindeutig, dass sich E5 ausschließlich in der Ld Phase befindet. Diese Beobachtung wurde bei allen untersuchten Membransystemen gemacht, was mit den exemplarisch gezeigten Aufnahmen in Abbildung 41 gezeigt werden soll. Analoge Experimente mit fluoreszenzmarkiertem PDGFR $\beta$ -TMD in Riesen-Vesikeln zeigen ebenfalls die Lokalisation ausschließlich in der Ld Phase (Abbildung 42).

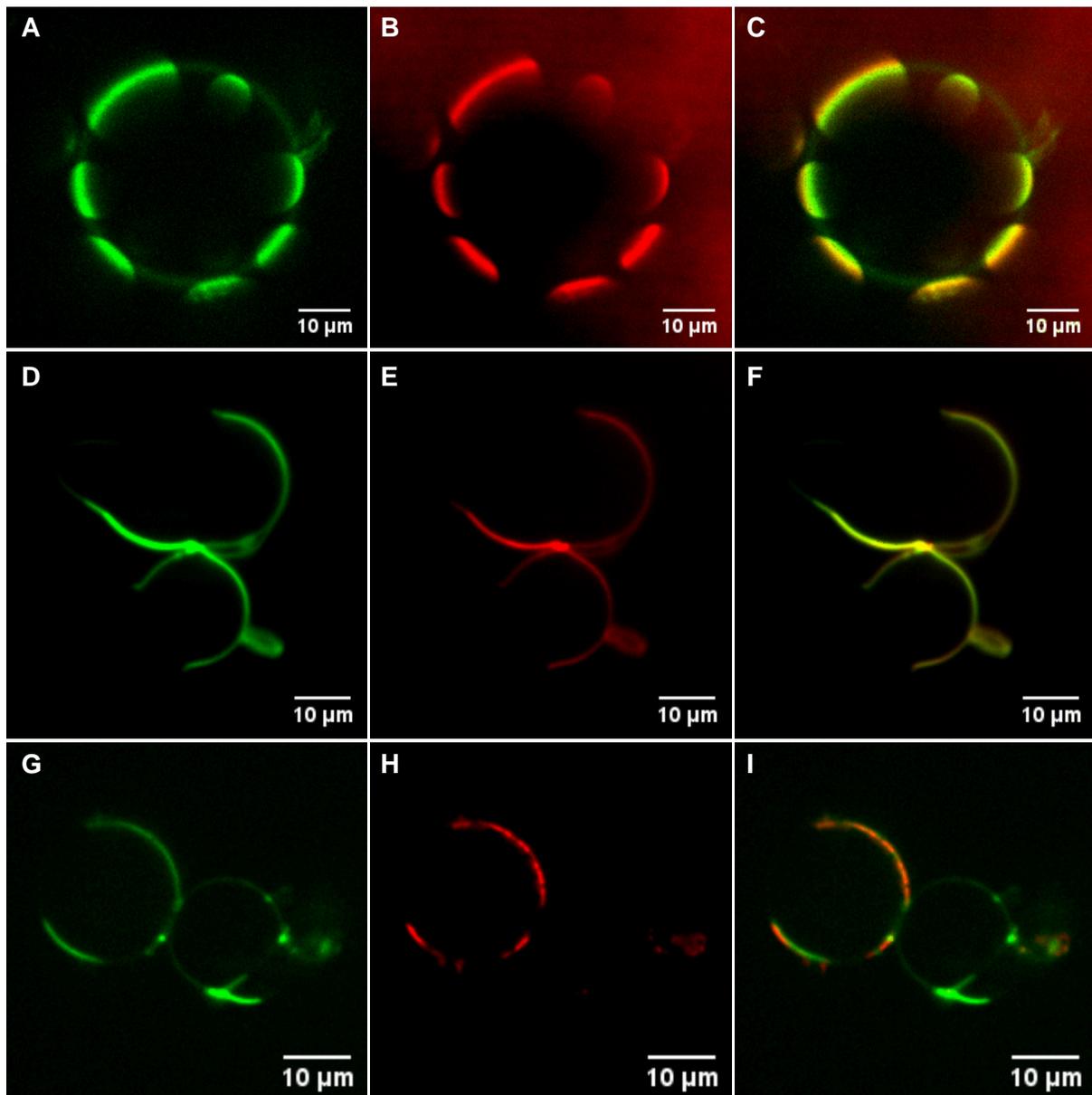


**Abbildung 41:** Lokalisation von E5\_1-38-ATTO647N in zweiphasigen Riesen-Vesikeln. Der grüne Kanal (A, D und G) zeigt Dil, welches hauptsächlich in der Ld Phase konzentriert ist. Der rote Kanal (B, E und H) zeigt E5\_1-38-ATTO647N. Werden die Kanäle überlagert (C, F und I) so ist zu erkennen, dass E5\_1-38-ATTO647N ausschließlich in der Ld Phase lokalisiert ist.

**A – C:** SMbrain/DOPC/Cholesterin (1:2:1).

**D – F:** SMbrain/DPoPC/Cholesterin (1:2:1).

**G – I:** SMbrain/DMoPC/Cholesterin (1:2:1).



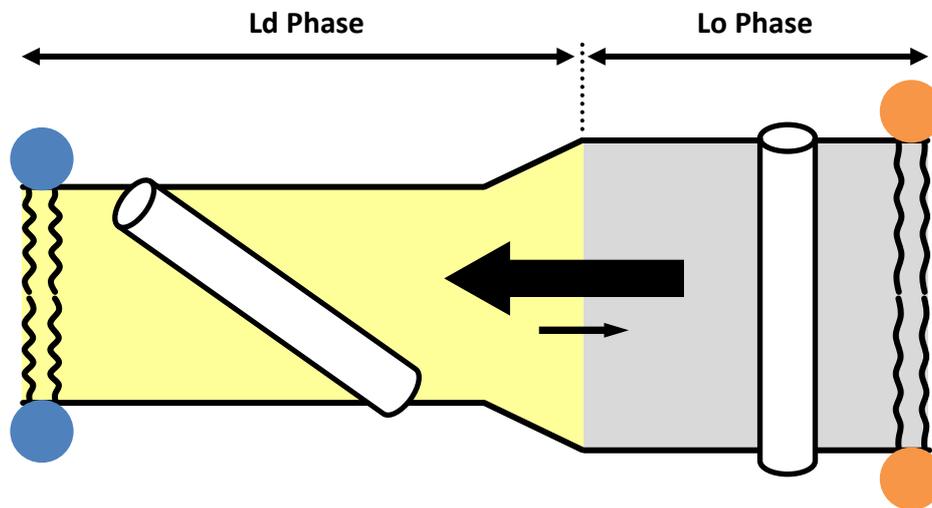
**Abbildung 42:** Lokalisation von PDGFR $\beta$ -TMD\_S495C-ATTO647N in zweiphasigen Riesen-Vesikeln. Der grüne Kanal (**A**, **D** und **G**) zeigt Dil, welches hauptsächlich in der Ld Phase konzentriert ist. Der rote Kanal (**B**, **E** und **H**) zeigt PDGFR $\beta$ -TMD\_S495C-ATTO647N. Werden die Kanäle überlagert (**C**, **F** und **I**) so ist zu erkennen, dass PDGFR $\beta$ -TMD\_S495C-ATTO647N ausschließlich in der Ld Phase lokalisiert ist.

**A – C:** SMbrain/DOPC/Cholesterin (1:2:1).

**D – F:** SMbrain/DPoPC/Cholesterin (1:2:1).

**G – I:** SMbrain/DMoPC/Cholesterin (1:2:1).

Es ist erstaunlich, dass sich die Proteine in der dünneren Ld Phase aufhalten, in der der hydrophobe Mismatch einen höheren Neigungswinkel der Helices erzwingt. Daher scheint eine „passende“ Dicke der Membran mit der TMD kein ausreichendes Kriterium für die Lokalisation zu sein. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 schematisch dargestellt.



**Abbildung 43:** Ergebnis zur Untersuchung der Lokalisation von PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5 in zwei-phasigen Riesen-Vesikeln. In jedem Membransystem ergab sich eine hohe Affinität der Proteine (weiße Zylinder) zu der dünneren, fluiden Ld Phase (gelb), obwohl es den Proteinen möglich gewesen wäre, sich in der dicken, „Raft-ähnlichen“ Lo Phase (grau) nahezu vollständig aufzurichten. Daher ist die Diskrepanz zwischen der hydrophoben Dicke der Membran und der hydrophoben Länge der TMD kein alleiniges Argument für den bevorzugten Aufenthaltsort der Proteine.

### 4.3 Bestimmung der Stöchiometrie durch FRET

Neben den Strukturuntersuchungen mittels Festkörper-NMR, können mittels FRET-Experimenten Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht werden. Mit dem im Abschnitt 1.3.2 vorgestellten FRET-Assay ist man auch in der Lage, eine stöchiometrische Bestimmung des oligomeren Zustands zweier interagierender Proteine durchzuführen. Weiterhin liefert der Assay Informationen über die Abstände der Farbstoffe, die an die Proteine gekoppelt sind. Durch die nachfolgende Verknüpfung der FRET-Ergebnisse mit den Erkenntnissen der Strukturuntersuchung, kann man das Verhalten der Proteine in verschiedenen Membranen besser erklären.

Als Membransystem für die FRET-Experimente wurden zwei Lipide gewählt, die sich in ihrer Kettenlänge deutlich unterscheiden, um einen evtl. auftretenden Effekt der Membrandicke auf den oligomeren Zustand in aller Deutlichkeit zu erhalten (Tabelle 15).

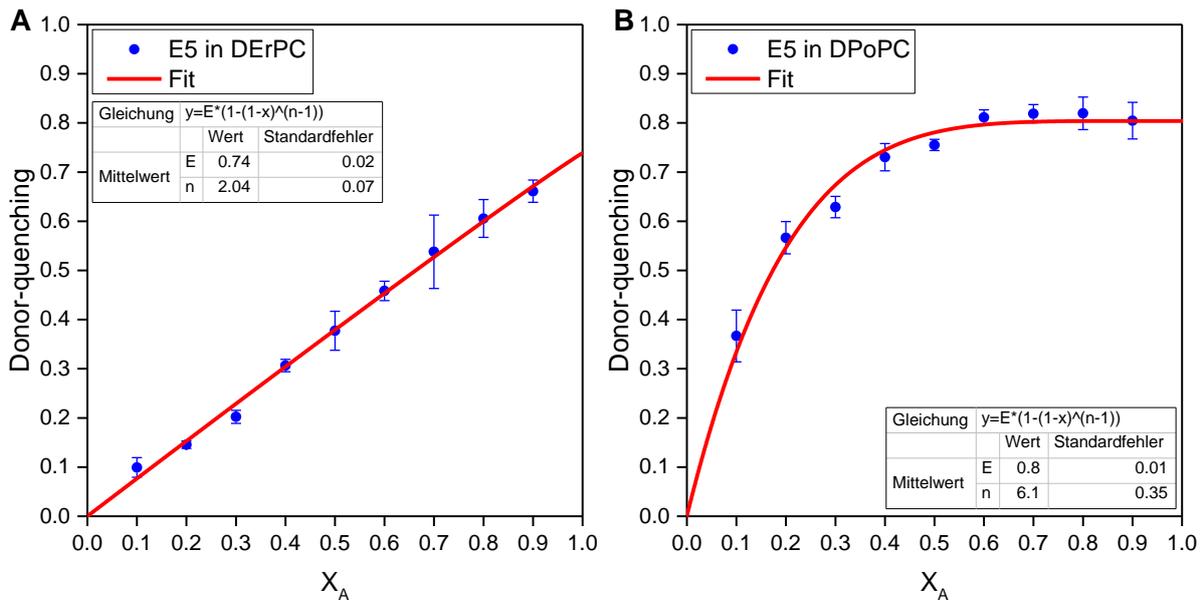
**Tabelle 15:** Verwendeten Lipide für den FRET-Assay. Sie unterscheiden sich nur in ihrer Kettenlänge bzw. in den daraus resultierenden Membrandicken. Die Berechnung der hydrophoben Membrandicke erfolgte nach [215].

Lipid	Kettenlänge	Doppelbindung	Membrandicke [Å]
DErPC	C22	1	34,4
DPoPC	C16	1	23,0

Um die Stöchiometrie des oligomeren Zustands von E5 bzw. PDGFR $\beta$ -TMD zu bestimmen, wurden die Cysteinmutanten mit den entsprechenden Farbstoffen markiert (siehe Abschnitt 3.3.4). Daraufhin wurden Proben mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Akzeptor und Donor gemäß Tabelle 7 hergestellt und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Das erhaltene Donor-Quenching wurde gegen den Akzeptor-Molenbruch  $x_A$  aufgetragen und gemäß Gleichung (18) angefitet. Hierbei deutet ein linearer Anstieg das Vorhandensein von Dimeren an. Bei einer Krümmung der Kurve kann von höheren Oligomeren ausgegangen werden. Je höher der Energieübertrag, der durch Extrapolation für  $x_A \rightarrow 1$  erhalten wird, ausfällt, desto geringer ist der Abstand der Farbstoffe voneinander.

Bei E5 in dicken Membranen zeigt der Fit ( $n = 2$ ) eine Gerade, was eindeutig auf einen dimeren Zustand hinweist (Abbildung 44 A). Der Energieübertrag liegt hier bei  $E = 0,74 \pm 0,02$ . Nach Gleichung (1) berechnet sich hieraus ein Abstand der beiden Farbstoffe von  $R = 34 \pm 0,6$  Å. Da E5 eine Länge von über 50 Å besitzt, bedeutet dies, dass E5 mit einer parallelen Anordnung der Helices dimerisiert.

In dünnen Membranen zeigt E5 ein völlig anderes Verhalten. Hier legt die Auswertung einen hexameren Zustand nahe ( $n = 6$ ) (Abbildung 44 B). Jedoch erscheint es wahrscheinlicher, dass es sich um ein Cluster handelt. Da der FRET-Assay die genaue Verteilung eines Clusters nicht wiedergeben kann, könnte es sich hier um eine Anordnung handeln, die im Mittel aus drei Dimeren besteht, die unspezifisch miteinander interagieren. Der Energieübertrag liegt bei  $E = 0,8 \pm 0,01$ , somit ergibt sich ein mittlerer Abstand von  $R = 31,7 \pm 0,4$  Å. Vergleicht man diesen Abstand mit dem oben in dicken Membranen erhaltenen Wert, so könnte dies auf eine dichtere Packung der E5 Dimere in dünnen Membranen hindeuten.

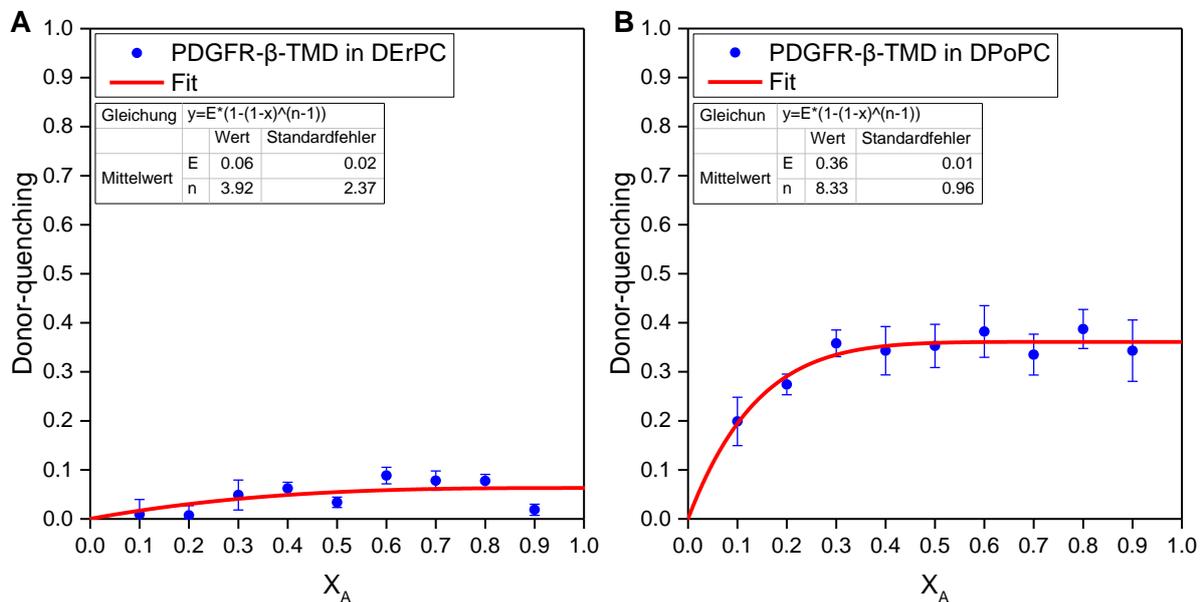


**Abbildung 44:** Bestimmung der Stöchiometrie von E5. Die Experimente der verschiedenen Molenbrüche des Akzeptors  $x_A$  (blau) wurden mit der im Diagramm gezeigten Gleichung gefittet (rote Linie) **A:** In dicken (DErPC) Membranen ist ein Dimer zu erkennen ( $n = 2$ ), mit einem Energieübertrag von  $E = 0,74 \pm 0,02$ . Daraus lässt sich ein Abstand von  $R = 34 \pm 0,6 \text{ \AA}$  errechnen. **B:** In dünnen (DPOPC) Membranen ergibt der Fit  $n = 6$  (Hexamer), jedoch ist hier eine unspezifische Clusterung von drei Dimeren naheliegend.

Bei PDGFR $\beta$ -TMD zeigt sich ein anderes Bild: In dicken Membranen ergibt der Fit der Datenpunkte einen tetrameren Zustand ( $n = 4$ ), bei einem Energieübertrag von  $E = 0,06 \pm 0,02$  (Abbildung 45 A). Auffallend dabei ist der relativ große Standardfehler von 2,4. Der Energieübertrag würde einem Abstand der Farbstoffe von  $R = 63 \pm 4 \text{ \AA}$  entsprechen. Da das Protein aber ca.  $50 \text{ \AA}$  lang ist und parallel interagiert, erscheint die folgende Situation wahrscheinlicher: Bei einer schwachen Affinität zur Interaktion von PDGFR $\beta$ -TMD mit sich selbst, liegt im Mittel nur ein geringer Anteil der Proteine als Dimer vor, der Rest ist monomer. Die Ergebnisse eines FRET-Assay würden dann im Mittel einen sehr geringen Energietransfer anzeigen, da die Monomere nicht zum FRET beitragen. Weiterhin scheint diese Analyse mit einem deutlichen Fehler behaftet zu sein, wie die große Standardabweichung des Wertes des Oligomerisierungszustandes anzeigt. Somit lässt sich sagen, dass PDGFR $\beta$ -TMD in dicken Membranen eine sehr schwache Affinität zur Interaktion besitzt und eine genaue Bestimmung des oligomeren Zustands der interagierenden Proteine nicht möglich ist.

Die Auswertung des FRET-Assay von PDGFR $\beta$ -TMD in dünnen Membranen ergibt mit  $n = 8$  einen Oktamer. Doch auch hier wird es sich ähnlich wie bei E5 um ein unspezifisches Cluster handeln (Abbildung 45 B). Wie bereits beschrieben wurde, soll PDGFR $\beta$ -TMD eine natürliche Affinität zur Dimerisierung besitzen [41]. So könnte daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem „Oktamer“ um ein unspezifisches Cluster aus 4 Dimeren handeln könnte. Auch für PDGFR $\beta$ -TMD ist diese Membran unnatürlich dünn, was eine Clusterung begünstigen würde. Der niedrige Energieübertrag von  $E = 0,36 \pm 0,01$  ( $R = 44 \pm$

0,3 Å) spricht zusätzlich für einen hohen und nicht zu vernachlässigenden Anteil an Monomeren in der Probe. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse nochmal zusammengefasst.



**Abbildung 45:** Bestimmung der Stöchiometrie von PDGFR $\beta$ -TMD. Die Experimente der verschiedenen Molenbrüche des Akzeptors  $x_A$  (blau) wurden mit der im Diagramm gezeigten Gleichung gefittet (rote Linie) **A:** In dicken (DErPC) Membranen ist eine sehr schwache Interaktion zu erkennen. Daher kann eine genaue Aussage über den oligomeren Zustand oder den Abstand der Fluorophore nicht getroffen werden. **B:** In dünnen (DPoPC) Membranen ist wegen des geringen Energieübertrages davon auszugehen, dass hauptsächlich Monomere vorliegen. Zusätzlich kommt es wahrscheinlich vereinzelt zu einer Clusterung der Proteine, wobei es sich um eine unspezifische Interaktion von vier Dimeren handeln könnte.

**Tabelle 16:** Ergebnisse des FRET-Assay zur Bestimmung der Stöchiometrie. Der oligomere Zustand  $n$  ist nur bei E5 in DErPC genau zu bestimmen, bei den anderen Experimenten ergibt sich wahrscheinlich eine Verteilung von verschiedenen, durch Clusterung der dimeren Grundeinheiten aufgebauten Oligomere. Der Abstand des FRET-Paares, resultierend aus dem Energieübertrag, hat nur dann eine Aussagekraft, wenn keine Monomere vorliegen.

Protein	Lipid	Oligomer nominell ( $n =$ )	Oligomer real	Energieübertrag ( $E =$ )	Abstand [Å]
E5	DErPC	2	2	$0,74 \pm 0,02$	$34 \pm 0,6$
E5	DPoPC	6	2	$0,80 \pm 0,01$	$32 \pm 0,4$
PDGFR	DErPC	4	1	$0,06 \pm 0,02$	$63 \pm 4,0$
PDGFR	DPoPC	8	1	$0,36 \pm 0,01$	$44 \pm 0,3$

## 4.4 Interaktion von PDGF-Rezeptor $\beta$ -TMD und E5

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten E5 bzw. PDGFR $\beta$ -TMD getrennt voneinander untersucht worden sind, widmet sich der nachfolgende Abschnitt gezielt der Interaktion bzw. der Komplexbildung zwischen E5 und PDGFR $\beta$ -TMD. Dafür wird zu Anfang die Veränderung der Rekonstitution und Orientierung der einzelnen Proteine beschrieben, die im Zuge der Komplexbildung mittels  $^{15}\text{N}$ -Festkörper-NMR beobachtet werden konnten.

Danach wird darauf eingegangen, inwieweit sich die Lokalisation der Proteine in zwei-phasigen Riesen-Vesikeln durch die Interaktion verändert. Anschließend werden erste Ergebnisse einer neuen Methode vorgestellt, die auf der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie basiert und mit der es möglich ist, die Diffusion und Dynamik von Membranproteinen in deren Interaktionen zu untersuchen. Schlussendlich werden die Ergebnisse der Interaktionsexperimente mittels FRET beschrieben, um Hinweise über die Affinität der Proteine zueinander und deren molares Verhältnis im Komplex zu erhalten.

### 4.4.1 $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Interaktionsexperimente

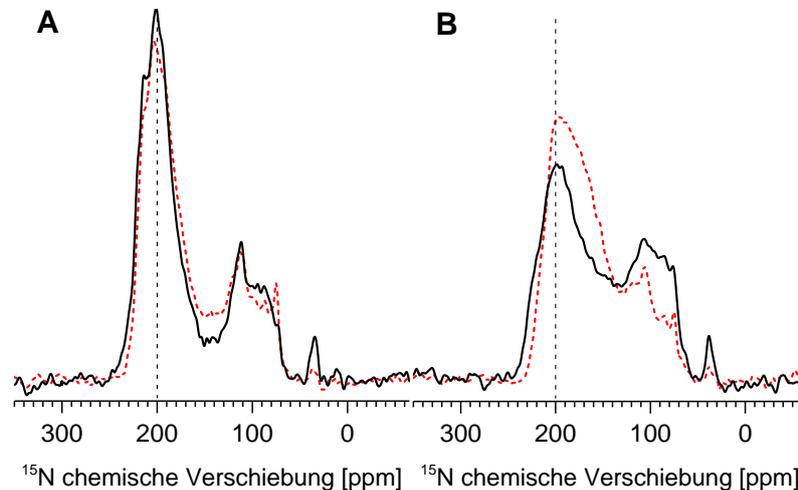
Bei der Helix-Helix Wechselwirkung von E5 mit dem Rezeptor wird dieser in eine aktive Konformation überführt [75]. Mit  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Experimenten ist es möglich, das Rekonstitutionsverhalten und die Änderung des Tiltwinkels der Proteine bei dieser Komplexbildung zu analysieren. Um den Einfluss von E5 auf den Tiltwinkel von PDGFR $\beta$ -TMD zu untersuchen, wurde unmarkiertes  $\Delta\text{E5}$  mit  $^{15}\text{N}$ -vollmarkiertem PDGFR $\beta$ -TMD gemischt (1:1) und in dünneren (DOPC) und dicken (DErPC) Membranen rekonstituiert.

Das Spektrum von PDGFR $\beta$ -TMD in DErPC zeigt mit und ohne  $\Delta\text{E5}$  eine gute Rekonstitution und einen geringen Pulveranteil (Abbildung 46 A). Dabei ist das transmembran orientierte Signal bei 200 ppm von PDGFR $\beta$ -TMD unter dem Einfluss von E5 nur minimal höher und vergleichbar schmaler als in Abwesenheit von E5. Die Bestimmung des Tiltwinkels mittels Simulationen ergibt einen Wert von  $9^\circ$ . Damit ist dieser um  $5^\circ$  geringer als im Einzalexperiment von PDGFR $\beta$ -TMD ( $14^\circ$ ). Diese Differenz der Tiltwinkel kann bei diesen  $\alpha$ -helikalen Membranproteinen jedoch als marginal angesehen werden.

In DOPC Membranen zeigt der orientierte Teil des Spektrums von PDGFR $\beta$ -TMD in Wechselwirkung mit  $\Delta\text{E5}$  eine etwas schmalere Linienform, die nach links verschoben ist. Der Pulveranteil ist dabei erhöht (Abbildung 46 B). Der daraus berechnete Tiltwinkel von PDGFR $\beta$ -TMD von  $15^\circ$  ist dabei um  $9^\circ$  geringer als ohne Wechselwirkung mit E5 ( $24^\circ$ ). Das könnte darauf hindeuten, dass PDGFR $\beta$ -TMD in dünneren Membranen durch die Interaktion mit E5 in eine weniger geneigte Position gezwungen wird, die sonst nur in dickeren Membranen zu beobachten ist. Jedoch konnte das Ergebnis in dieser Ausprägung nicht reproduziert

werden. Wiederholungsexperimente der Interaktion ergaben eine breitere Linienform. Somit ist der Unterschied des Tiltwinkels als nicht signifikant anzusehen.

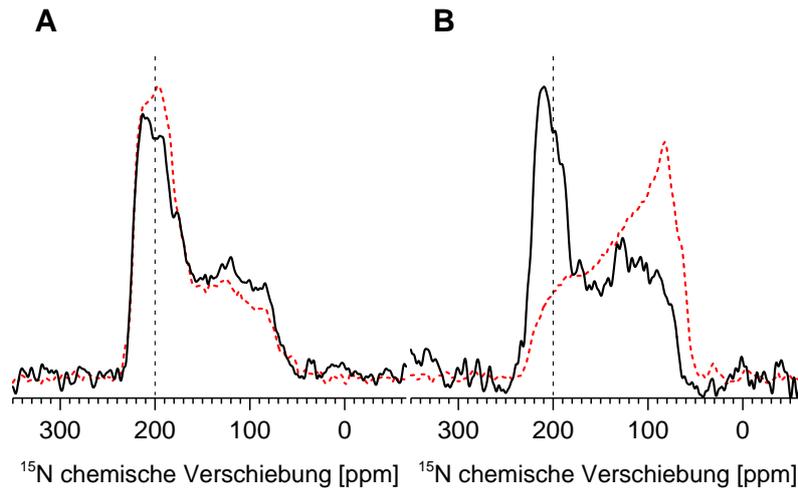
Zusammenfassend kann man feststellen, dass PDGFR $\beta$ -TMD durch die Komplexbildung mit E5 nur geringfügig die Rekonstitution und den Tiltwinkel ändert.



**Abbildung 46:** Vergleich der  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD und dessen Komplex mit unmarkiertem  $\Delta\text{E5}$ . **A:** Das Spektrum von PDGFR $\beta$ -TMD in DErPC Membranen zeigt in Wechselwirkung mit  $\Delta\text{E5}$  (schwarz) nur marginale Unterschiede in Rekonstitution und Orientierung als ohne  $\Delta\text{E5}$  (rot gestrichelt). **B:** In DOPC Membranen ist bei der Interaktionsprobe (schwarz) eine schmalere Linienform bei 200 ppm zu beobachten, ebenfalls erscheint dieses Signal nach links verschoben. Der Pulveranteil ist im Spektrum des Einzelspektrums von PDGFR $\beta$ -TMD (rot gestrichelt) etwas niedriger. Der Tiltwinkelunterschied beträgt hier  $9^\circ$ .

Der umgekehrte Effekt wurde ebenfalls untersucht, indem  $^{15}\text{N}$ -vollmarkiertem  $\Delta\text{E5}$  mit unmarkiertem PDGFR $\beta$ -TMD in den gleichen Lipidsystemen rekonstituiert wurde. Das Ergebnis in DErPC Membranen zeigt eine kleine Veränderung von  $\Delta\text{E5}$  im Komplex mit PDGFR $\beta$ -TMD (Abbildung 47 A). Doch diese Veränderung wirkt sich nicht auf den simulierten Tiltwinkel aus. In beiden Fällen beträgt er  $15^\circ$ . Einen starken Effekt auf  $\Delta\text{E5}$  durch die Komplexbildung mit PDGFR $\beta$ -TMD ist in DOPC Membranen zu beobachten (Abbildung 47 B). Hier zeigt sich erstmals ein starkes Signal von  $\Delta\text{E5}$  bei ca. 200 ppm, was einen hohen Anteil an rekonstituierten Proteinen bedeutet.

Dieses Ergebnis ist bemerkenswert und zeigt, dass in Anwesenheit von PDGFR $\beta$ -TMD die sonst übliche Aggregation von E5 in dünnen Membranen deutlich herabgesetzt wird. Gleichzeitig wurde ein Tiltwinkel von  $9^\circ$  berechnet. Dieser erscheint für DOPC Membranen relativ gering, da E5 eine ähnlich lange TMD wie PDGFR $\beta$ -TMD besitzt. Es wäre daher zu erwarten, dass der Tiltwinkel in einem Bereich von  $20^\circ - 30^\circ$  liegt.



**Abbildung 47:** Vergleich der  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von  $\Delta\text{E5}$  und dessen Komplex mit unmarkiertem PDGFR $\beta$ -TMD. **A:** Das Spektrum von  $\Delta\text{E5}$  in DErPC Membranen zeigt in Wechselwirkung mit PDGFR $\beta$ -TMD (schwarz) eine geringfügig verschlechterte Orientierung als ohne PDGFR $\beta$ -TMD (rot gestrichelt). Diese kleine Änderung hat jedoch keine Auswirkung auf den Tiltwinkel. **B:** In DOPC Membranen ist bei der Interaktionsprobe (schwarz) eine sehr schmale Linienform 200 ppm zu beobachten. Das Einzelexperiment von  $\Delta\text{E5}$  in DOPC (rot gestrichelt) zeigt dagegen nur ein Pulverspektrum, was durch aggregiertes Protein hervorgerufen wird. Daher scheint die Anwesenheit von PDGFR $\beta$ -TMD die Rekonstitution von  $\Delta\text{E5}$  erheblich zu verbessern.

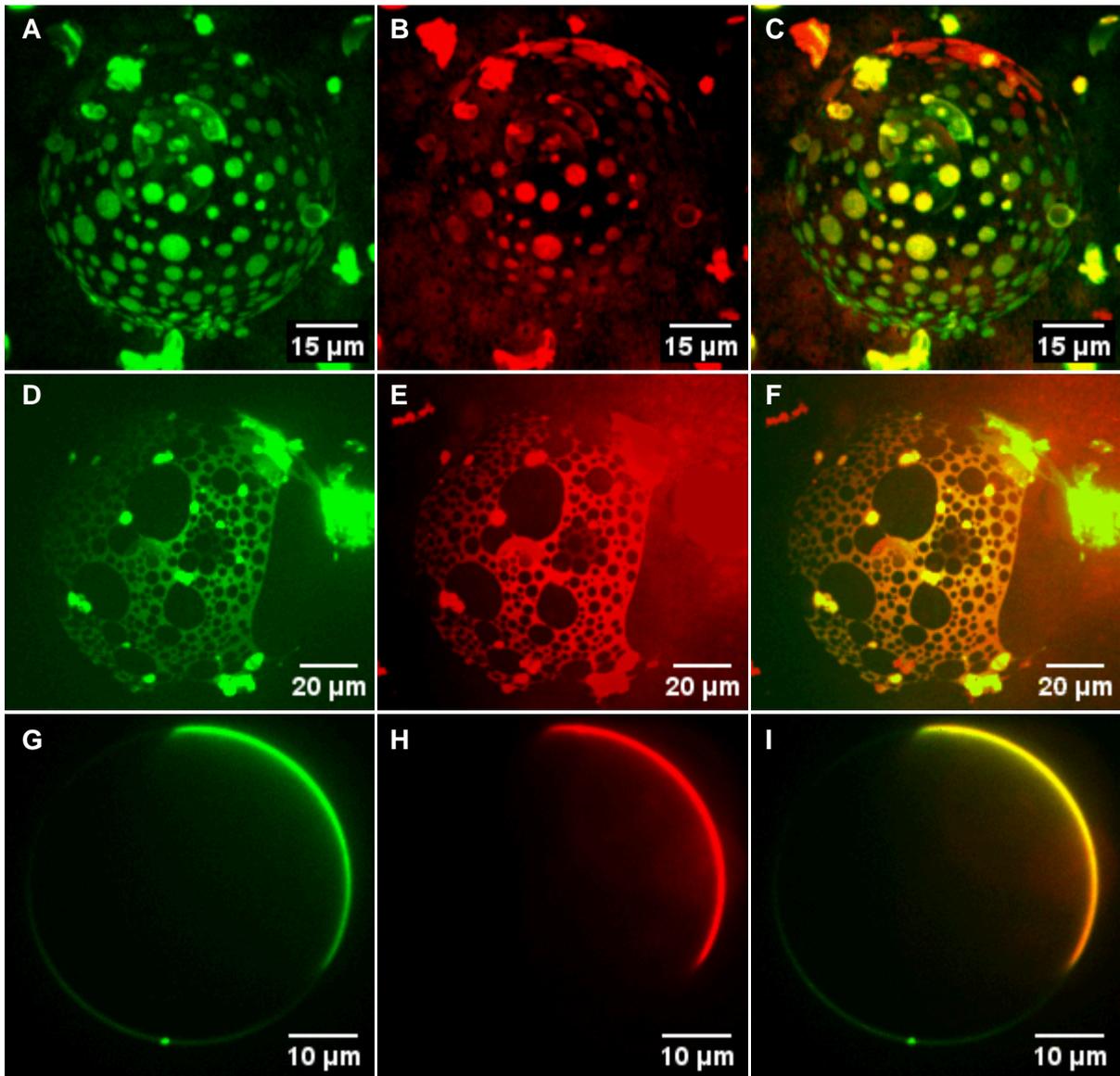
#### 4.4.2 Lokalisation des Komplexes PDGFR/E5 in Riesen-Vesikeln

Die Überprüfung der Lokalisation von E5 bzw. PDGFR $\beta$ -TMD ergab eindeutig, dass die Proteine, wenn sie einzeln vorliegen, sich ausschließlich in den fluiden, dünneren Phospholipid-Domänen aufhalten. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung vergangener Untersuchungen, in denen sich der inaktive PDGF-Rezeptor in diesen fluiden, Ld Lipid-Phasen aufhalten soll [222]. Da das E5 Protein den Rezeptor in einen aktiven Zustand versetzt, wäre zu vermuten, dass der entstandene Komplex seine Lokalisation in die Raft-Domänen verlagert.

Um diese Lokalisation des Komplexes von E5 und PDGFR $\beta$ -TMD zu überprüfen, wurden Experimente analog zu Abschnitt 4.2 durchgeführt. Zusätzlich, zu fluoreszenzmarkiertem E5 bzw. PDGFR $\beta$ -TMD, wurde der jeweilige Interaktionspartner unmarkiert hinzugegeben.

Die Erscheinungsform der meisten Vesikel war hauptsächlich dadurch gekennzeichnet, dass die Lipid-Phasen zusammenhängend in zwei klar definierten Bereichen zu erkennen waren (Abbildung 48 G). Erfolgt die Aufnahmen der Vesikel jedoch zu einem frühen Zeitpunkt nach der Herstellung, so wurden Vesikel gefunden, in denen sich unmittelbar nach der Separation eine der beiden Phasen zu vielen „Inseln“ formierte (Abbildung 48 A und D). Diese waren über die ganze Vesikelmembran verteilt und fusionierten nach wenigen Minuten vollständig zu einer zusammenhängenden Domäne. Die Erscheinung solcher Vesikel war sehr selten und es konnte im Vorhinein nicht bestimmt werden, welche der beiden Phasen diese „Inseln“ bildeten.

Die Rekonstitution der beiden Proteine zeigte in jedem Lipidsystem eine Lokalisation in der fluiden Ld Phase, auch unabhängig davon, welcher Interaktionspartner markiert vorlag. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration brachte ebenfalls keine Veränderung. Ab einem P:L Verhältnis von 1:100 war es allerdings kaum noch möglich, eine ausreichende Menge an Vesikeln herzustellen. Das deutet darauf hin, dass die Proteine die Membranintegrität der Riesen-Vesikel negativ beeinflussen und so die Bildung und Stabilität der Vesikel gestört wird. Damit lässt sich zusammenfassen, dass weder das P:L Verhältnis, die benutzte Stöchiometrie, noch die Markierung oder das Lipidsystem eine Verlagerung der Proteine in die Raft-Domänen induzierte.



**Abbildung 48:** Lokalisation des Komplexes von PDGFR $\beta$ -TMD und E5. Der grüne Kanal (**A**, **D** und **G**) zeigt Dil, welches hauptsächlich in der Ld Phase konzentriert ist. Der rote Kanal (**B**, **E**, **H**) zeigt das farbstoffmarkierte Protein. Die Überlagerung beider Kanäle (**C**, **F** und **I**) zeigt die Lokalisation der markierten Proteine in der Ld Phase. Zur besseren Darstellung wurden bei A - F 180 Querschnittsbilder verschiedener Ebenen aufgenommen und zu einem Bild zusammengesetzt.

**A - C:** SMbrain/DOPC/Cholesterin (1:2:1) mit PDGFR $\beta$ -TMD\_S495C-ATTO647N und E5 unmarkiert.

**D - F:** SMbrain/DPOPC/Cholesterin (1:2:1) mit E5\_1-38-ATTO647N und PDGFR $\beta$ -TMD unmarkiert.

**G - I:** SMbrain/DMPoPC/Cholesterin (1:2:1) mit PDGFR $\beta$ -TMD\_S459C-ATTO647N und E5 unmarkiert.

#### 4.4.3 Korrelation der Diffusion von TMDn in Lipidmembranen

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Nienhaus, KIT Karlsruhe, wurde die Methode der Zwei-Farben-Zwei-Fokus Linien-Raster-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. dual-color dual-focus line-scanning FCS, 2c2f-IsFCS), das erste Mal auf kleine,  $\alpha$ -helikale Membranproteine angewandt. Der theoretische Hintergrund dieser Methode wurde in Abschnitt 1.3.3 und 3.3.5 vorgestellt.

Für die Experimente wurden jeweils zwei verschiedene Farbstoffe (ATTO647N oder Alexa647 und Alexa568) an die Proteine kovalent gekoppelt (siehe dazu Abschnitt 3.2.3). Der erste Teil der Experimente bestand darin, nur fluoreszenzmarkiertes E5 bzw. PDGFR $\beta$ -TMD in Membranen von Riesen-Vesikel zu rekonstituieren und die Diffusionsdynamik und die ggf. auftretende Korrelation der einzelnen Proteine zu bestimmen. Liegt E5 bzw. PDGFR $\beta$ -TMD mit zwei verschiedenen Farbstoffen (grün und rot) gekoppelt in der Membran vor, so bilden sich durch die jeweiligen Farbstoffe bei der Diffusion in der Membran im Fokus der Apparatur charakteristische Intensitätsschwankungen ab. Dieser „Fingerabdruck“ ist einzigartig für jedes fluoreszenzmarkierte Molekül in der Membran und wird in dem jeweiligen Farbkanal gespeichert. Ergibt sich nach der Auswertung eine Zwei-Farben-Kreuzkorrelation zwischen diesen Intensitätsschwankungen, so deutet das auf eine gemeinsame Diffusion durch die Membran bzw. einen gebundenen Zustand hin. Weiterhin erhält man Werte für die mittlere Anzahl der Teilchen  $\langle N \rangle$  im Fokus und über den Diffusionskoeffizienten  $D$ , der ein Maß für die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle darstellt.

Obwohl bei der Präparation der Vesikel ein konstantes P:L Verhältnis eingestellt wurde, waren große Konzentrationsschwankungen der Proteine in den Vesikeln zu beobachten. Aufgrund dessen konnten nur ein einziges Vesikel für ein Experiment herangezogen werden, in denen die Konzentration der Farbstoffe niedrig war. Das Experiment ergab einen relativ hohen Standardfehler sowohl bei der mittleren Teilchenzahl  $\langle N \rangle$  im Fokus, als auch bei dem Diffusionskoeffizienten  $D$ .

Die Experimente mit E5 konnten aufgrund von apparativen Problemen nur in DEiPC (C20:1) und DErPC (C22:1) durchgeführt werden, wobei in DEiPC nur ein einziges auswertbares Vesikel gefunden werden konnte. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt keine Zwei-Farben-Kreuzkorrelation bei der Diffusion der E5 Proteine. Bei der Untersuchung mit E5 in DErPC Membranen konnte in nur wenigen Vesikeln eine schwache Kreuzkorrelation der Diffusion festgestellt werden, wobei der Diffusionskoeffizient in beiden Lipidsystemen vergleichbar ist. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse für E5 zusammengefasst.

**Tabelle 17:** Auswertung der Diffusion und Korrelation von E5. In beiden Lipidsystemen zeigt sich ein ähnlicher Diffusionskoeffizient  $D$  der einzelnen Moleküle jedes Kanals. Die mittlere Teilchenzahl  $\langle N \rangle$  im Fokus variiert teilweise stark, es ließen sich dennoch aussagekräftige Autokorrelationsfunktionen berechnen.

Lipid-system	$\langle N \rangle$ grün	$\langle N \rangle$ rot	$\langle N \rangle$ Komplex	$D$ grün [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	$D$ rot [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	$D$ Komplex [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	analysierte Vesikel
DEiPC	$13 \pm 3$	$41 \pm 36$	$0 \pm 0$	$3,7 \pm 0,6$	$4,5 \pm 2,2$	$0 \pm 0$	1
DErPC	$41 \pm 11$	$36 \pm 7$	$3 \pm 2$	$3,2 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,7$	$6,6 \pm 7,4$	10

Bei PDGFR $\beta$ -TMD waren nur die Experimente in DEiPC auswertbar. Der Diffusionskoeffizient ist etwas geringer als bei E5, wobei die Standardabweichung im grünen Kanal relativ hoch ist (Tabelle 18). In einigen Vesikeln konnte eine nur sehr schwache Zwei-Farben-Kreuzkorrelation beobachtet werden.

**Tabelle 18:** Auswertung der Diffusion und Korrelation von PDGFR $\beta$ -TMD in DEiPC.  $\langle N \rangle$  ist die mittlere Teilchenzahl im Fokus und  $D$  der Diffusionskoeffizient. In wenigen der sechs untersuchten Vesikeln konnte eine nur sehr schwache Zwei-Farben-Kreuzkorrelation detektiert werden.

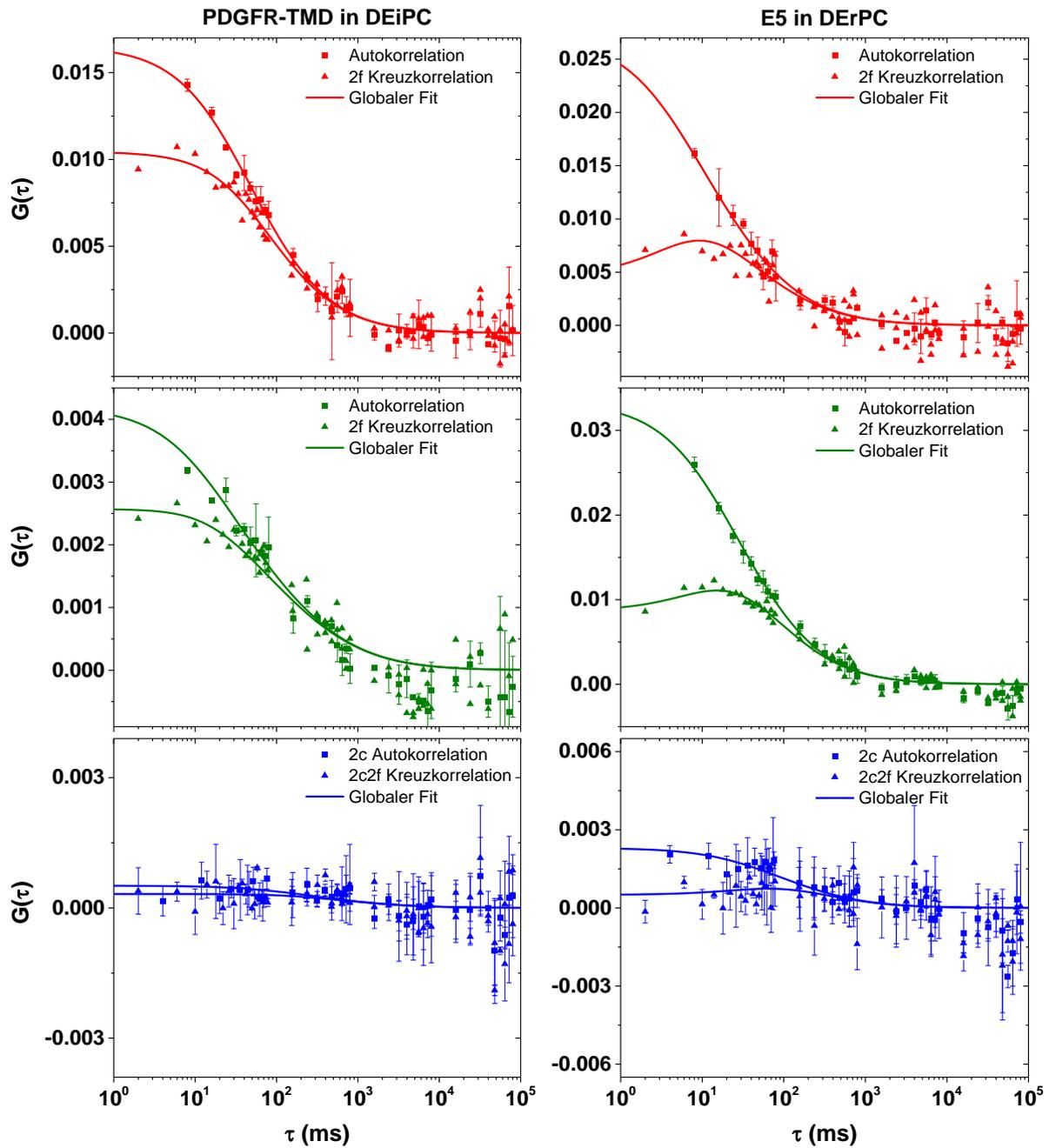
Lipid-system	$\langle N \rangle$ grün	$\langle N \rangle$ rot	$\langle N \rangle$ Komplex	$D$ grün [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	$D$ rot [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	$D$ Komplex [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	analysierte Vesikel
DEiPC	$37 \pm 9$	$38 \pm 5$	$4 \pm 4$	$2,6 \pm 1,8$	$3,0 \pm 0,5$	$2,4 \pm 1,6$	6

Die Untersuchung der Diffusion und Kreuzkorrelation des Komplexes von E5 und PDGFR $\beta$ -TMD konnte in vier Lipidsystemen durchgeführt werden. In sieben von 12 untersuchten DEiPC Vesikeln zeigt sich eine signifikante Zwei-Farben-Kreuzkorrelation. Auffallend dabei sind die sehr niedrigen Werte des Diffusionskoeffizienten des roten Kanals sowie des Komplexes bei drei dieser Vesikel. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Proteine in größeren Aggregaten oder Clustern vorliegen und somit deutlich langsamer diffundieren. Die Experimente in allen anderen Lipidsystemen ergaben nur eine sehr schwache Zwei-Farben-Kreuzkorrelation (Tabelle 19).

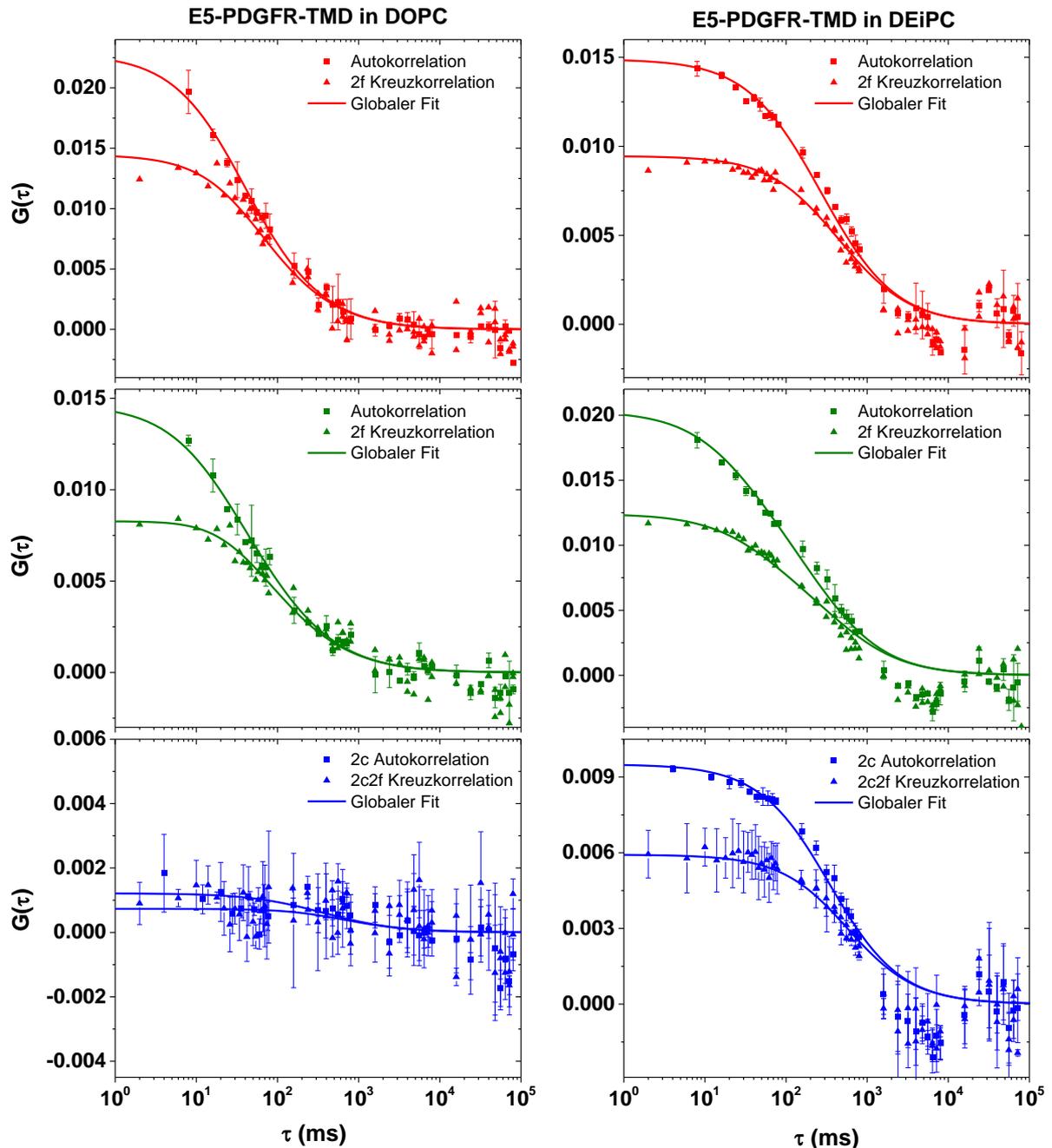
**Tabelle 19:** Auswertung der Diffusion und Korrelation des Komplexes von E5 und PDGFR $\beta$ -TMD.  $\langle N \rangle$  ist die mittlere Teilchenzahl im Fokus und  $D$  der Diffusionskoeffizient. In DPoPC, DOPC und DErPC Membranen ist nur eine sehr schwache Zwei-Farben-Kreuzkorrelation der beiden Proteine zu erkennen. In DEiPC Membranen wurden drei verschiedene Zustände des Komplexes beobachtet. DEiPC<sup>1</sup> zeigt eine signifikant hohe Zwei-Farben-Kreuzkorrelation, sowie einen um den Faktor 5 verringerten  $D$  im roten Kanal und im Kanal des Komplexes, im Vergleich zu anderen Experimenten in DEiPC Membranen. Weiterhin zeigte DEiPC<sup>2</sup> eine signifikante Kreuzkorrelation, die jedoch deutlich unter der in DEiPC<sup>1</sup> liegt. Überraschend konnten ebenfalls Vesikel gefunden werden, in denen nur eine sehr schwache Zwei-Farben-Kreuzkorrelation zu beobachten ist (DEiPC<sup>3</sup>).

Lipid-system	$\langle N \rangle$ grün	$\langle N \rangle$ rot	$\langle N \rangle$ Komplex	$D$ grün [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	$D$ rot [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	$D$ Komplex [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ]	analysierte Vesikel
DPoPC	23 $\pm$ 10	35 $\pm$ 5	1 $\pm$ 1	3,8 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 0,5	6,9 $\pm$ 8,8	4
DOPC	28 $\pm$ 10	28 $\pm$ 9	2 $\pm$ 1	3,8 $\pm$ 1,9	3,8 $\pm$ 1,3	2,4 $\pm$ 2,8	4
DEiPC <sup>1</sup>	15 $\pm$ 12	20 $\pm$ 4	29 $\pm$ 1	3,0 $\pm$ 1,8	0,8 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,1	3
DEiPC <sup>2</sup>	33 $\pm$ 10	44 $\pm$ 21	6 $\pm$ 2	2,8 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 2,3	4
DEiPC <sup>3</sup>	28 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	3,2 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 2,1	5
DErPC	33 $\pm$ 15	30 $\pm$ 10	4 $\pm$ 9	2,2 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 0,7	11,6 $\pm$ 10,1	7

Da die Kalibrierung des Mikroskops für diese Experimente sehr zeitintensiv war, konnte insgesamt nur eine eingeschränkte Anzahl von Experimenten durchgeführt werden. So sind die dargestellten Ergebnisse mit einem gewissen Vorbehalt zu bewerten. Dennoch zeigte sich insgesamt die prinzipielle Anwendbarkeit dieses Verfahrens auch auf kleine Membranproteine.



**Abbildung 49:** Datenanalyse der Korrelationen von E5 bzw. PDGFR $\beta$ -TMD in DEiPC und DERPC. Der rote Kanal (ATTO647N) und der grüne Kanal (Alexa568) zeigen die Autokorrelationsfunktionen, sowie die zwei-Fokus (2f) Kreuzkorrelationen des jeweiligen Kanals. Die Zwei-Farben (2c) und Zwei-Fokus (2f) Kreuzkorrelationen (blau) sind sehr schwach ausgeprägt.



**Abbildung 50:** Datenanalyse der Korrelationen des Komplexes von E5 und PDGFR $\beta$ -TMD. Der rote Kanal (ATTO647N) und der grüne Kanal (Alexa568) zeigen die Autokorrelationsfunktionen, sowie die Zwei-Fokus (2f) Kreuzkorrelationen des jeweiligen Kanals. In Blau sind die Zwei-Farben (2c) und Zwei-Fokus (2f) Kreuzkorrelationen dargestellt. In drei von 12 DEiPC Vesikeln ist eine signifikante 2c- und 2c2f-Kreuzkorrelation zu erkennen (rechte Spalte). In allen anderen Vesikeln bzw. Lipidsystemen ist nur eine sehr schwache 2c- und 2c2f-Kreuzkorrelation zu beobachten (exemplarisch gezeigt an einem DOPC Vesikel, linke Spalte).

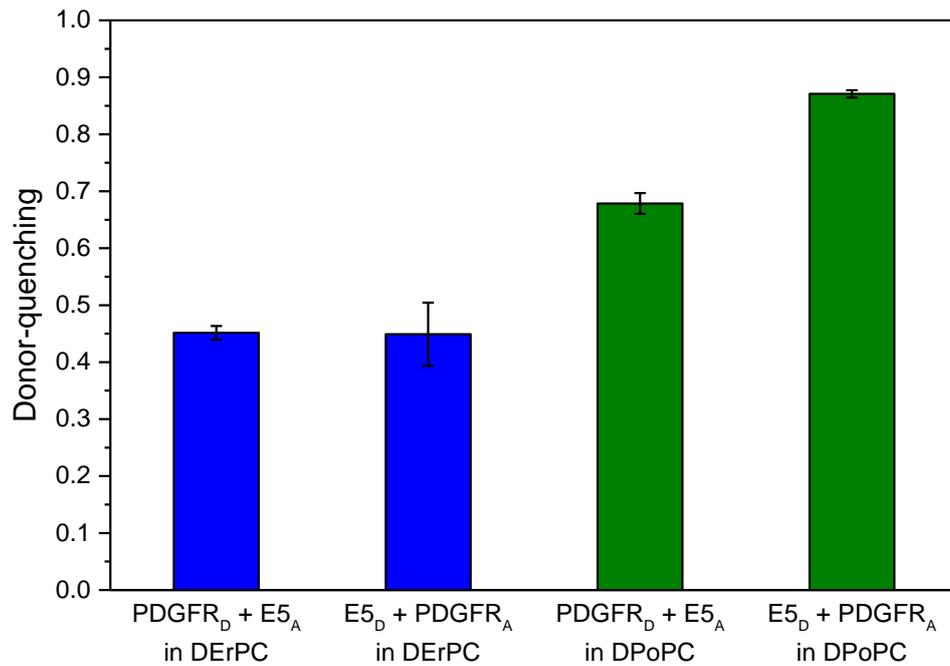
#### 4.4.4 Interaktionsanalyse der Proteine mittels FRET

Die Methodik der stöchiometrischen Bestimmung mit verschiedenen Molenbrüchen, wie sie für die Homointeraktion durchgeführt wurde (Abschnitt 4.3), kann bei der Heterointeraktion nicht angewendet werden. Der Grund dafür liegt in der nicht zufälligen Verteilung von Donoren und Akzeptoren im Komplex. Dadurch sind nicht mehr alle Zustände vorhanden und die Anzahl an gequenchten Donoren ergibt sich nicht mehr aus der Binomialverteilung. Es ist jedoch möglich, die Interaktion der Proteine zumindest qualitativ zu erfassen und Aussagen über deren Affinität zueinander zu erhalten. Je höher diese Affinität ist, desto weniger freie Donoren befinden sich in der Probe und folglich steigt das Donor-quenching an.

Zur Untersuchung der Interaktion von PDGFR $\beta$ -TMD und E5, wurden jeweils zwei Experimente pro Lipidsystem durchgeführt. Dabei fungierte im ersten Experiment PDGFR $\beta$ -TMD als Donor und E5 als Akzeptor. Im zweiten Experimente wurde E5 mit Donor und PDGFR $\beta$ -TMD mit Akzeptor gekoppelt eingesetzt. Das molare Verhältnis betrug jeweils 1:1. Für die Experimente wurden ebenfalls dicke und dünne Membranen verwendet.

Die beiden Experimente in dicken DErPC Membranen zeigen ein nahezu identisches Donor-quenching von  $0,45 \pm 0,01$  für PDGFR $\beta$ -TMD als Donor und  $0,45 \pm 0,05$  für E5 als Donor (Abbildung 51). Das deutet darauf hin, dass in beiden Experimenten noch freier, ungebundener Donor vorhanden sein muss. Weiterhin spricht dieses Ergebnis für ein äquimolares Verhältnis der Proteine im Komplex. Die genaue Anzahl der Untereinheiten im Komplex ist daraus jedoch nicht zu entnehmen.

In dünnen DPoPC Membranen wurden analog ebenfalls zwei Experimente durchgeführt. Fungiert PDGFR $\beta$ -TMD als Donor, so beträgt das Donor-quenching  $0,68 \pm 0,02$ . Beim Gegenexperiment mit E5 als Donor, ist ein Quenching von  $0,87 \pm 0,01$  zu erkennen (Abbildung 51). Dieses höhere Donor-quenching weist darauf hin, dass sich in dünnen Membranen das anteilige Verhältnis der Proteine auf die Seite von E5 verschiebt. Wie in den Homointeraktionsexperimenten gezeigt, neigen die Proteine in dünnen Membranen zur Bildung von Clustern, in denen sich der Abstand zueinander verkürzt. Jedoch kann hier trotz des hohen Energieübertrags nicht ausgeschlossen werden, dass noch freie Donoren vorhanden sind.



**Abbildung 51:** Heterointeraktionsanalyse der Proteine mittels FRET. Bei jedem Experiment wurden äquimolare Verhältnisse der Proteine verwendet, wobei je ein Interaktionspartner mit Donor, der andere mit Akzeptor markiert vorlag. In DErPC Membranen (**blau**) zeigt sich in beiden Experimenten ein Donor-quenching von ca. 0,45. Das deutet zum einen auf das Vorhandensein von freien Donoren in der Probe hin, zum anderen ist damit ein Hinweis gegeben, dass beide Proteine im Komplex in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen. In DPOPC Membranen (**grün**) ist ein Donor-quenching von  $0,68 \pm 0,02$  zu erkennen, sobald PDGFR $\beta$ -TMD als Donor fungiert. Der deutlich höhere Wert von  $0,87 \pm 0,01$  im Gegenexperiment (E5 als Donor) lässt darauf schließen, dass die Anzahl von E5 Molekülen im Komplex überwiegt. Wie jedoch schon die Homointeraktion zeigt, könnte hier eine unspezifische Clusterung der Komplexe zusammen mit den E5 Dimeren dieses Ergebnis verursachen.

## 5 Diskussion

RTK sind Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen, welche durch Liganden-vermittelte Dimerisierung aktiviert werden. Es hat sich gezeigt, dass die TMD von RTKn nicht nur die extra- und intrazelluläre Domäne miteinander verbindet, vielmehr übernimmt sie wichtige Aufgaben in der allosterisch getriebenen Signalweiterleitung ins Zellinnere. Neben der Ausbildung von Rezeptordimeren, könnte auch die Veränderung eines Dimerisierungsmotivs und die damit einhergehende Torsion der TMD wichtige Konformationsänderungen der intrazellulären Domänen induzieren. Wie diese Mechanismen aber im Detail funktionieren, ist bislang noch unklar. Die Anforderungen an die Strukturuntersuchungsmethoden von Transmembranproteinen sind besonders speziell, da sie sich in einem hydrophoben Milieu befinden. Die Struktur vieler TMD wurde deshalb in Detergenzmizellen bestimmt, da sie sehr effektiv die TMDn vom Wasser abschirmen. So konnte im Arbeitskreis von Prof. Ulrich, KIT Karlsruhe, die Struktur des PDGFR $\beta$ -TMD erfolgreich in DPC Mizellen mittels Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie bestimmt werden [41]. Das Ergebnis ergab ein linksgängiges,  $\alpha$ -helikales Dimer mit einer Leucin-Zipper ähnlichen Kontaktfläche, die sich fast über die komplette Länge der TMD erstreckt. Detergenzmoleküle passen sich jedoch leicht an die Form und Struktur der Proteine an. Sie haben somit keine definierte hydrophobe Dicke, an welche sich die Membranproteine anpassen müssen. Dadurch wirkt vertikal kein Druck auf die Proteine. Lipiddoppelmembranen lassen sich hingegen nur bedingt in ihrer Form verändern. Die Kraft, die auf die Proteine wirkt ist deutlich höher als bei Detergenzmizellen. Somit ist das Verhalten der Proteine in Mizellen nur bedingt mit dem Verhalten in natürlichen Membranen vergleichbar. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie hingegen erlaubt die Untersuchung von Membranproteinen in der natürlichen Umgebung der Lipiddoppelschicht, und ist somit bestens geeignet für Strukturuntersuchungen solcher hydrophoben Proteine. Erste Festkörper-NMR-Experimente von PDGFR $\beta$ -TMD in verschiedenen Lipiddoppelschichten haben gezeigt, dass der Tiltwinkel von der hydrophoben Dicke der Membran abhängt [41].

Das E5 Onkoprotein ist in der Lage, durch direkte Helix-Helix Wechselwirkungen mit der TMD des Rezeptors diesen zu aktivieren. Um zu verstehen, wie dies im Detail erfolgen könnte, wurde das Verhalten von PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5 sowie deren Komplex in verschiedenen Membranen untersucht. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass sich die TMD des Rezeptors zwischen Phe 498 und Trp 524 befindet [41]. Dieser hydrophobe Bereich von 26 Aminosäuren stimmt relativ genau mit der Länge der TMD von E5 überein. Diese erstreckt sich von Trp 5 bis Trp 32 [135]. Aromatische Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin flankieren häufig transmembrane Bereiche von Proteinen um sie so stabil in die Membran zu integrieren [80–83]. Neben Tryptophan befinden sich zusätzlich Phe 6 und Tyr 31 am oberen und unteren Ende des hydrophoben Bereichs der TMD, was ihr zusätzlich

Stabilität in der Membran verleiht. Durch diese stabil inserierte TMD von E5 kann sichergestellt werden, dass das Glutamin 17 auf gleicher Höhe mit dem Threonin 513 des Rezeptors positioniert bleibt, um gezielt die antiparallele Interaktion zu gewährleisten [89].

- **Orientierung von PDGFR $\beta$ -TMD und E5 in Membranen**

Neben den nahezu gleichen transmembranen Längen beider Proteine von ca. 39 Å konnte ein ähnliches Verhalten in dickeren Membranen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie beobachtet werden. Die zuvor beobachtete Tiltwinkeländerung von PDGFR $\beta$ -TMD in Abhängigkeit der Membrandicke bestätigte sich, wobei sie jedoch nicht linear erfolgt. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass PDGFR $\beta$ -TMD sich in einer großen Bandbreite an Membranen unterschiedlicher Dicke gut rekonstituieren lässt. PDGFR $\beta$ -TMD könnte daher hauptsächlich als Monomer vorliegen, was es der TMD erleichtert sich in dünneren Membranen zu neigen.

Mit den  $^{15}\text{N}$ -NMR 2D-SAMMY-Experimenten sollte die Berechnung der Tiltwinkel genauer erfolgen, doch zeigen sich keine aufgelösten Signalpunkte im Spektrum, die sich als „PISA-Wheel“ anordnen. Ein Grund dafür kann eine Variation der Diederwinkel ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) sein. Die Form der „Wheels“ im Spektrum reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen dieser Winkel [179]. Somit könnte, gerade bei dünneren Membranen, eine Verteilung von  $\Phi$  und  $\Psi$  durch eine Deformierung der Helix hervorgerufen worden sein. Dies zeigen auch die Strukturuntersuchungen mittels Flüssigkeits-NMR, wobei eine coiled coil Struktur identifiziert wurde [41]. Diese weicht von einer idealen Helix ab. Besitzt die Helix zusätzlich Knicke, so könnten sich auch Signale mehrerer Wheels im Spektrum überlagern. Trotz der schlechten Auflösung der Signale ist zu erkennen, dass der Tiltwinkel in dünneren Membranen zunimmt. Diese Beobachtung steht somit im Einklang mit den 1D-Ergebnissen. Darüber hinaus bilden diese 2D-Spektren die Grundlage, um den Rotationswinkel  $\rho$  der Helix zu bestimmen, daher wäre die Optimierung dieser Experimente lohnenswert.

E5 zeigt ein ähnliches Verhalten, jedoch nur für drei relativ dicke Membranen aus DNPC, DErPC und DEiPC, wobei in letztgenannten Membranen ein deutlich erhöhter Pulveranteil zu beobachten ist. Im Gegensatz zu PDGFR $\beta$ -TMD kann E5 in Membranen mit hydrophoben Dicken unterhalb von DEiPC (ca. 30 Å) nicht mehr stabil rekonstituiert werden und aggregiert. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten könnte in der starken intrinsischen Fähigkeit zur Dimerisierung liegen. Mit abnehmender Dicke des hydrophoben Bereichs der Membran müsste E5 sich stärker neigen, was aber möglicherweise mit dem Zerfall des Dimers einhergehen würde. Die starke Affinität der Proteine zueinander könnte dies jedoch verhindern, somit kann E5 den hydrophoben Mismatch zur Membran nicht mehr kompensieren und aggregiert.

- **Lokalisation in der Membran**

Neben einer Vielzahl von unterschiedlichen Lipiden, beinhaltet die Membran von eukaryotischen Zellen auch Sphingomyelin und Cholesterin. Die hydrophobe Dicke und der Cholesterinanteil steigt dabei vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat bis hin zur Plasmamembran stetig an [223]. Der dadurch entstehende hydrophobe Mismatch zwischen einer TMD und den Lipidketten soll u.a. im Zusammenhang mit deren Funktionalität stehen [224–227]. So wurden verschiedene Wachstumsrezeptoren, darunter der PDGF-Rezeptor, in sog. „Lipid-Rafts“ nachgewiesen [220]. Die Membran dieser „Rafts“ besitzt einen besonders dicken, hydrophoben Kern bedingt durch eine hohe Konzentration an Sphingomyelin und Cholesterin. Dadurch könnten sie als eine Art Plattform für Membranproteine mit außergewöhnlich langen TMDn dienen, um deren Transport zu ihrem Bestimmungsort zu gewährleisten [107].

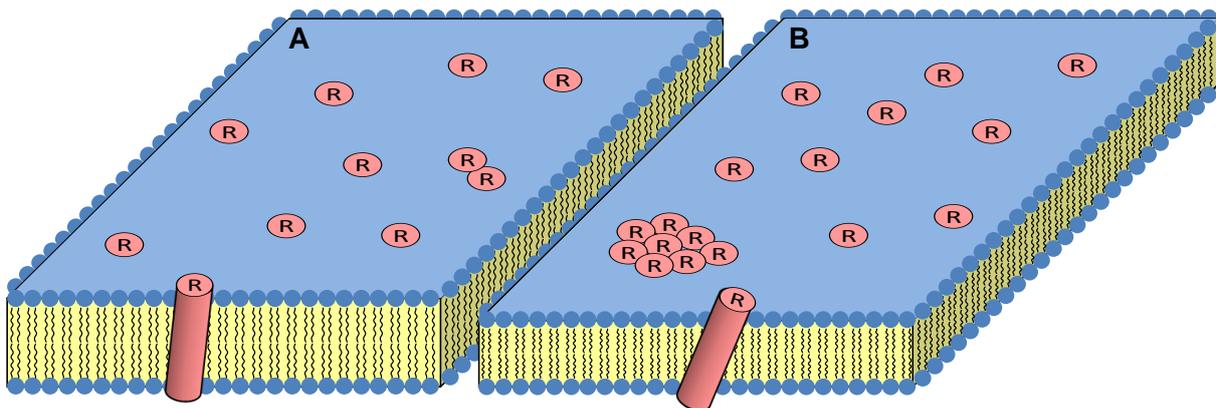
Da der Rezeptor zwei Zustände (aktiv, inaktiv) in der Zelle einnimmt, wäre es möglich, dass er bei der Konformationsänderung in den aktiven Zustand auch seine Lokalisation von den fluiden Bereichen (Ld Phase) der Zellmembran in die „Lipid-Rafts“ ändert. Die Bestimmung der Lokalisation in Riesen-Vesikel mit sphingomyelinreichen, „Raft-ähnlichen“ Mikrodomänen zeigte jedoch eindeutig, dass sich sowohl PDGFR $\beta$ -TMD und E5, als auch der Komplex aus beiden Proteinen ausschließlich in der Ld Phase aufhalten. Auch Variationen der Proteinkonzentration veränderten dieses Ergebnis nicht. Selbst bei einem sehr großen Unterschied der Membrandicke zwischen den „Raft-ähnlichen“ Domänen und der Ld Phase war keine Veränderung der Lokalisation zu erkennen. Die Rekonstitution hingegen war in diesen Vesikeln dramatisch reduziert. Weiterhin waren stellenweise „Klumpen-ähnliche“ Strukturen in der Membran zu erkennen, die auf ein starkes Aggregationsverhalten der Proteine hinweisen. Obwohl in der „Raft“-Phase eine aufrechte Orientierung mit geringem Tiltwinkel für die Proteine möglich wäre, scheint die Ld Phase, wahrscheinlich durch ihre hohe Fluidität, einen geeigneteren Aufenthaltsort darzustellen. Darüber hinaus stellt die hier verwendete Lipidzusammensetzung ein vereinfachtes Modell von „Lipid-Rafts“ dar. In natürlichen Zellen sind diese weitaus komplexer aufgebaut und andere Faktoren bzw. Proteine könnten bei der Lokalisation eine Rolle spielen.

In diesem Zusammenhang zeigen die NMR-Experimente in diesen „Raft-ähnlichen“ Lipidsystemen bei E5 eine mangelhaftere Rekonstitution, als in Membranen ungesättigter Lipide. Der Tiltwinkel zeigte mit 23° einen ähnlichen Wert wie in DEiPC Membranen, wobei aufgrund der erhöhten Membrandicke ein geringerer Wert erwartet wurde. Da der aggregierte Anteil der Proteine jedoch hoch war, ist dieser Wert des Tiltwinkels mit einem hohen Fehler behaftet. Die Erwartung einer guten Rekonstitution in dieser, für den Rezeptor natürlichen Membranumgebung, konnte auch für PDGFR $\beta$ -TMD nicht beobachtet werden.

In Spingomyelin/Cholesterin (2:1) Membranen zeigte PDGFR $\beta$ -TMD ein Pulverspektrum. Weiterhin ist bei der verwendeten Lipid-Mischung DOPC/Spingomyelin/Cholesterin nicht geklärt, ob sich auf Glasplättchen ebenfalls eine Phasenseparation bildet und in welcher Phase sich die Proteine ansammeln. Das Spektrum zeigt hier einen etwas kleineren Tiltwinkel, im Vergleich zu reinen DOPC Membranen. Das spricht dafür, dass nur eine Lipidphase mit einer homogenen Verteilung von Spingomyelin vorhanden war. Zusammenfassend unterstützt diese Beobachtung die Ergebnisse der Lokalisationsexperimente. Diese legen nahe, dass sich die verwendeten Lipide als künstliche, „Lipid-Rafts“-imitierenden Membransysteme weniger als Membranmodelle für die hier benutzten Proteine eignen. So könnten andere Lipidmischungen oder weitere Faktoren einen Einfluss auf die Rekonstitution und Orientierung der Proteine haben.

- **Stöchiometrie der homo-oligomeren Komplexe**

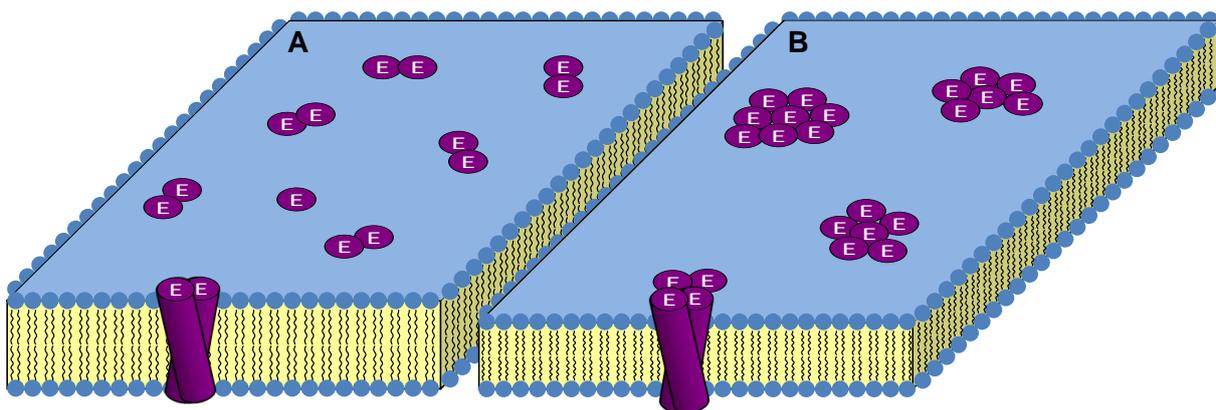
Neben dem Verhalten der Proteine in verschiedenen Membranen, wurde eine Bestimmung der Stöchiometrie von PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5 durchgeführt. Für PDGFR $\beta$ -TMD konnte das von Muhle-Goll und Kollegen beschriebene Dimer in Detergenzien [41], in Membranen nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse des FRET-Assay von PDGFR $\beta$ -TMD lassen vermuten, dass zwar eine Homointeraktion von PDGFR $\beta$ -TMD vorliegt, diese jedoch sehr schwach ausgeprägt ist, sodass in dünnen wie auch in dicken Membranen hauptsächlich Monomere vorliegen.



**Abbildung 52:** Schematische Darstellung der Stöchiometrie von PDGFR $\beta$ -TMD (R) in dicken und dünnen Membranen. Der hydrophobe Bereich der Membran ist in Gelb, die Oberfläche mit den Lipidköpfen ist in Blau dargestellt. Die Helices ragen aus der Membran heraus und sind schematisch als ovale Kreise symbolisiert. **A:** In dicken DErPC Membranen ist die intrinsische Fähigkeit zur Dimerisierung sehr schwach ausgeprägt, es liegen hauptsächlich Monomere vor. **B:** In dünnen DPOPC Membranen liegt hauptsächlich ein monomerer Zustand vor. Es könnten sich jedoch einige unspezifische Cluster gebildet haben, um den hydrophoben Mismatch auszugleichen.

Frühere Untersuchungen ergaben, dass E5 auch ohne die natürlichen Disulfidbrücken eine starke intrinsische Fähigkeit zur Dimerisierung besitzt [79,90,228]. Diese Erkenntnisse basierten u.a. auf analytischer Ultrazentrifugation und SDS-PAGE. Eine Aussage über den Zustand in Lipidmembranen kann daraus allerdings nicht getroffen werden, da die Ultrazentrifugation den Einsatz von Detergenzien erfordert. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ionische Detergenzien die Interaktion von TMDn beeinflussen können, insbesondere wenn die TMD polare oder geladene Aminosäuren beinhaltet [229]. Das könnte zu einem Bandenmuster im SDS-Gel führen, welches fälschlicherweise eine Dimerisierung suggeriert [230]. Anders als bei PDGFR $\beta$ -TMD konnte die in Detergenzien beobachtete Dimerisierung von E5 zum ersten Mal in Lipiddoppelschichten bestätigt werden. Der Abstand der C-Termini beträgt dabei ca.  $33,6 \pm 0,6 \text{ \AA}$ . Da bei dem verwendeten Konstrukt keine freien Cysteine vorhanden waren, konnte damit ebenfalls bestätigt werden, dass die Cysteine im C-terminalen Bereich für die Dimerisierung nicht unbedingt notwendig sind.

In dünnen Membranen zeigt die Auswertung des FRET-Assay einen hexameren Zustand. Jedoch definiert sich ein Hexamer durch spezifische Kontaktflächen mit speziellen Interaktionsmotiven zwischen den sechs Untereinheiten. Diese sind bei jedem Hexamer identisch. Hier ist es jedoch wahrscheinlicher, dass sich im Mittel drei Dimere unspezifisch aneinander lagern und so ein Cluster bilden. Die dabei entstehenden Kontaktflächen werden daher zufälliger Natur sein und unterscheiden sich dadurch zwangsläufig zwischen den einzelnen Clustern, wohingegen das Dimerisierungsmotiv immer gleich bleibt. Das deutet darauf hin, dass zur Kompensation des hydrophoben Mismatch eine dichtere Packung der E5 Dimere erzwungen wird, was sich in deren Clusterung zeigt.

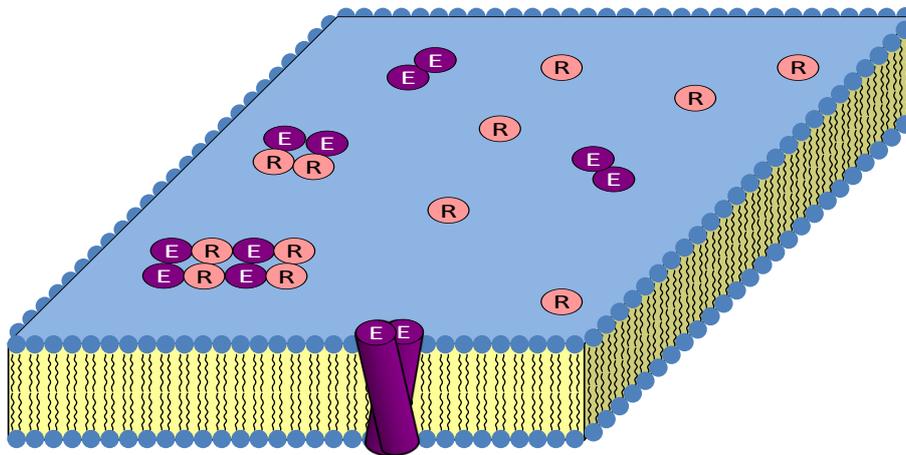


**Abbildung 53:** Schematische Darstellung der Stöchiometrie von E5 (E) in dicken und dünnen Membranen. Der hydrophobe Bereich der Membran ist in Gelb, die Oberfläche mit den Lipidköpfen ist in Blau dargestellt. Die Helices ragen aus der Membran heraus und sind schematisch als ovale Kreise symbolisiert. **A:** In dicken DErPC Membranen ist ein dimerer Zustand von E5 zu beobachten mit einem Abstand der Fluorophore von  $33,6 \text{ \AA}$ . **B:** In dünnen DPoPC Membranen werden die E5 Dimere durch den hydrophoben Mismatch zur unspezifischen Clusterung gezwungen. Eine klar definierte Stöchiometrie liegt wahrscheinlich nicht vor.

- **Interaktion von PDGFR $\beta$ -TMD und E5**

Neben der Stöchiometrie der Homointeraktion der Proteine ist die Bestimmung der Stöchiometrie des Komplexes aus beiden Proteinen ein Ansatz, um Hinweise auf den Aktivierungsmechanismus des Rezeptors durch das Onkoprotein E5 zu erhalten. Im Zuge dieser Interaktionsexperimente wurde der FRET-Assay genutzt, um die Interaktion der Proteine zu qualifizieren und deren Affinität zueinander zu quantifizieren. Weiterhin können damit Informationen über das molare Verhältnis der Proteine im Komplex erhalten werden. Hierzu wurden jeweils zwei Experimente pro Lipidsystem durchgeführt, wobei im ersten Experiment E5 als Donor und im zweiten als Akzeptor fungierte.

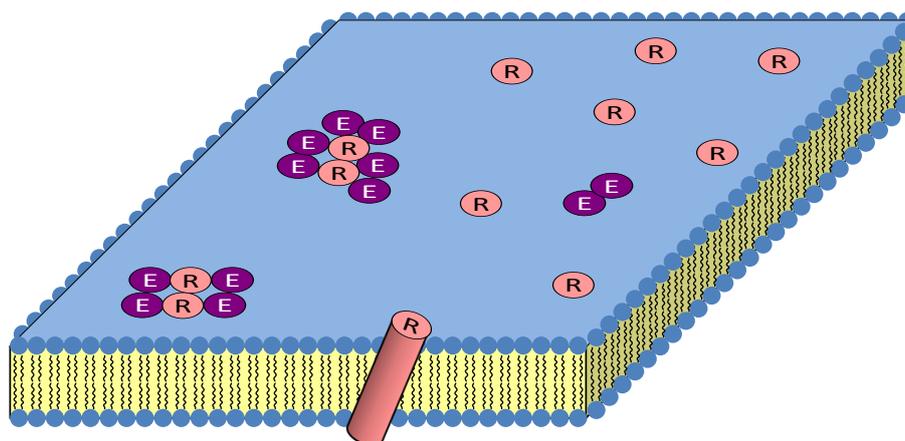
Die Ergebnisse in dicken Membranen zeigen in beiden Experimenten ein Donor-quenching von ca. 0,45. Das deutet darauf hin, dass die Proteine im Komplex in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen. In guter Näherung kann davon ausgegangen werden, dass der Abstand der Proteine im Komplex in einem ähnlichen Bereich liegt wie der Abstand der E5 Dimere zueinander (ca. 33,6 Å). Daher würde bei diesen Experimenten das maximale Donor-quenching zwischen 0,74 – 0,9 liegen. Anhand der Ergebnisse in dicken Membranen kann also geschätzt werden, dass sich ca. 50 – 60 % der Proteine zu Komplexen formieren.



**Abbildung 54:** Schematische Darstellung der Interaktion von PDGFR $\beta$ -TMD (R) und E5 (E) in dicken Membranen. Der hydrophobe Bereich der Membran ist in Gelb, die Oberfläche mit den Lipidköpfen ist in Blau dargestellt. Die Helices ragen aus der Membran heraus und sind schematisch als ovale Kreise symbolisiert. Ca. 50 – 60 % der Proteine befinden sich im Komplex miteinander. Dabei deuten die Ergebnisse auf ein äquimolares Verhältnis der Proteine im Komplex hin. Die Anzahl der Untereinheiten kann aus den Ergebnissen jedoch nicht abgeleitet werden. Vermutlich handelt es sich um ein Heterotetramer oder um ein Vielfaches dieses Typs.

In dünnen Membranen beträgt das Donor-Quenching  $0,68 \pm 0,02$  wenn E5 als Akzeptor vorlag. Das Ergebnis des zweiten Experiments (E5 als Donor) zeigt ein Quenching von  $0,87 \pm 0,01$ . Diese Diskrepanz bedeutet, dass in einem Komplex in dünnen Membranen der Anteil von E5 größer ist, als von PDGFR $\beta$ -TMD. Ca. 75 – 85 % der PDGFR $\beta$ -TMD Moleküle und ca. 95 % der E5 Moleküle bilden miteinander Komplexe.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass sich das molare Verhältnis des Komplexes in dünnen Membranen auf die Seite von E5 verschoben hat. Eine andere Erklärung könnte sich aus den Homointeraktionsexperimenten von E5 ergeben, die eine Neigung des Proteins zur Clusterbildung zeigten. Durch den hydrophoben Mismatch könnten sich demnach in dünnen Membranen an den spezifischen Komplex zusätzlich unspezifisch E5 Dimere anlagern. Für die aberrante Aktivierung des Rezeptors durch das E5 Protein wäre es unerheblich, ob die Oligomerisierung unspezifisch oder spezifisch stattfindet. Es wäre daher denkbar, dass eine unspezifische Clusterung/Oligomerisierung, induziert durch E5, die intrazellulären Kinasedomänen des Rezeptors optimal zueinander positioniert, sodass die Aktivierung stattfinden kann.



**Abbildung 55:** Schematische Darstellung der Interaktion von PDGFR $\beta$ -TMD (R) und E5 (E) in dünnen Membranen. Der hydrophobe Bereich der Membran ist in Gelb, die Oberfläche mit den Lipidköpfen ist in Blau dargestellt. Die Helices ragen aus der Membran heraus und sind schematisch als ovale Kreise symbolisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass sich mehr ungebundene Moleküle von PDGFR $\beta$ -TMD als von E5 in der Membran aufhalten. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass im spezifischen Komplex E5 Moleküle überwiegen. Es ist jedoch auch möglich, dass mit einer unspezifischen Clusterung von E5 in dünnen Membranen die Dimerisierung oder Oligomerisierung des Rezeptors erzwungen wird, was zu dessen Aktivierung führt.

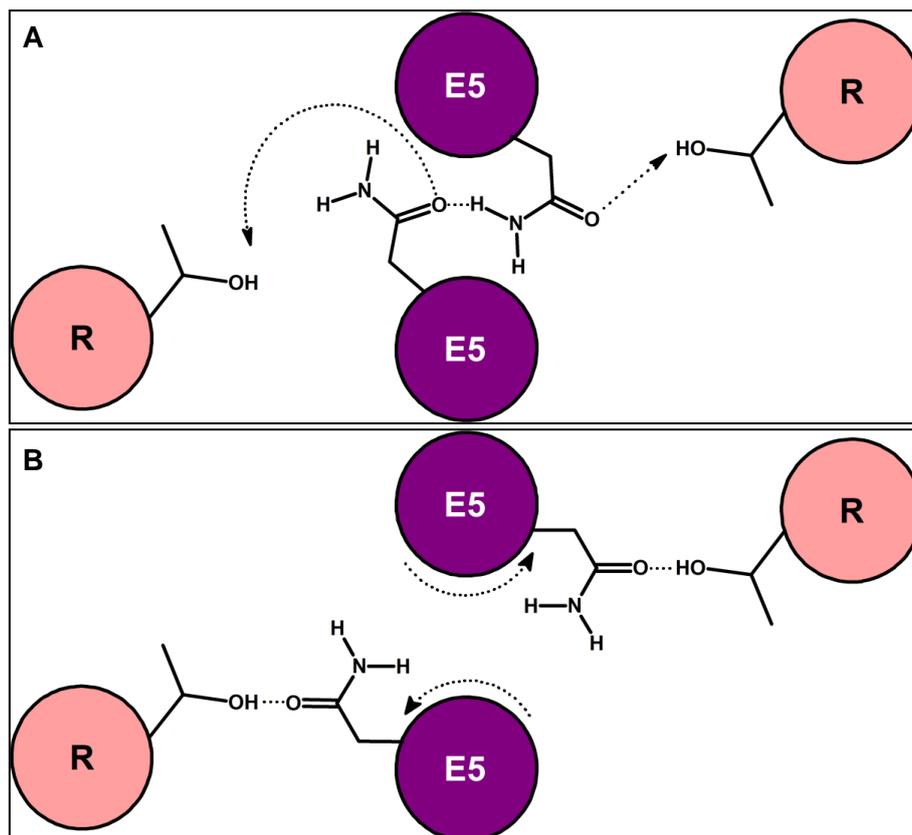
Um detailliertere Informationen über die Stöchiometrie des Komplexes zu erhalten, sind weitere Experimente notwendig. Darin könnte die Stöchiometrie der Homointeraktion von PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5 in Anwesenheit des jeweiligen, unmarkierten Bindungspartners bestimmt werden. Falls diese sich durch die Interaktion ändert, könnten Rückschlüsse auf die Stöchiometrie der Komplexe gezogen werden.

Im Zuge der Interaktionsexperimente zeigen die entsprechenden  $^{15}\text{N}$ -NMR Ergebnisse von PDGFR $\beta$ -TMD in dicken Membranen nur eine marginale Veränderung des Tiltwinkels. Da dieses Protein in dicken Membranen hauptsächlich als Monomer vorliegt und einen geringen Tiltwinkel besitzt, war anzunehmen, dass sich der Tiltwinkel beim Übergang in einen Komplex nur sehr gering ändern wird. Das konnte mit diesen Experimenten bestätigt werden. In dünnen Membranen wurde zwar eine Verringerung des Tiltwinkels von PDGFR $\beta$ -TMD um ca.  $10^\circ$  berechnet worden, dieses Ergebnis konnte jedoch in dieser Ausprägung nicht reproduziert werden. Daher ist anzunehmen, dass sich der Tiltwinkel von PDGFR $\beta$ -TMD unter dem Einfluss von E5 auch in dünnen Membranen wenig ändert.

Das  $^{15}\text{N}$ -NMR Interaktionsexperiment in dünnen Membranen zeigte bei E5 eine deutlich verbesserte Rekonstitution, als bei dem Einzelexperiment. Das starke Aggregationsverhalten von E5, welches zu keinem auswertbarem Spektrum führte, konnte im Interaktionsexperiment nicht beobachtet werden. Weiterhin wurde ein Tiltwinkel von  $9^\circ$  berechnet, was für den relativ langen, hydrophoben Teil der Helix gering ist.

Basierend auf den Ergebnissen aus dem FRET-Assay, der NMR-Spektroskopie und der Lokalisationsuntersuchung kann ein hypothetisches Interaktions- und Aktivierungsmodell des PDGF-Rezeptors  $\beta$  durch das Onkoprotein E5 formuliert werden. Dabei werden auch bisher veröffentlichte Erkenntnisse mit einbezogen:

Das Glutamin 17 in der Aminosäuresequenz von E5 könnte bei der Interaktion eine entscheidende Rolle spielen [85]. Surti und Kollegen identifizierten mittels Moleküldynamik Simulationen zwei unterschiedliche Dimerstrukturen für E5 [89]. Diese beiden Strukturen könnten zum einen das freie Dimer von E5 repräsentieren, zum anderen die gebundene Form mit dem Rezeptor. In der Struktur der geringsten freien Energie sind die beiden Glutamine Teil der Dimerkontaktfläche und stabilisieren diese vermutlich u.a. durch interhelikale Wasserstoffbrücken (Abbildung 56 A). Das könnte der homodimeren Orientierung von E5 in Abwesenheit des Rezeptors entsprechen. In der zweiten Struktur sind die Glutamine nach außen von der Kontaktfläche weggedreht. Mit dieser Orientierung könnte sich je eine Wasserstoffbrücke optimal zu Threonin 513 des Rezeptors ausbilden, da dieses auf der Höhe des Glutamins liegt (Abbildung 56 B). Der Übergang von der ersten, in die zweite Struktur könnte daher durch die Interaktion mit dem Rezeptor induziert werden, wobei die neu entstehende Wasserstoffbrücke jede E5 Untereinheit verdreht. Würde sich dabei die Kontaktfläche des Dimers destabilisieren, könnten die natürlich vorkommenden Disulfidbrücken bei E5 eine Dissoziation verhindern.



**Abbildung 56:** Aufsicht der schematischen Darstellung der postulierten Dimerstrukturen von E5 mit und ohne Anwesenheit des PDGF-Rezeptor  $\beta$  (R). Die Kreise entsprechen den Helices in der Membran. **A:** Durch Wasserstoffbrücken zwischen den Glutaminen wird der dimere Zustand von E5 stabilisiert. **B:** Durch die Rotation der E5 Helices kann jedes Glutamin mit Threonin des Rezeptors interagieren. Diese Orientierung würde der zweiten postulierten Struktur des E5 Dimers entsprechen, wobei die natürlich vorkommenden Disulfidbrücken einem Zerfall des E5 Dimers entgegenwirken.

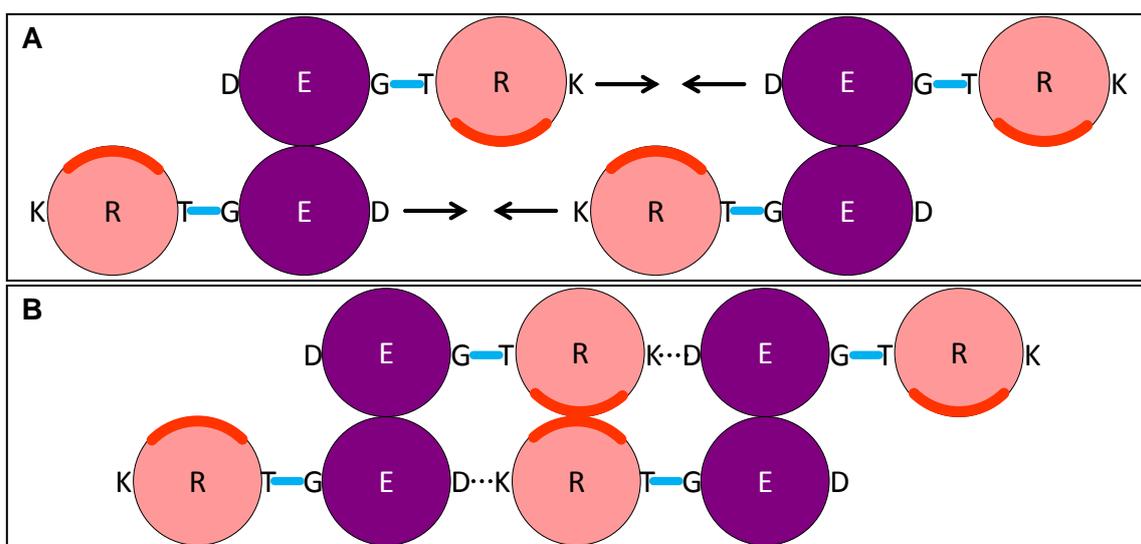
Da sich E5 hauptsächlich in dünneren Golgimembranen aufhält, wird es daher nur in sehr geringem Maße durch „Raft-Carrier“ oder anderen Proteinsortierungsmechanismen zur Plasmamembran transportiert [71]. Nach der Expression von E5 im Golgi kommt es zur Dimerisierung, wobei die erwähnten Wasserstoffbrücken und die Disulfidbrücken das Dimer stabilisieren. Dadurch könnte zwar E5 die Fähigkeit verlieren, den hydrophoben Mismatch durch Neigung zu kompensieren, doch eine Aggregation kann durch die Anwesenheit des PDGF-Rezeptors  $\beta$  verhindert werden. Dieser begünstigt die aufrechte Orientierung von E5 durch spezifische Helix-Helix Wechselwirkungen, wie sie E5 sonst nur in dickeren Membranen einnimmt. Dabei spielt wahrscheinlich eine Wasserstoffbrücke zwischen Glutamin und Threonin eine entscheidende Rolle. Das könnte auch der Grund sein, warum E5 nicht mit dem PDGF-Rezeptors  $\alpha$  interagiert, da bei diesem Rezeptor an der entsprechenden Stelle hydrophobe Aminosäuren lokalisiert sind [87].

Diese relativ geringe Neigung von E5 durch die Komplexbildung in dünneren Golgi-Membranen würde bedeuten, dass sich der hydrophobe Teil der Helix aus der Membran erhebt und mit dem Wasser in Kontakt tritt. Da dies entropisch ungünstig wäre, erfahren die Lipidketten

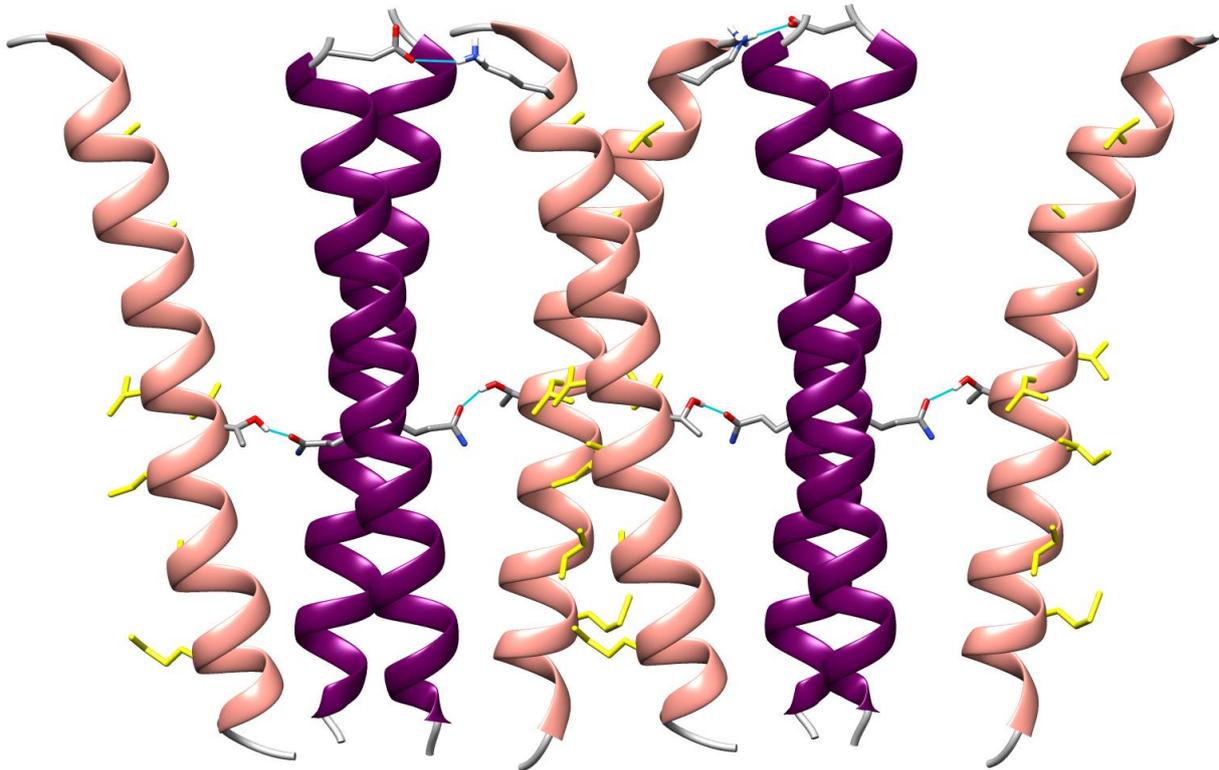
wahrscheinlich eine Streckung. Dadurch verringert sich jedoch die Entropie der betroffenen Lipide. Das könnte die spezifische Interaktion oder unspezifische Clusterung der Komplexe begünstigen, da sich somit die Zahl der gestreckten Lipide wieder verringert und dadurch die Entropie wieder erhöht.

Im Falle einer spezifischen Interaktion der Komplexe, könnte ein hypothetischer Tetramer (Abbildung 56 B) die Grundeinheit darstellen. Dabei sind die Rezeptormoleküle zweier Tetramere optimal positioniert, um mit dem Dimerisierungsmotiv zu interagieren, welches bereits von Muhle-Goll und Kollegen mittels Flüssigkeits-NMR identifiziert wurde (Abbildung 57 A) [41]. Hierbei könnten sich zur Stabilisierung Salzbrücken zwischen Asparaginsäure und Lysin ausbilden (Abbildung 57 B).

Ebenfalls ist denkbar, dass durch den hydrophoben Mismatch, der unspezifischen Clusterung der Komplexe eine wichtige Rolle zukommt, wie sie sich im Falle der Homo-Interaktion von E5 angedeutet hat. Die intrazellulären Kinasedomänen des Rezeptors könnten dadurch aktiviert werden. Diese Clusterung wäre wahrscheinlich sehr stabil, was die permanente Aktivierung des Rezeptors bewirkt.



**Abbildung 57:** Schematische Darstellung und Interaktion der hypothetischen Tetramere aus zwei E5 (E) und zwei PDGFR $\beta$ -TMD (R) Molekülen. **A:** In einem hypothetischen Tetramer sind die Rezeptormoleküle über eine Wasserstoffbrücke (blauer Strich) an einem E5 Dimer stabilisiert. Dadurch wird der Rezeptor günstig positioniert, um mit einem zweiten Rezeptormolekül eines weiteren Komplexes über die spezifische Kontaktfläche (rot) zu dimerisieren. **B:** Die Interaktion zweier (oder weiterer) Tetramere könnte durch den hydrophoben Mismatch, die Dimerkontaktfläche des Rezeptors, sowie über Salzbrücken zwischen Asparaginsäure und Lysin stabilisiert werden.



**Abbildung 58:** Hypothetischer Komplex aus zwei Tetrameren von E5 (lila) und PDGFR $\beta$ -TMD (orange). Die Seitenansicht zeigt, dass Salz- bzw. Wasserstoffbrücken den Komplex stabilisieren. Die gelb markierten Aminosäurereste des Rezeptors wurden mittels Flüssigkeits-NMR-Strukturuntersuchung in dessen Dimerkontaktfläche identifiziert [41].

Im Gegensatz zu den FRET-Experimenten, zeigen die FCS-Experimente nahezu keine Homointeraktion und nur in wenigen Fällen eine Heterointeraktion. Da hier die Proteine in einer sehr geringen Konzentration vorlagen, könnte dies Auswirkungen auf die Interaktion haben. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der FRET-Effekt sich bei diesen Experimenten negativ auf die Korrelation ausgewirkt haben könnte [231]. Bei der Dimerisierung von E5 wird statistisch nur die Hälfte der Dimere mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen (grün-rot) vorliegen. Der durchschnittliche Abstand dieser Farbstoffe im Dimer beträgt in diesem Fall ca. 34 Å. Das würde bedeuten, dass ab einem Försterradius von ca. 70 Å (wie er bei den verwendeten Farbstoffen gegeben ist) der errechnete Energieübertrag bei 99% läge. Das hieße, dass der grüne Farbstoff eines Dimers seine Energie nahezu vollständig auf den roten Farbstoff übertragen würde und daher eine kaum sichtbare Fluoreszenz zeigt. Nimmt man weiterhin an, dass sich durch eine unvollständige Aufreinigung und gebleichte Farbstoffe noch unmarkierte Proteine in der Probe befinden, würde das die Zwei-Farben-Kreuzkorrelation weiter verringern. Das dennoch starke Signal des grünen Kanals, käme daher fast ausschließlich von grün-grün Dimeren bzw. von Dimeren mit nur einem grünen Farbstoff. Jedoch kann man festhalten, dass sich der technische Aufbau und die Durchführung der FCS-Experimente in einem sehr frühen Stadium befinden und noch weiterer Optimierung bedürfen. Die ersten Ergebnisse waren jedoch vielversprechend.

## 6 Zusammenfassung

Der PDGF-Rezeptor  $\beta$ , aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase, ist in der Plasmamembran lokalisiert. Dieser wird durch Liganden-vermittelte Homodimerisierung aktiviert. Die Schlüsselstelle bei der Aktivierung stellt hierbei die Transmembrandomäne (TMD) dar, da diese das extrazelluläre Signal ins Zellinnere weiterleitet. Das virale Onkoprotein E5 ist in der Lage, durch Helix-Helix Wechselwirkungen mit dieser TMD die Aktivierung des Rezeptors zu induzieren. Die molekularen Mechanismen dieser Rezeptoraktivierung sind bisher nicht bekannt. Um mögliche Faktoren und Einflussgrößen der Aktivierung zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Orientierung der TMD des PDGF-Rezeptors  $\beta$  und dessen Wechselwirkung mit dem Onkoprotein E5 untersucht.

Hierzu wurde nach Rekonstitution in verschiedenen Lipidmembranen die Orientierung von PDGFR $\beta$ -TMD bzw. E5, sowie deren Komplex mittels Festkörper-NMR-Experimenten bestimmt. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen eine Abhängigkeit des Tiltwinkelwinkels der einzelnen Proteine von der Membrandicke. Nach der Fluoreszenzmarkierung der Proteine konnte die Lokalisation in zweiphasigen Riesen-Vesikeln ermittelt werden. Entgegen der Erwartung hatten die Proteine und deren Komplexe eine hohe Affinität zur fluiden Ld Lipid-Phase. Um zu überprüfen, ob die Orientierungen in den Membranen verschiedenen Oligomerisierungszuständen zugeordnet werden können, wurde die Stöchiometrie der homo-oligomeren Komplexe mittels eines FRET-Assay untersucht. Es zeigte sich, dass E5 in dicken Membranen Dimere bildet und PDGFR $\beta$ -TMD hauptsächlich als Monomer vorliegt. In dünnen Membranen neigen beide Proteine zu einer unspezifischen Clusterbildung. Weiterhin wurde in dünnen Membranen bei der Bildung des Komplexes mittels Festkörper-NMR, neben einer verbesserten Rekonstitution, ein unerwartet niedriger Tiltwinkel für E5 beobachtet. Um neben der Interaktion weitere Informationen über die Dynamik der Diffusion der Proteine in Membranen zu erhalten, wurden erste Experimente mit einer neu entwickelten fluoreszenzkorrelations-spektroskopischen Methode durchgeführt. Hier konnte in einigen Fällen eine Interaktion durch simultane Co-Diffusion nachgewiesen werden.

Auf Basis der Ergebnisse wird ein Modell der Aktivierung vorgeschlagen: Durch Bildung von Wasserstoff- und Salzbrücken zwischen den Proteinen wird deren Interaktion induziert und stabilisiert. Durch den geringen Tiltwinkel von E5 im Komplex wird durch den hydrophoben Mismatch die Streckung der Lipide provoziert, weswegen es zu einer zusätzlichen Clusterbildung kommt, die eine permanente Aktivierung des Rezeptors begünstigen könnte.

## 7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit ergab einen weiteren Beitrag zum Verständnis, welche Einflüsse bei der Rezeptoraktivierung durch allosterische Wechselwirkung eine Rolle spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen weitere Untersuchungen nahe:

Die ersten  $^{15}\text{N}$ -NMR 2D-SAMMY Experimente waren vielversprechend, doch durch die Überlagerung der Signale in den Spektren konnte der Tiltwinkel nicht genau bestimmt werden. Neben dem Tiltwinkel, bilden die SAMMY-Experimente ebenfalls die Grundlage für die Bestimmung des Rotationswinkels  $\rho$  der Helix in der Membran. Dafür werden Proteine mit selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren benötigt, die im Rahmen anderer Arbeiten im Arbeitskreis von Prof. Ulrich, KIT Karlsruhe, bereits hergestellt wurden. Die einzelnen Signale dieser Aminosäuren im Spektrum können dann spezifischen Stellen in typischen „PISA-Wheels“ der  $^{15}\text{N}$ -vollmarkierten Proteine zugeordnet werden, um diese wiederum einem Rotationswinkel zuordnen zu können. Mit auf dieser Basis optimierten 2D-Experimenten könnte ermittelt werden, ob sich die Rotation der Helix bei der Wechselwirkung mit dem Onkoprotein E5 verändert.

Um die Ergebnisse des FRET-Assay zu vervollständigen, sollte mit einem fluoreszierenden Akzeptor gearbeitet werden. Hierbei wird die abnehmende Fluoreszenz des Donors mit der zunehmenden Fluoreszenz des Akzeptors verglichen, die sich invers verhalten und die Parameter Stöchiometrie und Abstand können genauer bestimmt werden. Um den direkten Einfluss von E5 auf PDGFR $\beta$ -TMD zu untersuchen, wären FRET-Experimente von PDGFR $\beta$ -TMD mit unmarkiertem E5 durchzuführen. Dies würde weitere Informationen über die Stöchiometrie des Komplexes liefern und mit weiteren Lipidsystemen könnte ein genaueres Bild der Auswirkung des hydrophoben Mismatch auf die Stöchiometrie und die Interaktion gewonnen werden. Weiterhin eröffnet der FRET-Assay die Möglichkeit, den Einfluss von Aminosäuresubstitutionen zu untersuchen, um die relevanten Aminosäuren oder Motive in der hypothetischen Kontaktfläche der Proteine zu identifizieren. Neben dem FRET-Assay bieten auch REDOR-Experimente die Möglichkeit, intermolekulare Abstände von Proteinen zu ermitteln. Die dadurch gewonnenen Informationen sollten weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen der Rezeptoraktivierung durch das Onkoprotein E5 ergeben.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] T.P. Iismaa, J. Shine, G protein-coupled receptors, *Curr. Opin. Cell Biol.* 2 (1992) 192. doi:10.1016/0960-9822(92)90523-D.
- [2] B.K. Kobilka, X. Deupi, Conformational complexity of G-protein-coupled receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 28 (2007) 397–406. doi:10.1016/j.tips.2007.06.003.
- [3] N. Vaidehi, W.B. Floriano, R. Trabanino, S.E. Hall, P. Freddolino, E.J. Choi, et al., Prediction of structure and function of G protein-coupled receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (2002) 12622–12627. doi:10.1073/pnas.122357199.
- [4] B.K. Kobilka, G protein coupled receptor structure and activation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1768 (2007) 794–807. doi:10.1016/j.bbamem.2006.10.021.
- [5] D.M. Rosenbaum, S.G.F. Rasmussen, B.K. Kobilka, The structure and function of G-protein-coupled receptors, *Nature.* 459 (2009) 356–363. doi:10.1038/nature08144.
- [6] R.T. Dorsam, J.S. Gutkind, G-protein-coupled receptors and cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 79–94. doi:10.1038/nrc2069.
- [7] W.I. Weis, B.K. Kobilka, Structural insights into G-protein-coupled receptor activation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 734–740. doi:10.1016/j.sbi.2008.09.010.
- [8] A. Ullrich, J. Schlessinger, Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, *Cell.* 61 (1990) 203–212. doi:10.1016/0092-8674(90)90801-K.
- [9] J. Schlessinger, Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases, *Cell.* 103 (2000) 211–225. doi:10.1016/S0092-8674(00)00114-8.
- [10] T. Hunter, The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353 (1998) 583–605. doi:10.1098/rstb.1998.0228.
- [11] M. Lemmon, J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell.* 141 (2010) 1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
- [12] P. van der Geer, T. Hunter, R. Lindberg, Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways, *Annu. Rev. Cell Biol.* 10 (1994) 251–337. doi:10.1146/annurev.cellbio.10.1.251.
- [13] C.A. Bell, J.A. Tynan, K.C. Hart, A.N. Meyer, S.C. Robertson, D.J. Donoghue, Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase, *Mol. Biol. Cell.* 11 (2000) 3589–3599. doi:10.1091/mbc.11.10.3589.
- [14] T. Wehrman, X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau, K.C. Garcia, Structural and Mechanistic Insights into Nerve Growth Factor Interactions with the TrkA and p75 Receptors, *Neuron.* 53 (2007) 25–38. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.034.
- [15] C. Wiesmann, M.H. Ultsch, S.H. Bass, A.M. de Vos, Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor, *Nature.* 401 (1999) 184–188. doi:10.1038/43705.

- [16] S. Yuzawa, Y. Opatowsky, Z. Zhang, V. Mandiyan, I. Lax, J. Schlessinger, Structural Basis for Activation of the Receptor Tyrosine Kinase KIT by Stem Cell Factor, *Cell*. 130 (2007) 323–334. doi:10.1016/j.cell.2007.05.055.
- [17] T.P.J. Garrett, N.M. McKern, M. Lou, T.C. Elleman, T.E. Adams, G.O. Lovrecz, et al., Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha, *Cell*. 110 (2002) 763–773. doi:10.1016/S0092-8674(02)00940-6.
- [18] H. Ogiso, R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J.H. Kim, et al., Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains, *Cell*. 110 (2002) 775–787. doi:10.1016/S0092-8674(02)00963-7.
- [19] S. Bouyain, P.A. Longo, S. Li, K.M. Ferguson, D.J. Leahy, The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102 (2005) 15024–15029. doi:10.1073/pnas.0507591102.
- [20] K.M. Ferguson, M.B. Berger, J.M. Mendrola, H.S. Cho, D.J. Leahy, M. Lemmon, EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization, *Mol. Cell*. 11 (2003) 507–517. doi:10.1016/S1097-2765(03)00047-9.
- [21] A.W. Burgess, H.S. Cho, C. Eigenbrot, K.M. Ferguson, T.P.J. Garrett, D.J. Leahy, et al., An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors, *Mol. Cell*. 12 (2003) 541–552. doi:10.1016/S1097-2765(03)00350-2.
- [22] R.-H. Tao, I.N. Maruyama, All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells, *J. Cell Sci*. 121 (2008) 3207–3217. doi:10.1242/jcs.033399.
- [23] J. Schlessinger, A.N. Plotnikov, O.A. Ibrahimi, A. V Eliseenkova, B.K. Yeh, A. Yayon, et al., Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization, *Mol. Cell*. 6 (2000) 743–750. doi:10.1016/S1097-2765(00)00073-3.
- [24] D.J. Stauber, A.D. DiGabriele, W.A. Hendrickson, Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97 (2000) 49–54. doi:10.1073/pnas.97.1.49.
- [25] A. Yayon, M. Klagsbrun, J.D. Esko, P. Leder, D.M. Ornitz, Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor, *Cell*. 64 (1991) 841–848. doi:10.1016/0092-8674(91)90512-W.
- [26] T. Spivak-Kroizman, M. Lemmon, I. Dikic, J.E. Ladbury, D. Pinchasi, J. Huang, et al., Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation, *Cell*. 79 (1994) 1015–1024. doi:10.1016/0092-8674(94)90032-9.
- [27] J.G. Flanagan, P. Vanderhaeghen, The ephrins and Eph receptors in neural development, *Annu. Rev. Neurosci*. 21 (1998) 309–345. doi:10.1146/annurev.neuro.21.1.309.
- [28] S.J. Holland, E. Peles, T. Pawson, J. Schlessinger, Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta$ , *Curr. Opin. Neurobiol*. 8 (1998) 117–127. doi:10.1016/S0959-4388(98)80015-9.

- [29] S. Davis, N.W. Gale, T.H. Aldrich, P.C. Maisonpierre, V. Lhotak, T. Pawson, et al., Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity, *Science*. 266 (1994) 816–819. doi:10.1126/science.7973638.
- [30] E. Stein, A.A. Lane, D.P. Cerretti, H.O. Schoecklmann, A.D. Schroff, R.L. Van Etten, et al., Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses, *Genes Dev.* 12 (1998) 667–678. doi:10.1101/gad.12.5.667.
- [31] A.M. Honegger, R.M. Kris, A. Ullrich, J. Schlessinger, Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86 (1989) 925–929. doi:10.1073/pnas.86.3.925.
- [32] G.A. Rodrigues, M. Park, Oncogenic activation of tyrosine kinases, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 (1994) 15–24. doi:10.1016/0959-437X(94)90086-8.
- [33] D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, et al., Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science*. 244 (1989) 707–712. doi:10.3109/07357909009017573.
- [34] Y. Yarden, J. a Escobedo, W.J. Kuang, T.L. Yang-Feng, T.O. Daniel, P.M. Tremble, et al., Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors, *Nature*. 323 (1986) 226–232. doi:10.1038/323226a0.
- [35] C.H. Heldin, B. Westermark, Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1283–1316.
- [36] S.R. Hubbard, Structural analysis of receptor tyrosine kinases, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71 (1999) 343–358. doi:10.1016/S0079-6107(98)00047-9.
- [37] G. von Heijne, The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology., *EMBO J.* 5 (1986) 3021–3027.
- [38] G. von Heijne, Y. Gavel, Topogenic signals in integral membrane proteins, *Eur. J. Biochem.* 174 (1988) 671–678. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14150.x.
- [39] G. von Heijne, Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues, *Nature*. 341 (1989) 456–458. doi:10.1038/341456a0.
- [40] J.P. Beltzer, K. Fiedler, C. Fuhrer, I. Geffen, C. Handschin, H.P. Wessels, et al., Charged residues are major determinants of the transmembrane orientation of a signal-anchor sequence, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 973–978.
- [41] C. Muhle-Goll, S. Hoffmann, S. Afonin, S.L. Grage, A. a Polyansky, D. Windisch, et al., Hydrophobic matching controls the tilt and stability of the dimeric platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)  $\alpha$  transmembrane segment, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 26178–26186. doi:10.1074/jbc.M111.325555.
- [42] R. Ross, J. Glomset, B. Kariya, L. Harker, A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71 (1974) 1207–1210. doi:10.1073/pnas.71.4.1207.

- [43] C. Betsholtz, A. Johnsson, C.H. Heldin, B. Westermark, P. Lind, M.S. Urdea, et al., cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines, *Nature*. 320 (1986) 695–699. doi:10.1038/320695a0.
- [44] R.F. Doolittle, M.W. Hunkapiller, L.E. Hood, S.G. Devare, K.C. Robbins, S.A. Aaronson, et al., Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor, *Science*. 221 (1983) 275–277. doi:10.1126/science.6304883.
- [45] X. Li, A. Pontén, K. Aase, L. Karlsson, A. Abramsson, M. Uutela, et al., PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 302–309. doi:10.1038/35010579.
- [46] W.J. LaRochelle, M. Jeffers, W.F. McDonald, R.A. Chillakuru, N.A. Giese, N.A. Lokker, et al., PDGF-D, a new protease-activated growth factor, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 517–521. doi:10.1038/35074593.
- [47] E. Bergsten, M. Uutela, X. Li, K. Pietras, A. Ostman, C.H. Heldin, et al., PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 512–516. doi:10.1038/35074588.
- [48] X. Li, U. Eriksson, Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D, *Cytokine Growth Factor Rev.* 14 (2003) 91–98. doi:10.1016/S1359-6101(02)00090-4.
- [49] L. Fredriksson, H. Li, U. Eriksson, The PDGF family: Four gene products form five dimeric isoforms, *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (2004) 197–204. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.007.
- [50] C. Oefner, A. D'Arcy, F.K. Winkler, B. Eggimann, M. Hosang, Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB, *EMBO J.* 11 (1992) 3921–3926.
- [51] A.H.-R. Shim, H. Liu, P.J. Focia, X. Chen, P.C. Lin, X. He, Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107 (2010) 11307–11312. doi:10.1073/pnas.1000806107.
- [52] Y. Yang, S. Yuzawa, J. Schlessinger, Contacts between membrane proximal regions of the PDGF receptor ectodomain are required for receptor activation but not for receptor dimerization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105 (2008) 7681–7686. doi:10.1073/pnas.0802896105.
- [53] J.-B. Demoulin, A. Essaghir, PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells, *Cytokine Growth Factor Rev.* 25 (2014) 273–83. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.03.003.
- [54] J. Griffith, J. Black, C. Faerman, L. Swenson, M. Wynn, F. Lu, et al., The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain, *Mol. Cell.* 13 (2004) 169–178. doi:10.1016/S1097-2765(03)00505-7.
- [55] P.M. Chan, S. Ilangumaran, J. La Rose, A. Chakrabarty, Autoinhibition of the Kit Receptor Tyrosine Kinase by the Cytosolic Juxtamembrane Region, *Society.* 23 (2003) 3067–3078. doi:10.1128/MCB.23.9.3067.

- [56] F. Chiara, S. Bishayee, C.-H. Heldin, J.-B. Demoulin, Autoinhibition of the platelet-derived growth factor beta-receptor tyrosine kinase by its C-terminal tail, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 19732–19738. doi:10.1074/jbc.M314070200.
- [57] A. Kazlauskas, J.A. Cooper, Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins, *Cell.* 58 (1989) 1121–1133. doi:10.1016/0092-8674(89)90510-2.
- [58] P. Wardega, C.H. Heldin, J. Lennartsson, Mutation of tyrosine residue 857 in the PDGF  $\beta$ -receptor affects cell proliferation but not migration, *Cell. Signal.* 22 (2010) 1363–1368. doi:10.1016/j.cellsig.2010.05.004.
- [59] F. Toffalini, J. Demoulin, New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases, *Blood.* 116 (2010) 2429–2437. doi:10.1182/blood-2010-04-279752.The.
- [60] L. Nasir, M.S. Campo, Bovine papillomaviruses: Their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids, *Vet. Dermatol.* 19 (2008) 243–254. doi:10.1111/j.1365-3164.2008.00683.x.
- [61] G. Borzacchiello, Bovine papillomavirus infections in animals, *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* (2007) 673–679.
- [62] O. Silvestre, G. Borzacchiello, D. Nava, G. Iovane, V. Russo, D. Vecchio, et al., Bovine papillomavirus type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas, *Vet. Pathol.* 46 (2009) 636–641. doi:10.1354/vp.08-VP-0222-P-FL.
- [63] C.C. Baker, P.M. Howley, Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues, *EMBO J.* 6 (1987) 1027–1035.
- [64] D. DiMaio, D. Guralski, J.T. Schiller, Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 (1986) 1797–1801. doi:10.1073/pnas.83.6.1797.
- [65] J.T. Schiller, W.C. Vass, K.H. Vousden, D.R. Lowy, E5 Open Reading Frame of Bovine Papillomavirus Type 1 Encodes a Transforming Gene, *J. Virol.* 57 (1986) 1–6.
- [66] A. Burkhardt, D. DiMaio, R. Schlegel, Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein, *EMBO J.* 6 (1987) 2381–2385.
- [67] J. Settleman, A. Fazeli, J. Malicki, B.H. Horwitz, D. DiMaio, Genetic evidence that acute morphologic transformation, induction of cellular DNA synthesis, and focus formation are mediated by a single activity of the bovine papillomavirus E5 protein, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 5563–5572. doi:10.1128/MCB.9.12.5563.Updated.
- [68] R. Schlegel, M. Wade-Glass, M.S. Rabson, Y.C. Yang, The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide, *Science.* 233 (1986) 464–467. doi:10.1126/science.3014660.
- [69] D. DiMaio, L.M. Petti, The E5 proteins, *Virology.* 445 (2013) 99–114. doi:10.1016/j.virol.2013.05.006.

- [70] A. Venuti, F. Paolini, L. Nasir, A. Corteggio, S. Roperto, M.S. Campo, et al., Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions, *Mol. Cancer*. 10 (2011) 140. doi:10.1186/1476-4598-10-140.
- [71] A. Burkhardt, M. Willingham, C. Gay, K.T. Jeang, R. Schlegel, The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes, *Virology*. 170 (1989) 334–339. doi:10.1016/0042-6822(89)90391-7.
- [72] D.J. Goldstein, M.E. Finbow, T. Andresson, P. McLean, K. Smith, V. Bubb, et al., Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases, *Nature*. (1991). doi:10.1038/352347a0.
- [73] P. Martin, W.C. Vass, J.T. Schiller, D.R. Lowy, T.J. Velu, The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors, *Cell*. 59 (1989) 21–32. doi:10.1016/0092-8674(89)90866-0.
- [74] B.D. Cohen, D.R. Lowy, J.T. Schiller, The conserved C-terminal domain of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein can associate with an alpha-adaptin-like molecule: a possible link between growth factor receptors and viral transformation, *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 6462–6468. doi:10.1128/MCB.13.10.6462.Updated.
- [75] L. Petti, L.A. Nilson, D. DiMaio, Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein, *EMBO J.* 10 (1991) 845–855.
- [76] L. Petti, D. DiMaio, Stable association between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and activated platelet-derived growth factor receptor in transformed mouse cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89 (1992) 6736–6740. doi:10.1073/pnas.89.15.6736.
- [77] D.A. Drummond-Barbosa, R.R. Vaillancourt, A. Kazlauskas, D. DiMaio, Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor beta receptor: requirements for bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 2570–2581.
- [78] L.A. Nilson, D. DiMaio, Platelet-derived growth factor receptor can mediate tumorigenic transformation by the bovine papillomavirus E5 protein, *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 4137–4145. doi:10.1128/MCB.13.7.4137.
- [79] D. Windisch, S. Hoffmann, S. Afonin, S. Vollmer, S. Benamira, B. Langer, et al., Structural Role of the Conserved Cysteines in the Dimerization of the Viral Transmembrane Oncoprotein E5, *Biophys. J.* 99 (2010) 1764–1772. doi:10.1016/j.bpj.2010.06.073.
- [80] O.L. Sánchez-Muñoz, E. Strandberg, E. Esteban-Martín, S.L. Grage, A.S. Ulrich, J. Salgado, Canonical azimuthal rotations and flanking residues constrain the orientation of transmembrane helices, *Biophys. J.* 104 (2013) 1508–1516. doi:10.1016/j.bpj.2013.02.030.
- [81] J.A. Killian, G. von Heijne, How proteins adapt to a membrane-water interface, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 429–434. doi:10.1016/S0968-0004(00)01626-1.
- [82] M.R.R. de Planque, J.A.W. Kruijtzter, R.M.J. Liskamp, D. Marsh, D. V Greathouse, R.E. Koeppe, et al., Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane  $\alpha$ -helical peptides, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20839–20846. doi:10.1074/jbc.274.30.20839.

- [83] M.R.R. de Planque, J.A. Killian, Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring, *Mol. Membr. Biol.* 20 (2003) 271–284. doi:10.1080/09687680310001605352.
- [84] D.J. Goldstein, R. Kulke, D. Dimairo, R. Schlegel, A glutamine residue in the membrane-associating domain of the bovine papillomavirus type 1 E5 oncoprotein mediates its binding to a transmembrane component of the vacuolar H(+)-ATPase, *J. Virol.* 66 (1992) 405–413.
- [85] O. Klein, G.W. Polack, T. Surti, D. Kegler-Ebo, S.O. Smith, D. DiMaio, Role of glutamine 17 of the bovine papillomavirus E5 protein in platelet-derived growth factor beta receptor activation and cell transformation, *J. Virol.* 72 (1998) 8921–8932.
- [86] D. DiMaio, D. Mattoon, Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins, *Oncogene.* 20 (2001) 7866–7873. doi:10.1038/sj.onc.1204915.
- [87] D.J. Goldstein, W. Li, L.M. Wang, M.A. Heidarman, S. Aaronson, R. Shinn, et al., The bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein specifically binds and activates the beta-type receptor for the platelet-derived growth factor but not other related tyrosine kinase-containing receptors to induce cellular transformation, *J. Virol.* 68 (1994) 4432–4441.
- [88] D. Mattoon, K. Gupta, J. Doyon, P.J. Loll, D. DiMaio, Identification of the transmembrane dimer interface of the bovine papillomavirus E5 protein, *Oncogene.* 20 (2001) 3824–3834. doi:10.1038/sj.onc.1204523.
- [89] T. Surti, O. Klein, K. Aschheim, D. DiMaio, S.O. Smith, Structural models of the bovine papillomavirus E5 protein, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 33 (1998) 601–612. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(19981201)33:4<601::AID-PROT12>3.0.CO;2-I.
- [90] J. Oates, M. Hicks, T.R. Dafforn, D. DiMaio, A.M. Dixon, In vitro dimerization of the bovine papillomavirus E5 protein transmembrane domain, *Biochemistry.* 47 (2008) 8985–8992. doi:10.1021/bi8006252.
- [91] K. Talbert-Slagle, D. DiMaio, The bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF  $\beta$  receptor: It takes two to tango, *Virology.* 384 (2009) 345–351. doi:10.1016/j.virol.2008.09.033.
- [92] O. Klein, D. Kegler-Ebo, J. Su, S. Smith, D. DiMaio, The bovine papillomavirus E5 protein requires a juxtamembrane negative charge for activation of the platelet-derived growth factor beta receptor and transformation of C127 cells, *J. Virol.* 73 (1999) 3264–3272.
- [93] Y. Cao, Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis, *Trends Mol. Med.* 19 (2013) 460–473. doi:10.1016/j.molmed.2013.05.002.
- [94] E. Wallin, G. von Heijne, Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms, *Protein Sci.* 7 (1998) 1029–1038. doi:10.1002/pro.5560070420.
- [95] T.J. Stevens, I.T. Arkin, Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes?, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 39 (2000) 417–420. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(20000601)39:4<417::AID-PROT140>3.0.CO;2-Y.

- [96] C.M. Armstrong, Ionic pores, gates, and gating currents, *Q. Rev. Biophys.* 7 (1974) 179–210. doi:10.1017/S0033583500001402.
- [97] E. Gouaux, R. Mackinnon, Principles of selective ion transport in channels and pumps, *Science*. 310 (2005) 1461–1465. doi:10.1126/science.1113666.
- [98] M. Takeichi, Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator, *Science*. 251 (1991) 1451–1455. doi:10.1126/science.2006419.
- [99] R.L. Juliano, Integrin Signaling, *Cancer Metastasis Rev.* 24 (2005) 379–379. doi:10.1007/s10555-005-5127-2.
- [100] K.M. Yamada, S. Miyamoto, Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 681–689. doi:10.1016/0955-0674(95)80110-3.
- [101] J.L. Popot, D.M. Engelman, Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model, *Biochemistry*. 29 (1990) 4031–4037. doi:10.1021/bi00469a001.
- [102] D.M. Engelman, Y. Chen, C.-N. Chin, A.R. Curran, A.M. Dixon, A.D. Dupuy, et al., Membrane protein folding: beyond the two stage model, *FEBS Lett.* 555 (2003) 122–125. doi:10.1016/S0014-5793(03)01106-2.
- [103] M.A. Yildirim, K.-I. Goh, M.E. Cusick, A.-L. Barabási, M. Vidal, Drug-target network, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1119–1126. doi:10.1038/nbt1338.
- [104] K.S. Mineev, E. V Bocharov, P.E. Volynsky, M. V Goncharuk, E.N. Tkach, Y.S. Ermolyuk, et al., Dimeric structure of the transmembrane domain of glycophorin a in lipidic and detergent environments, *Acta Naturae*. 3 (2011) 90–8.
- [105] K. Nishimura, S. Kim, L. Zhang, T.A. Cross, The closed state of a H<sup>+</sup> channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR, *Biochemistry*. 41 (2002) 13170–13177. doi:10.1021/bi0262799.
- [106] T. Aït Slimane, D. Hoekstra, Sphingolipid trafficking and protein sorting in epithelial cells, *FEBS Lett.* 529 (2002) 54–59. doi:10.1016/S0014-5793(02)03183-6.
- [107] M.A. Surma, C. Klose, K. Simons, Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network, *Biochim. Biophys. Acta.* 1821 (2012) 1059–67. doi:10.1016/j.bbailip.2011.12.008.
- [108] J.A. Killian, Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1376 (1998) 401–415. doi:10.1016/S0304-4157(98)00017-3.
- [109] M. Jensen, O.G. Mouritsen, Lipids do influence protein function - The hydrophobic matching hypothesis revisited, *Biochim. Biophys. Acta.* 1666 (2004) 205–226. doi:10.1016/j.bbamem.2004.06.009.
- [110] H. Hong, L.K. Tamm, Elastic coupling of integral membrane protein stability to lipid bilayer forces, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (2004) 4065–4070. doi:10.1073/pnas.0400358101.
- [111] F. Dumas, J.-F. Tocanne, G. Leblanc, M.-C. Lebrun, Consequences of Hydrophobic Mismatch between Lipids and Melibiose Permease on Melibiose Transport, *Biochemistry*. 39 (2000) 4846–4854. doi:10.1021/bi992634s.

- [112] A. Lee, Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective, 2003. doi:10.1016/S0005-2736(03)00056-7.
- [113] S.H. Park, B.B. Das, A.A. De Angelis, M. Scrima, S.J. Opella, Mechanically, magnetically, and “rotationally aligned” membrane proteins in phospholipid bilayers give equivalent angular constraints for NMR structure determination, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 13995–14003. doi:10.1021/jp106043w.
- [114] N.A. Swords, B.A. Wallace, Circular-dichroism analyses of membrane proteins: examination of environmental effects on bacteriorhodopsin spectra, *Biochem. J.* 289 (Pt 1) (1993) 215–219.
- [115] S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta.* 1751 (2005) 119–139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- [116] J.U. Bowie, Helix packing in membrane proteins, *J. Mol. Biol.* 272 (1997) 780–789. doi:10.1006/jmbi.1997.1279.
- [117] I.T. Arkin, A.T. Brunger, Statistical analysis of predicted transmembrane  $\alpha$ -helices, *Biochim. Biophys. Acta.* 1429 (1998) 113–128. doi:10.1016/S0167-4838(98)00225-8.
- [118] M.B. Ulmschneider, M.S. Sansom, Amino acid distributions in integral membrane protein structures, *Biochim. Biophys. Acta.* 1512 (2001) 1–14. doi:10.1016/S0005-2736(01)00299-1.
- [119] W. DeGrado, H. Gratkowski, J. Lear, How do helix–helix interactions help determine the folds of membrane proteins? Perspectives from the study of homo-oligomeric helical bundles, *Protein Sci.* (2003) 647–665. doi:10.1110/ps.0236503.membrane.
- [120] J.N. Israelachvili, Van der Waals forces in biological systems, *Q. Rev. Biophys.* 6 (1973) 341. doi:10.1017/S0033583500001566.
- [121] S.H. White, W.C. Wimley, Membrane protein folding and stability: physical principles, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28 (1999) 319–365. doi:10.1146/annurev.biophys.28.1.319.
- [122] A. Kauko, K. Illergård, A. Elofsson, Coils in the Membrane Core Are Conserved and Functionally Important, *J. Mol. Biol.* 380 (2008) 170–180. doi:10.1016/j.jmb.2008.04.052.
- [123] M. Eilers, S.C. Shekar, T. Shieh, S.O. Smith, P.J. Fleming, Internal packing of helical membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 5796–5801. doi:10.1073/pnas.97.11.5796.
- [124] K.R. MacKenzie, Folding and stability of  $\alpha$ -helical integral membrane proteins, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1931–1977. doi:10.1021/cr0404388.
- [125] D. Langosch, E. Lindner, R. Gurezka, In vitro selection of self-interacting transmembrane segments-membrane proteins approached from a different perspective, *IUBMB Life.* 54 (2002) 109–113. doi:10.1080/15216540290114324.
- [126] D. Langosch, J. Heringa, Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 31 (1998)

- 150–159. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(19980501)31:2<150::AID-PROT5>3.0.CO;2-Q.
- [127] J.R. Herrmann, J.C. Panitz, S. Unterreitmeier, A. Fuchs, D. Frishman, D. Langosch, Complex patterns of histidine, hydroxylated amino acids and the GxxxG motif mediate high-affinity transmembrane domain interactions., *J. Mol. Biol.* 385 (2009) 912–23. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.058.
- [128] W.P. Russ, D.M. Engelman, The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association., *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 911–9. doi:10.1006/jmbi.1999.3489.
- [129] S. Kim, T.-J. Jeon, A. Oberai, D. Yang, J.J. Schmidt, J.U. Bowie, Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (2005) 14278–14283. doi:10.1073/pnas.0501234102.
- [130] M. Lemmon, J.M. Flanagan, J.F. Hunt, B.D. Adair, B.J. Bormann, C.E. Dempsey, et al., Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane  $\alpha$ -helices, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 7683–7689.
- [131] A.K. Doura, F.J. Kobus, L. Dubrovsky, E. Hibbard, K.G. Fleming, Sequence context modulates the stability of a GxxxG-mediated transmembrane helix-helix dimer, *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 991–998. doi:10.1016/j.jmb.2004.06.042.
- [132] M.T. Duong, T.M. Jaszewski, K.G. Fleming, K.R. MacKenzie, Changes in Apparent Free Energy of Helix-Helix Dimerization in a Biological Membrane Due to Point Mutations, *J. Mol. Biol.* 371 (2007) 422–434. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.026.
- [133] D. Langosch, B. Brosig, H. Kolmar, H.J. Fritz, Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator, *J. Mol. Biol.* 263 (1996) 525–530. doi:10.1006/jmbi.1996.0595.
- [134] W.P. Russ, D.M. Engelman, TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999) 863–868. doi:10.1073/pnas.96.3.863.
- [135] D. Windisch, C. Ziegler, J. Bürck, A. Ulrich, Structural characterization of a C-terminally truncated E5 oncoprotein from papillomavirus in lipid bilayers, *Biol. Chem.* 395 (2014) 1443–52. doi:10.1515/hsz-2014-0222.
- [136] S.O. Smith, D. Song, S. Shekar, M. Groesbeek, M. Ziliox, S. Aimoto, Structure of the transmembrane dimer interface of glycophorin A in membrane bilayers, *Biochemistry.* 40 (2001) 6553–6558. doi:10.1021/bi010357v.
- [137] M. Lemmon, H.R. Treutlein, P.D. Adams, A.T. Brünger, D.M. Engelman, A dimerization motif for transmembrane  $\alpha$ -helices, *Nat. Struct. Biol.* (1994). doi:10.1038/nsb0394-157.
- [138] K.R. MacKenzie, D.M. Engelman, Structure-based prediction of the stability of transmembrane helix-helix interactions: the sequence dependence of glycophorin A dimerization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (1998) 3583–3590. doi:10.1073/pnas.95.7.3583.
- [139] M.M. Javadpour, M. Eilers, M. Groesbeek, S.O. Smith, Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association, *Biophys. J.* 77 (1999) 1609–1618. doi:10.1016/S0006-3495(99)77009-8.

- [140] K.R. MacKenzie, J.H. Prestegard, D.M. Engelman, A transmembrane helix dimer: structure and implications, *Science*. 276 (1997) 131–133. doi:10.1126/science.276.5309.131.
- [141] H.R. Treutlein, M.A. Lemmon, D.M. Engelman, A.T. Brunger, The glycoporphin A transmembrane domain dimer: Sequence-specific propensity for a right-handed supercoil of helices, *Biochemistry*. 31 (1992) 12726–12732. doi:10.1021/bi00166a003.
- [142] A. Senes, I. Ubarretxena-Belandia, D.M. Engelman, The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98 (2001) 9056–9061. doi:10.1073/pnas.161280798.
- [143] S.O. Smith, M. Eilers, D. Song, E. Crocker, W. Ying, M. Groesbeek, et al., Implications of threonine hydrogen bonding in the glycoporphin A transmembrane helix dimer, *Biophys. J.* 82 (2002) 2476–2486. doi:10.1016/S0006-3495(02)75590-2.
- [144] R.F.S. Walters, W.F. DeGrado, Helix-packing motifs in membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (2006) 13658–63. doi:10.1073/pnas.0605878103.
- [145] A. Senes, M. Gerstein, D.M. Engelman, Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions, *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 921–936. doi:10.1006/jmbi.1999.3488.
- [146] A. Senes, D.E. Engel, W.F. DeGrado, Folding of helical membrane proteins: The role of polar, GxxxG-like and proline motifs, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 (2004) 465–479. doi:10.1016/j.sbi.2004.07.007.
- [147] E. V. Bocharov, K.S. Mineev, M. V. Goncharuk, A.S. Arseniev, Structural and thermodynamic insight into the process of “weak” dimerization of the ErbB4 transmembrane domain by solution NMR, *Biochim. Biophys. Acta*. 1818 (2012) 2158–2170. doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.001.
- [148] F.J. Kobus, K.G. Fleming, The GxxxG-containing transmembrane domain of the CCK4 oncogene does not encode preferential self-interactions, *Biochemistry*. 44 (2005) 1464–1470. doi:10.1021/bi048076l.
- [149] S. Unterreitmeier, A. Fuchs, T. Schäffler, R.G. Heym, D. Frishman, D. Langosch, Phenylalanine promotes interaction of transmembrane domains via GxxxG motifs, *J. Mol. Biol.* 374 (2007) 705–18. doi:10.1016/j.jmb.2007.09.056.
- [150] R.A. Melnyk, S. Kim, A.R. Curran, D.M. Engelman, J.U. Bowie, C.M. Deber, The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix-helix interactions is modulated by long-range communication, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 16591–7. doi:10.1074/jbc.M313936200.
- [151] A.K. Doura, K.G. Fleming, Complex interactions at the helix-helix interface stabilize the glycoporphin A transmembrane dimer, *J. Mol. Biol.* 343 (2004) 1487–97. doi:10.1016/j.jmb.2004.09.011.
- [152] W.H. Landschulz, P.F. Johnson, S.L. McKnight, The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Science*. 240 (1988) 1759–1764. doi:10.1126/science.3289117.

- [153] R. Gurezka, R. Laage, B. Brosig, D. Langosch, A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 9265–9270. doi:10.1074/jbc.274.14.9265.
- [154] E. V Bocharov, M.L. Mayzel, P.E. Volynsky, K.S. Mineev, E.N. Tkach, Y.S. Ermolyuk, et al., Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: Helix packing diversity among receptor tyrosine kinases, *Biophys. J.* 98 (2010) 881–889. doi:10.1016/j.bpj.2009.11.008.
- [155] L. Adamian, J. Liang, Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers., *Proteins.* 47 (2002) 209–18. doi:10.1002/prot.10071.
- [156] C. Choma, H. Gratkowski, J.D. Lear, W.F. DeGrado, Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix, *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000) 161–166. doi:10.1038/72440.
- [157] W. Ruan, E. Lindner, D. Langosch, The interface of a membrane spanning leucine zipper mapped by asparagine scanning mutagenesis, *Protein Sci.* (2004) 555–559. doi:10.1110/ps.03357404.1998.
- [158] F.X. Zhou, H.J. Merianos, A.T. Brunger, D.M. Engelman, Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (2001) 2250–2255. doi:10.1073/pnas.041593698.
- [159] E.S. Sulistijo, K.R. MacKenzie, Structural basis for dimerization of the BNIP3 transmembrane domain, *Biochemistry.* 48 (2009) 5106–5120. doi:10.1021/bi802245u.
- [160] J.P. Dawson, R.A. Melnyk, C.M. Deber, D.M. Engelman, Sequence context strongly modulates association of polar residues in transmembrane helices, *J. Mol. Biol.* 331 (2003) 255–262. doi:10.1016/S0022-2836(03)00714-9.
- [161] F.X. Zhou, M.J. Cocco, W.P. Russ, A.T. Brunger, D.M. Engelman, Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins, *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000) 154–160. doi:10.1038/72430.
- [162] T.H. Walther, C. Gottselig, S.L. Grage, M. Wolf, A. V Vargiu, M.J. Klein, et al., Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism, *Cell.* 152 (2013) 316–326. doi:10.1016/j.cell.2012.12.017.
- [163] S.J. Fleishman, J. Schlessinger, N. Ben-Tal, A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (2002) 15937–15940. doi:10.1073/pnas.252640799.
- [164] T. Moriki, H. Maruyama, I.N. Maruyama, Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain, *J. Mol. Biol.* 311 (2001) 1011–1026. doi:10.1006/jmbi.2001.4923.
- [165] J.P. Duneau, A.P. Vegh, J.N. Sturgis, A dimerization hierarchy in the transmembrane domains of the HER receptor family, *Biochemistry.* 46 (2007) 2010–2019. doi:10.1021/bi061436f.
- [166] C. Escher, F. Cymer, D. Schneider, Two GxxxG-Like Motifs Facilitate Promiscuous Interactions of the Human ErbB Transmembrane Domains, *J. Mol. Biol.* 389 (2009) 10–16. doi:10.1016/j.jmb.2009.04.002.

- [167] K.S. Mineev, E. V Bocharov, Y.E. Pustovalova, O. V Bocharova, V. V Chupin, A.S. Arseniev, Spatial Structure of the Transmembrane Domain Heterodimer of ErbB1 and ErbB2 Receptor Tyrosine Kinases, *J. Mol. Biol.* 400 (2010) 231–243. doi:10.1016/j.jmb.2010.05.016.
- [168] M.A. Olayioye, R.M. Neve, H.A. Lane, N.E. Hynes, The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer, *EMBO J.* 19 (2000) 3159–3167. doi:10.1093/emboj/19.13.3159.
- [169] R. Waninge, E. Kalda, M. Paulsson, T. Nylander, B. Bergenstahl, Cryo-TEM of isolated milk fat globule membrane structures in cream, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 1518. doi:10.1039/b314613h.
- [170] S.F. Fenz, K. Sengupta, Giant vesicles as cell models, *Integr. Biol.* 4 (2012) 982–95. doi:10.1039/c2ib00188h.
- [171] D. Lingwood, K. Simons, Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science*. 327 (2010) 46–50. doi:10.1126/science.1174621.
- [172] M. Glaser, Lipid domains in biological membranes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 (1993) 475–481. doi:10.1016/0959-440X(93)90070-2.
- [173] Q. Lin, E. London, Altering hydrophobic sequence lengths shows that hydrophobic mismatch controls affinity for ordered lipid domains (rafts) in the multitransmembrane strand protein perfringolysin O, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 1340–1352. doi:10.1074/jbc.M112.415596.
- [174] S.J. Opella, F.M. Marassi, Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy, *Biochem. Cell Biol.* 80 (2004) 597–604. doi:10.1139/o02-154.
- [175] E. Strandberg, A.S. Ulrich, NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides, *Concepts Magn. Reson. Part A.* 23A (2004) 89–120. doi:10.1002/cmr.a.20024.
- [176] A.A. De Angelis, D.H. Jones, C. V. Grant, S.H. Park, M.F. Mesleh, S.J. Opella, NMR experiments on aligned samples of membrane proteins, *Methods Enzymol.* 394 (2005) 350–382. doi:10.1016/S0076-6879(05)94014-7.
- [177] A.A. Nevzorov, S.J. Opella, Selective averaging for high-resolution solid-state NMR spectroscopy of aligned samples, *J. Magn. Reson.* 185 (2007) 59–70. doi:10.1016/j.jmr.2006.09.006.
- [178] C.H. Wu, A. Ramamoorthy, S.J. Opella, High-Resolution Heteronuclear Dipolar Solid-State NMR Spectroscopy, *J. Magn. Reson. Ser. A.* 109 (1994) 270–272. doi:10.1006/jmra.1994.1169.
- [179] R.C. Page, S. Kim, T.A. Cross, Transmembrane Helix Uniformity Examined by Spectral Mapping of Torsion Angles, *Structure*. 16 (2008) 787–797. doi:10.1016/j.str.2008.02.018.
- [180] J.K. Denny, J. Wang, T.A. Cross, J.R. Quine, PISEMA powder patterns and PISA wheels, *J. Magn. Reson.* 152 (2001) 217–226. doi:10.1006/jmre.2001.2405.

- [181] J. Wang, J. Denny, C. Tian, S. Kim, Y. Mo, F. Kovacs, et al., Imaging membrane protein helical wheels, *J. Magn. Reson.* 144 (2000) 162–167. doi:10.1006/jmre.2000.2037.
- [182] S. Kim, T.A. Cross, 2D solid state NMR spectral simulation of 3(10), alpha, and pi-helices, *J. Magn. Reson.* 168 (2004) 187–193. doi:10.1016/j.jmr.2004.02.009.
- [183] L. Stryer, R.P. Haugland, Energy transfer: a spectroscopic ruler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1967). doi:10.1146/annurev.bi.47.070178.004131.
- [184] H. Sahoo, Förster resonance energy transfer - A spectroscopic nanoruler: Principle and applications, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 12 (2011) 20–30. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2011.05.001.
- [185] T. Heyduk, Measuring protein conformational changes by FRET/LRET, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 292–296. doi:10.1016/S0958-1669(02)00332-4.
- [186] E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2006) 409–416. doi:10.1016/j.cbpa.2006.08.021.
- [187] K. Kawano, Y. Yano, K. Omae, S. Matsuzaki, K. Matsuzaki, Stoichiometric analysis of oligomerization of membrane proteins on living cells using coiled-coil labeling and spectral imaging, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3454–3461. doi:10.1021/ac400177a.
- [188] B.D. Adair, D.M. Engelman, Glycophorin A helical transmembrane domains dimerize in phospholipid bilayers: a resonance energy transfer study, *Biochemistry.* 33 (1994) 5539–5544.
- [189] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, W.W. Webb, Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation, *Biophys. J.* 77 (1999) 2251–2265. doi:10.1016/S0006-3495(99)77065-7.
- [190] E. Haustein, P. Schwille, Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 (2007) 151–169. doi:10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612.
- [191] T. Dertinger, V. Pacheco, I. Von Der Hocht, R. Hartmann, I. Gregor, J. Enderlein, Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: A new tool for accurate and absolute diffusion measurements, *ChemPhysChem.* 8 (2007) 433–443. doi:10.1002/cphc.200600638.
- [192] P. Schwille, F.J. Meyer-Almes, R. Rigler, Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution, *Biophys. J.* 72 (1997) 1878–1886. doi:10.1016/S0006-3495(97)78833-7.
- [193] P.F. Fahey, D.E. Koppel, L.S. Barak, D.E. Wolf, E.L. Elson, W.W. Webb, Lateral diffusion in planar lipid bilayers, *Science.* 195 (1977) 305–306. doi:10.1126/science.831279.
- [194] P. Schwille, J. Korfach, W.W. Webb, Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes, *Cytometry.* 36 (1999) 176–182. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19990701)36:3<176::AID-CYTO5>3.0.CO;2-F.

- [195] J. Kowlach, P. Schwille, W.W. Webb, G.W. Feigenson, Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999) 8461–8466. doi:10.1073/pnas.96.15.8461.
- [196] J. Ries, P. Schwille, Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 91 (2006) 1915–1924. doi:10.1529/biophysj.106.082297.
- [197] D. Windisch, Struktur und Dimerisierung des membranständigen Onkoproteins E5 aus dem Rinder-Papillomavirus Typ I, 2009.
- [198] R.J. Pounder, M.J. Stanford, P. Brooks, S.P. Richards, A.P. Dove, Metal free thiol-maleimide “Click” reaction as a mild functionalisation strategy for degradable polymers, *Chem. Commun.* (2008) 5158–5160. doi:10.1039/b809167f.
- [199] S. Ramadurai, A. Holt, L. V Schäfer, V. V Krasnikov, D.T.S. Rijkers, S.J. Marrink, et al., Influence of hydrophobic mismatch and amino acid composition on the lateral diffusion of transmembrane peptides, *Biophys. J.* 99 (2010) 1447–1454. doi:10.1016/j.bpj.2010.05.042.
- [200] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3281–3287. doi:10.1021/ac00091a044.
- [201] J.O. Lay, MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria, *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 172–194. doi:10.1002/mas.10003.
- [202] D. Touboul, A. Brunelle, O. Lapr evote, Mass spectrometry imaging: Towards a lipid microscope?, *Biochimie.* 93 (2011) 113–119. doi:10.1016/j.biochi.2010.05.013.
- [203] M. Rance, R.A. Byrd, Obtaining high-fidelity powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 52 (1983) 221–240. doi:10.1016/0022-2364(83)90190-7.
- [204] A. Pines, M.G. Gibby, J.S. Waugh, Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids, *J. Chem. Phys.* 59 (1973) 569. doi:10.1063/1.1680061.
- [205] M.H. Levitt, D. Suter, R.R. Ernst, Spin dynamics and thermodynamics in solid-state NMR cross polarization, *J. Chem. Phys.* 84 (1986) 4243. doi:10.1063/1.450046.
- [206] N. Sinha, C. V. Grant, C.H. Wu, A.A. De Angelis, S.C. Howell, S.J. Opella, SPINAL modulated decoupling in high field double- and triple-resonance solid-state NMR experiments on stationary samples, *J. Magn. Reson.* 177 (2005) 197–202. doi:10.1016/j.jmr.2005.07.008.
- [207] B.M. Fung, A.K. Khitrin, K. Ermolaev, An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids, *J. Magn. Reson.* 142 (2000) 97–101. doi:10.1006/jmre.1999.1896.
- [208] A.A. Nevzorov, S.J. Opella, A “Magic Sandwich” pulse sequence with reduced offset dependence for high-resolution separated local field spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 164 (2003) 182–186. doi:10.1016/S1090-7807(03)00240-4.

- [209] L. Shang, L. Yang, F. Stockmar, R. Popescu, V. Trouillet, M. Bruns, et al., Microwave-assisted rapid synthesis of luminescent gold nanoclusters for sensing Hg<sup>2+</sup> in living cells using fluorescence imaging, *Nanoscale*. 4 (2012) 4155. doi:10.1039/c2nr30219e.
- [210] N.F. Morales-Pennington, J. Wu, E.R. Farkas, S.L. Goh, T.M. Konyakhina, J.Y. Zheng, et al., GUV preparation and imaging: minimizing artifacts, *Biochim. Biophys. Acta*. 1798 (2010) 1324–32. doi:10.1016/j.bbamem.2010.03.011.
- [211] P.N. Hedde, R.M. Dörlich, R. Blomley, D. Gradl, E. Oppong, A.C.B. Cato, et al., Stimulated emission depletion-based raster image correlation spectroscopy reveals biomolecular dynamics in live cells, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2093. doi:10.1038/ncomms3093.
- [212] K.J. Hallock, K. Henzler Wildman, D.-K. Lee, A. Ramamoorthy, An innovative procedure using a sublimable solid to align lipid bilayers for solid-state NMR studies, *Biophys. J.* 82 (2002) 2499–2503. doi:10.1016/S0006-3495(02)75592-6.
- [213] H.P. Sang, S.J. Opella, Tilt angle of a trans-membrane helix is determined by hydrophobic mismatch, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 310–318. doi:10.1016/j.jmb.2005.05.004.
- [214] R.C. Page, C. Li, J. Hu, F.P. Gao, T.A. Cross, Lipid bilayers: An essential environment for the understanding of membrane proteins, *Magn. Reson. Chem.* 45 (2007) 954–961. doi:10.1002/mrc.2077.
- [215] D. Marsh, Energetics of hydrophobic matching in lipid-protein interactions, *Biophys. J.* 94 (2008) 3996–4013. doi:10.1529/biophysj.107.121475.
- [216] J.R. Quine, S. Achuthan, T. Asbury, R. Bertram, M.S. Chapman, J. Hu, et al., Intensity and mosaic spread analysis from PISEMA tensors in solid-state NMR, *J. Magn. Reson.* 179 (2006) 190–198. doi:10.1016/j.jmr.2005.12.002.
- [217] F. Moll, T.A. Cross, Optimizing and characterizing alignment of oriented lipid bilayers containing gramicidin D, *Biophys. J.* 57 (1990) 351–362. doi:10.1016/S0006-3495(90)82536-4.
- [218] J.P. Slotte, Biological functions of sphingomyelins, *Prog. Lipid Res.* 52 (2013) 424–437. doi:10.1016/j.plipres.2013.05.001.
- [219] D. Windisch, C. Ziegler, S.L. Grage, J. Bürck, M. Zeitler, P. L., et al., The E5 oncoprotein emulates the membrane alignment of the PDGF receptor via hydrophobic mismatch, *Biophys. J.* (2015) submitted.
- [220] A. de Laurentiis, L. Donovan, A. Arcaro, Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors, *Open Biochem. J.* 1 (2007) 12–32. doi:10.2174/1874091X00701010012.
- [221] A.A. Nevzorov, S.J. Opella, Structural fitting of PISEMA spectra of aligned proteins, *J. Magn. Reson.* 160 (2003) 33–39. doi:10.1016/S1090-7807(02)00138-6.
- [222] T. Mitsuda, K. Furukawa, S. Fukumoto, H. Miyazaki, T. Urano, K. Furukawa, Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11239–11246. doi:10.1074/jbc.M107756200.

- [223] K. Mitra, I. Ubarretxena-Belandia, T. Taguchi, G. Warren, D.M. Engelman, Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (2004) 4083–4088. doi:10.1073/pnas.0307332101.
- [224] A.G. Lee, How lipids affect the activities of integral membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta.* 1666 (2004) 62–87. doi:10.1016/j.bbamem.2004.05.012.
- [225] R.L. Cornea, D.D. Thomas, Effects of membrane thickness on the molecular dynamics and enzymatic activity of reconstituted Ca-ATPase, *Biochemistry.* 33 (1994) 2912–2920.
- [226] A.J. De Jesus, T.W. Allen, The determinants of hydrophobic mismatch response for transmembrane helices, *Biochim. Biophys. Acta.* 1828 (2013) 851–863. doi:10.1016/j.bbamem.2012.09.012.
- [227] R.J. Webb, J.M. East, R.P. Sharma, A.G. Lee, Hydrophobic mismatch and the incorporation of peptides into lipid bilayers: A possible mechanism for retention in the Golgi, *Biochemistry.* 37 (1998) 673–679. doi:10.1021/bi972441+.
- [228] G. King, J. Oates, D. Patel, H.A. Van Den Berg, A.M. Dixon, Towards a structural understanding of the smallest known oncoprotein: Investigation of the bovine papillomavirus E5 protein using solution-state NMR, *Biochim. Biophys. Acta.* 1808 (2011) 1493–1501. doi:10.1016/j.bbamem.2010.11.004.
- [229] A. Prodöhl, M. Weber, C. Dreher, D. Schneider, A mutational study of transmembrane helix-helix interactions, *Biochimie.* 89 (2007) 1433–1437. doi:10.1016/j.biochi.2007.06.006.
- [230] W.F. Walkenhorst, M. Merzlyakov, K. Hristova, W.C. Wimley, Polar residues in transmembrane helices can decrease electrophoretic mobility in polyacrylamide gels without causing helix dimerization, *Biochim. Biophys. Acta.* 1788 (2009) 1321–1331. doi:10.1016/j.bbamem.2009.02.017.
- [231] Y.H. Foo, N. Naredi-Rainer, D.C. Lamb, S. Ahmed, T. Wohland, Factors affecting the quantification of biomolecular interactions by fluorescence cross-correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 102 (2012) 1174–1183. doi:10.1016/j.bpj.2012.01.040.
- [232] S. Hoffmann, Die Rolle des Transmembransegments bei der Dimerisierung des PDGF-Rezeptors  $\beta$ , 2011.

## 9 Materialien

Folgende Chemikalien, Materialien und Geräte wurden verwendet.

### 9.1 Materialien und Geräte

- Autoklav:
  - VX-95 (Systemec)
  - 2540 EL (Systemec)
- Brutschrank Incucell, MMM Medcenter, Einrichtungen
- Heizblock (Wealtec Corp., HB-2)
- HPLC (Jasco Industries) bestehend aus:
  - 2 Pumpen 2087-PU
  - Hochdruckmischer 2080-DHD
  - Säulenthermostat CO-200
  - Diodenarray-Detektor MD-2010
  - Steuerbox Jasco-LC-Net II
  - manueller Injektor Rheodyne
- HPLC-Säulen:
  - Protein & Peptide C18 Säule Grace Vydac Semi-Prep, 218TPS10, 250 x 10 mm
  - Protein & Peptide C18 Säule Grace Vydac Analytisch, 218TPS10, 250 x 4,6 mm
- Inkubationsschüttler:
  - G25 (New Brunswick Scientific GmbH)
  - Innova 44 (New Brunswick Scientific GmbH)
- Kühlschränke
  - 4 °C bzw. -20 °C (Siemens)
  - -80 °C (Forma 900 Series, Thermofisher Scientific)
- Lyophilisator
  - Alpha I-6 (Christ)
  - Alpha 2-4 LD (Christ)
- Magnetrührer mit Heizplatte (RCT, IKA Labortechnik) MALDI-TOF Massenspektrometer Autoflex III (Bruker Daltonics)
- NMR-Spektrometer Avance, 500 MHz (Ultraschild) *Wide Bore* (Bruker Biospin)
- NMR-Spektrometer Avance, 600 MHz (Ultraschild) *Wide Bore* (Bruker Biospin) + Probenköpfe
- NMR-Probenkopf

- 
- HXY Triple Resonance, statisch, austauschbare Spule (Bruker Biospin)
  - LowE Black
  - pH-Messgeräte
    - QpH 70 (VWR International GmbH)
    - pH 315i (WTW)
  - Pipetten:
    - 0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 50 - 200 µl, 100 - 1000 µl Reference (Eppendorf)
    - 1 - 5 ml (Finepipette)
  - Reinraumbank Herasafe (Heraeus Instruments)
  - Reinstwasseranlage (Millipore)
  - Rotationsverdampfer:
    - Manometer CVC 211 (Vacuumbrand GmbH & Co KG)
    - Heizbad 461 (Büchi)
    - Kühler cool-care (Heijden-Labortechnik)
    - Vakuumpumpe MZ 20C (Vacuumbrand GmbH & Co)
  - Stromversorger (Power Pac 300, BioRad)
  - Ultraschallgeräte
    - Branson Sonifier 250 (G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik)
    - Sonorex super RK510 (Bandelin electronic)
    - Ultrasonic cleaner (VWR)
  - Ultrazentrifuge L8-M (Beckmann)
  - Vortexer Genie K-550-GE (Bender und Hobein AG)
  - Waagen:
    - analytic pB 3001 (Mettler Toledo)
    - analytic CP 64 (Sartorius)
    - analytic M2P (Sartorius)
  - Wasserbad 006T (Lauda)
  - Wasserbad Thermostat A100 (Lauda)Zentrifugen:
    - 3-18 K (Sigma)
    - Avanti Centrifuge J-25 (Beckmann)
    - Centrifuge 5415 C (Eppendorf)
    - Centrifuge 5417 R (Eppendorf)
  - Zentrifugenrotoren:
    - JA14 (Beckmann)
    - SWI-28 (Beckmann)
    - JLA-9100 (Beckmann)

- SS34 (Sorvall)

## 9.2 Chemikalien

- Acetonitril (Fisher Scientific)
- Ameisensäure (Roth)
- Ammoniumsulfat  $^{15}\text{N}$  99 % (Spec. St. Iso.)
- Ampicillin-Natriumsalz (Roth)
- Bactotrypton (Roth)
- Calciumchlorid (Roth)
- Chloroform (Roth)
- Deoxycholsäure-Na-Salz (Roth)
- Dinatriumhydrogenphosphat (AppliChem)
- Ethanol (Merck)
- Glucose (Fluka)
- Glycerin (Roth)
- Guanidin Hydrochlorid (Roth)
- Hefeextrakt (Roth)
- Hydroxylamin (Sigma)
- Ipegal CA-630 (Sigma)
- IPTG (Roth)
- Isopropanol (Fisher Scientific)
- Kaliumdihydrogenphosphat (AppliChem)
- Lithiumhydroxid (Merck)
- Lysozym (AppliChem)
- Methanol (Fisher Scientific)
- Natriumazid (Roth)
- Natriumchlorid (Fisher Sci.)
- Natriumhydroxid (Merck)
- Natriumphosphat (Fluka)
- Salzsäure (AppliChem)
- Stickstoff (Messer Griesheim)
- Thiamin-Hydrochlorid (AppliChem)
- Trifluoressigsäure (Sigma)
- Trifluorethanol (Acros)
- Tris-Hydrochlorid (Roth)
- Trypton (Roth)

### 9.3 Verbrauchsmaterialien

- Alufolie (Roth)
- Autoklavierband (Comply Indicator Tape, 3M)
- Dialysemembran: Zellutrans V-Serie 2 kDa MWCO (Roth)
- Einmalhandschuhe (VWR)
- Einmal-Spritzen 20 ml, 10ml, 2 ml, 1 ml (Inject, B. Braun)
- Einmal-Spritzenfilter steril 0,22 µm (Roth)
- Einmal-Spritzenfilter PDVF unsteril 0,45 µm (Roth)
- Falcon-Tubes 15 ml, 50 ml (Sarstedt)
- Halbmikroküvetten 1 ml (Sarstedt)
- NMR-Glasplättchen (7,5 x 12 mm) (Marienfeld)
- Parafilm (Laboratory film, American National Can)
- Pasteur-Pipetten (WU Mainz)
- Petri Schalen (Sarstedt)
- Pipettenspitzen 1 ml, 200 µl, 10 µl (Sarstedt), 5 ml (Finnpipette)
- Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Sarstedt)

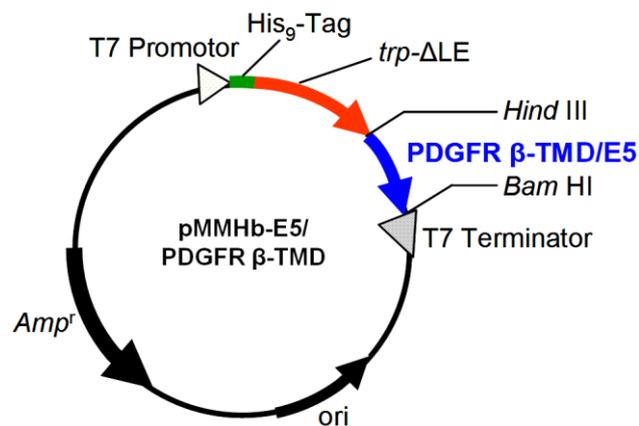
### 9.4 Detergenzien und Lipide

- TritonX-100 (Sigma)
- n-dodecylphosphocholine (DPC/Avanti Polar Lipids)
- 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DLPC/Avanti Polar Lipids)
- 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DMPC/Avanti Polar Lipids)
- 1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMoPC/Avanti Polar Lipids)
- 1,2-Dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPoPC/Avanti Polar Lipids)
- 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DOPC/Avanti Polar Lipids)
- 1,2-Dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DEiPC/Avanti Polar Lipids)
- 1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DErPC/Avanti Polar Lipids)
- 1,2-Dinervonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DNPC/Avanti Polar Lipids)

### 9.5 Bakterienstämme und Vektoren

- *E. coli* BL21(DE3) (Novagen)
- pMMHb-E5
  - Induktor: IPTG
  - Promotor: T7

- Resistenz: Ampicillin
- Tag: *trp*-ΔLE und His<sub>9</sub>-Tag
- Hergestellt von Dr. S. Benamira (KIT Karlsruhe)



**Abbildung 59:** Der Expressionsvektor pMMHb-E5 bzw. pMMHb-PDGFRβ-TMD. (geändert übernommen von [232])

## 9.6 Puffer und Lösungen

CaCl <sub>2</sub> (0,1 M):	1,1 g CaCl <sub>2</sub> 100 ml H <sub>2</sub> O bidest. steril filtriert
Thiamin-HCl (50 mg/ml):	500 mg Thiamin 10 ml H <sub>2</sub> O bidest. steril filtrieren
Ampicillin Stammlösung (1000x):	1 g Ampicillin 10 ml H <sub>2</sub> O bidest. bei -20 °C lagern
LB-Medium:	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 1 L H <sub>2</sub> O bidest. pH = 7,5, autoklavieren

---

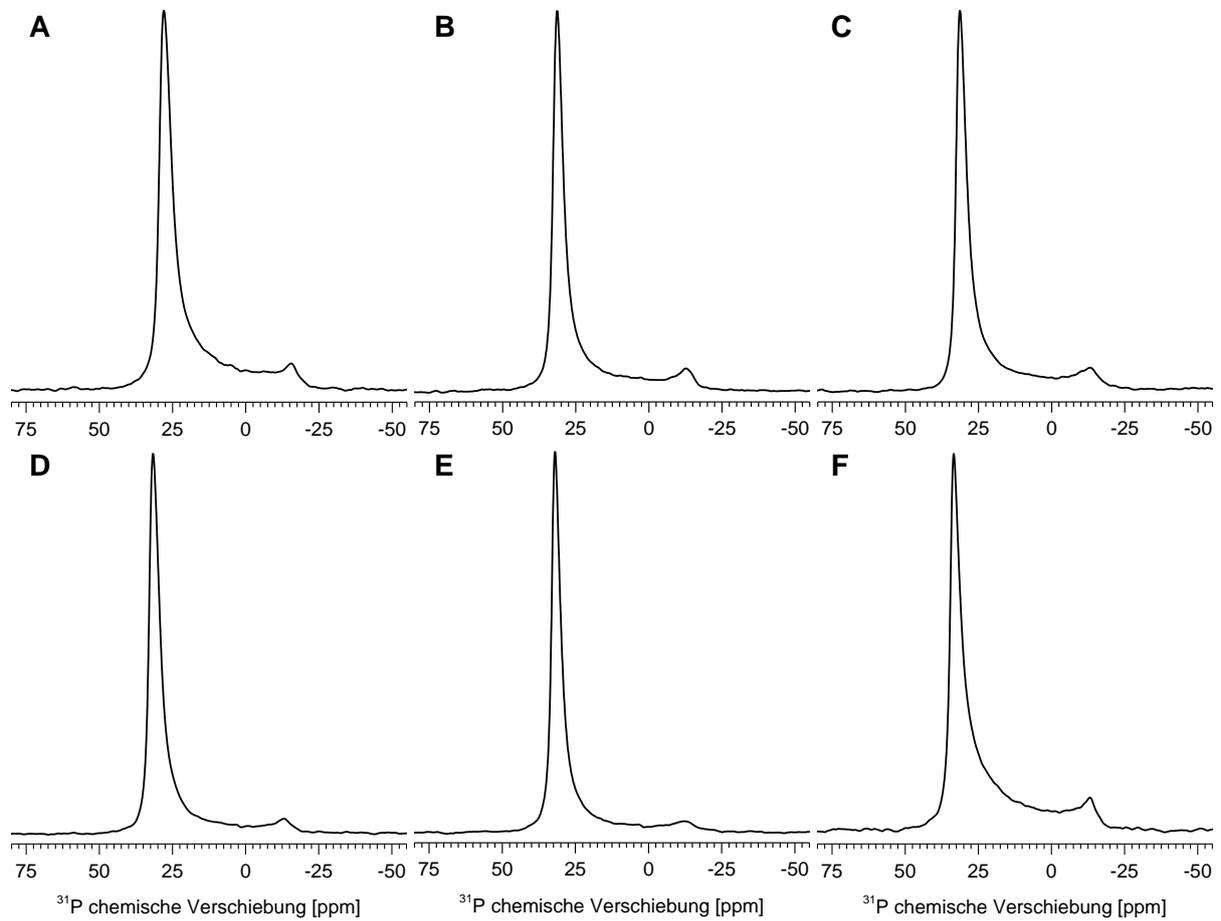
M9-Minimalmedium:	1x M9-Salz-Lösung 0,1 mM $\text{CaCl}_2$ 1 mM $\text{MgSO}_4$ 50 mg/L Thiamin-HCl 10 g/L Glucose 1 % LB-Medium 100 mg/L Ampicillin 1 L $\text{H}_2\text{O}$ bidest.
$\text{MgSO}_4$ (1 M):	12 g $\text{MgSO}_4$ 100 ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest. steril filtrieren
Glucose (20 %):	10 g Glucose 50 ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest. steril filtrieren
M9-Salz-Lösung (10x):	7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 3 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,5 g NaCl 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest
IPTG-Löung (200 mM):	0,476 g IPTG 10 ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest. steril filtrieren bei -20 °C lagern
<b>Isolierung Inclusion Bodies:</b>	
Lösung I:	50 mM Tris-HCl (pH 8) 15 % Glycerin 50 µg/ml Lysozym 1 mM $\text{NaN}_3$ 79 ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest.

---

Lösung II:	50 mM Tris-HCl (pH 8) 1 % Deoxycholsäure 1 % Ipegal CA-630 1 mM NaN <sub>3</sub> 93 ml H <sub>2</sub> O bidest.
Lösung III:	20 mM Tris-HCl (pH 8) 6 M Guanidin-HCl 45 ml H <sub>2</sub> O bidest
Hydroxylamin-Verdaulösung:	5,5 g Hydroxylamin 27,2 g Guanidin-HCl 20 ml 4,5 M LiOH-Lösung (filtriert) mit LiOH-Lösung auf pH 9
<b>HPLC:</b>	
Eluent A (E5):	95 % H <sub>2</sub> O bidest. entgast 3 % Isopropanol 2 % Acetonitril 5 mM HCl
Eluent A (PDGFR $\beta$ -TMD):	95 % H <sub>2</sub> O bidest. entgast 2,5 % Isopropanol 2,5 % Acetonitril 5 mM HCl
Eluent B (E5):	5 % H <sub>2</sub> O bidest. entgast 57 % Isopropanol 38 % Acetonitril 5 mM HCl
Eluent B (PDGFR $\beta$ -TMD):	5 % H <sub>2</sub> O bidest. entgast 50 % Isopropanol 50 % Acetonitril 5 mM HCl

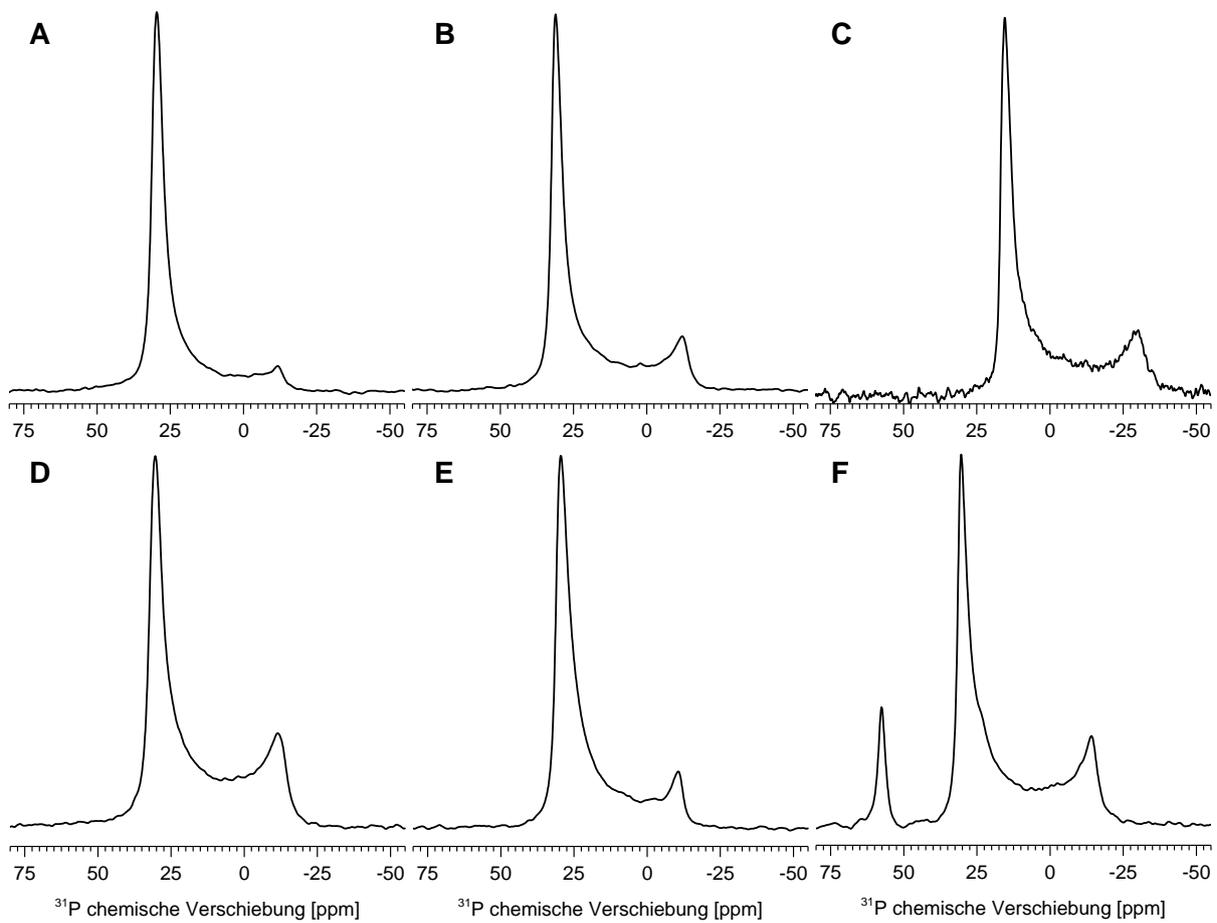
## 10 Anhang

### 10.1 $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD



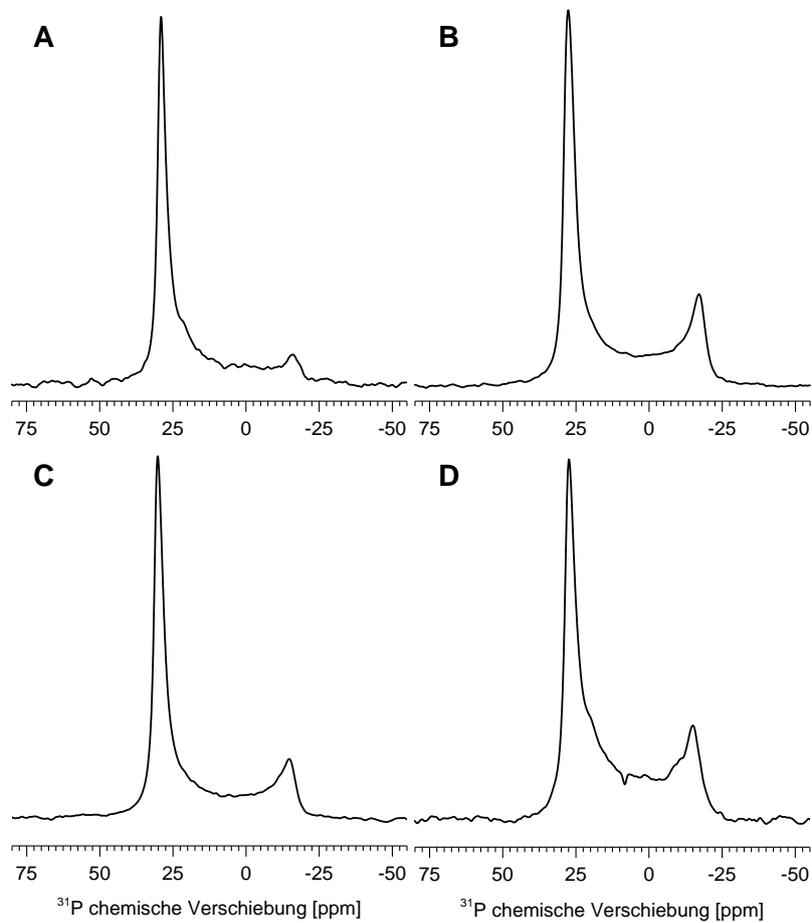
**Abbildung 60:**  $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD in verschiedenen Membranen. Diese Experimente dienen dazu, die gewünschte Orientierung der Lipide zu überprüfen. **A:** DNPC. **B:** DErPC. **C:** DEiPC. **D:** DOPC. **E:** DPoPC. **F:** DMPC

## 10.2 $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren von $\Delta\text{E5}$



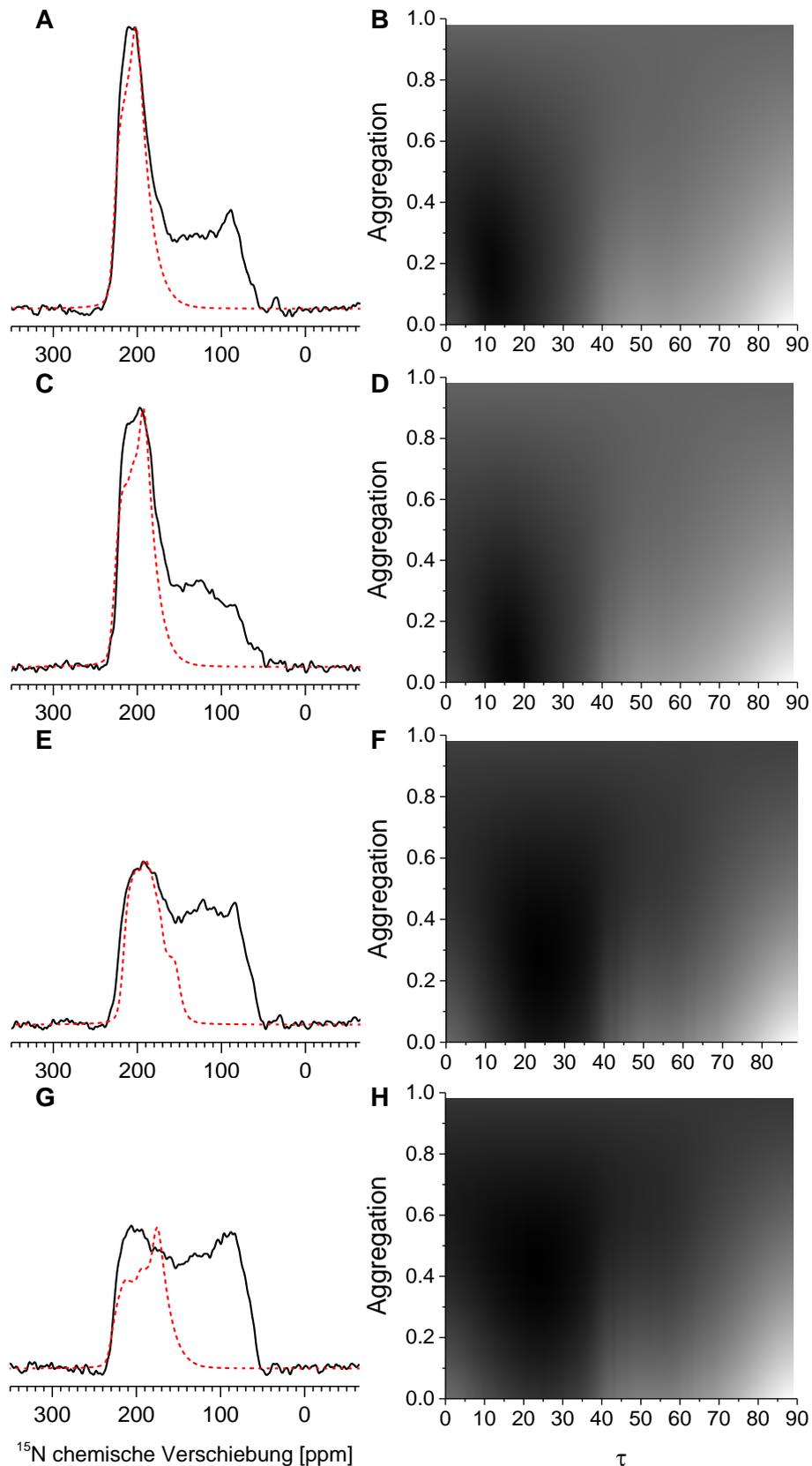
**Abbildung 61:**  $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren von  $\Delta\text{E5}$  in verschiedenen Membranen. Diese Experimente dienen dazu, die gewünschte Orientierung der Lipide zu überprüfen. **A:** DNPC. **B:** DErPC. **C:** DEiPC. **D:** DOPC. **E:** Sphingomyelin/Cholesterin (2:1). **F:** DErPC (mit TCEP)

### 10.3 $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren der Interaktionsexperimente

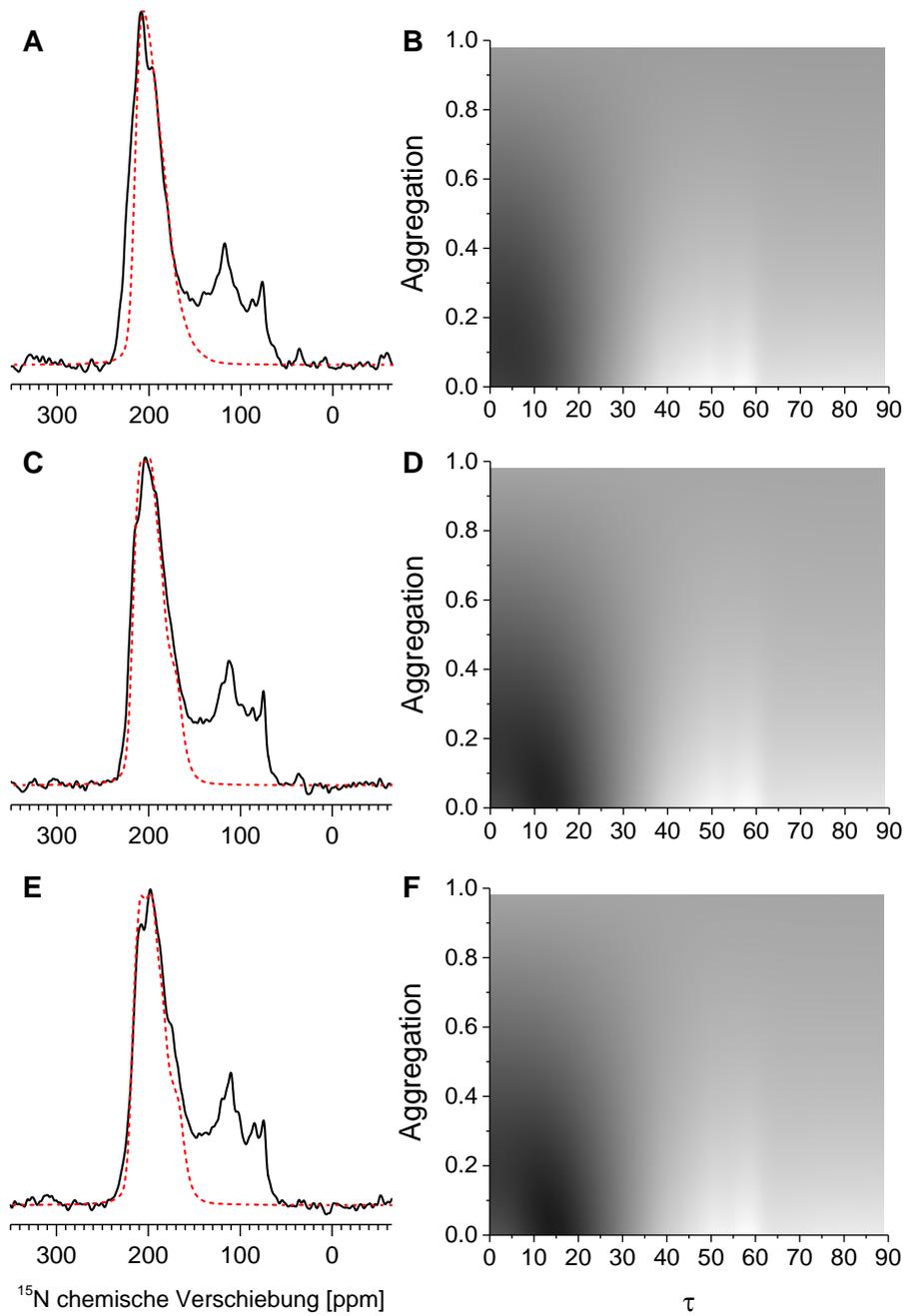


**Abbildung 62:**  $^{31}\text{P}$ -NMR 1D-Spektren der Interaktionsexperimente in verschiedenen Membranen. Diese Experimente dienen dazu, die gewünschte Orientierung der Lipide zu überprüfen. **A:** DErPC ( $^{15}\text{N}$ -PDGFR $\beta$ -TMD mit  $^{14}\text{N}$ - $\Delta\text{E5}$ ). **B:** DOPC ( $^{15}\text{N}$ -PDGFR $\beta$ -TMD mit  $^{14}\text{N}$ - $\Delta\text{E5}$ ). **C:** DErPC ( $^{15}\text{N}$ - $\Delta\text{E5}$  mit  $^{14}\text{N}$ -PDGFR $\beta$ -TMD). **D:** DOPC ( $^{15}\text{N}$ - $\Delta\text{E5}$  mit  $^{14}\text{N}$ -PDGFR $\beta$ -TMD).

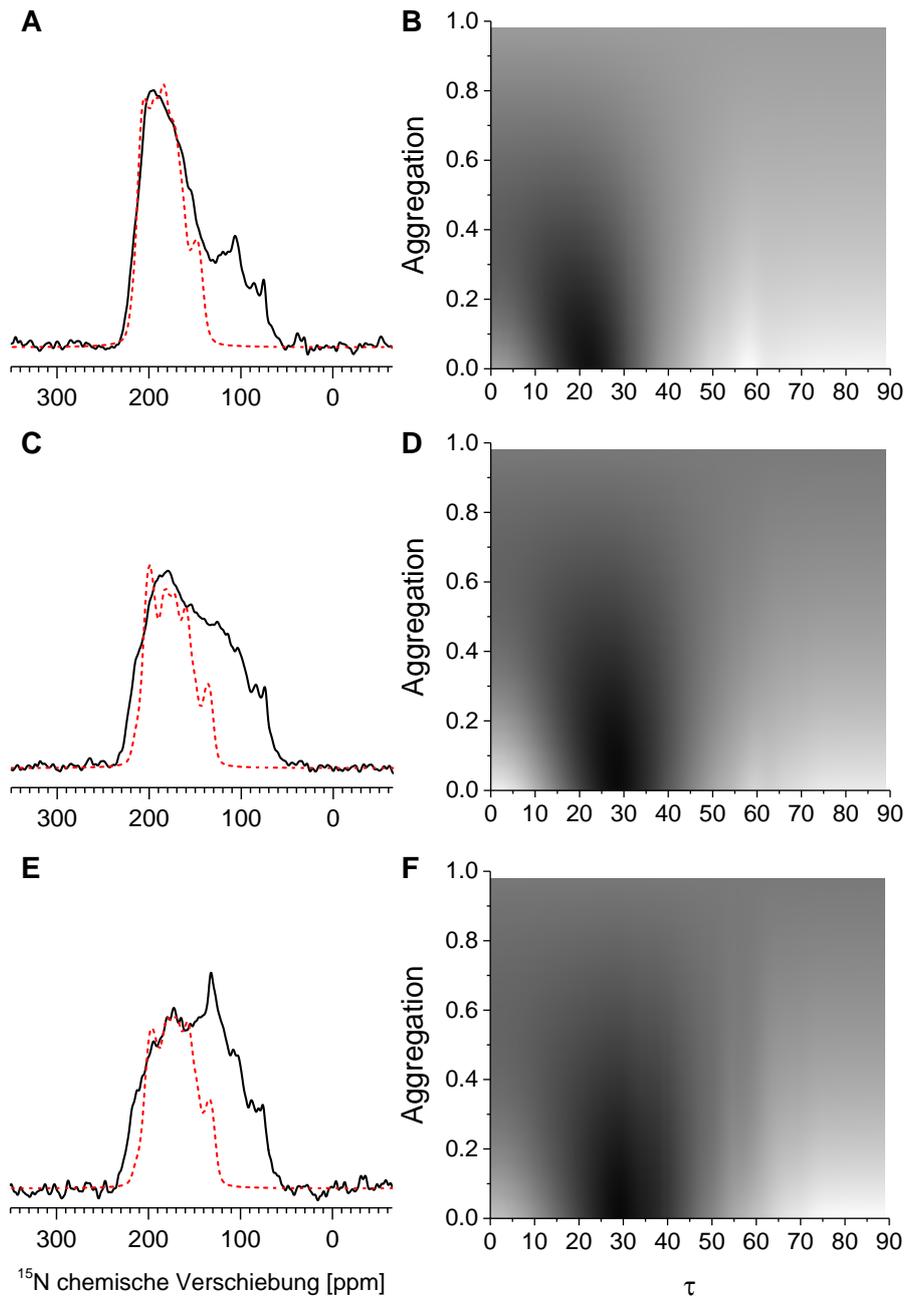
## 10.4 Simulationen der NMR-Spektren zur Tiltwinkelbestimmung



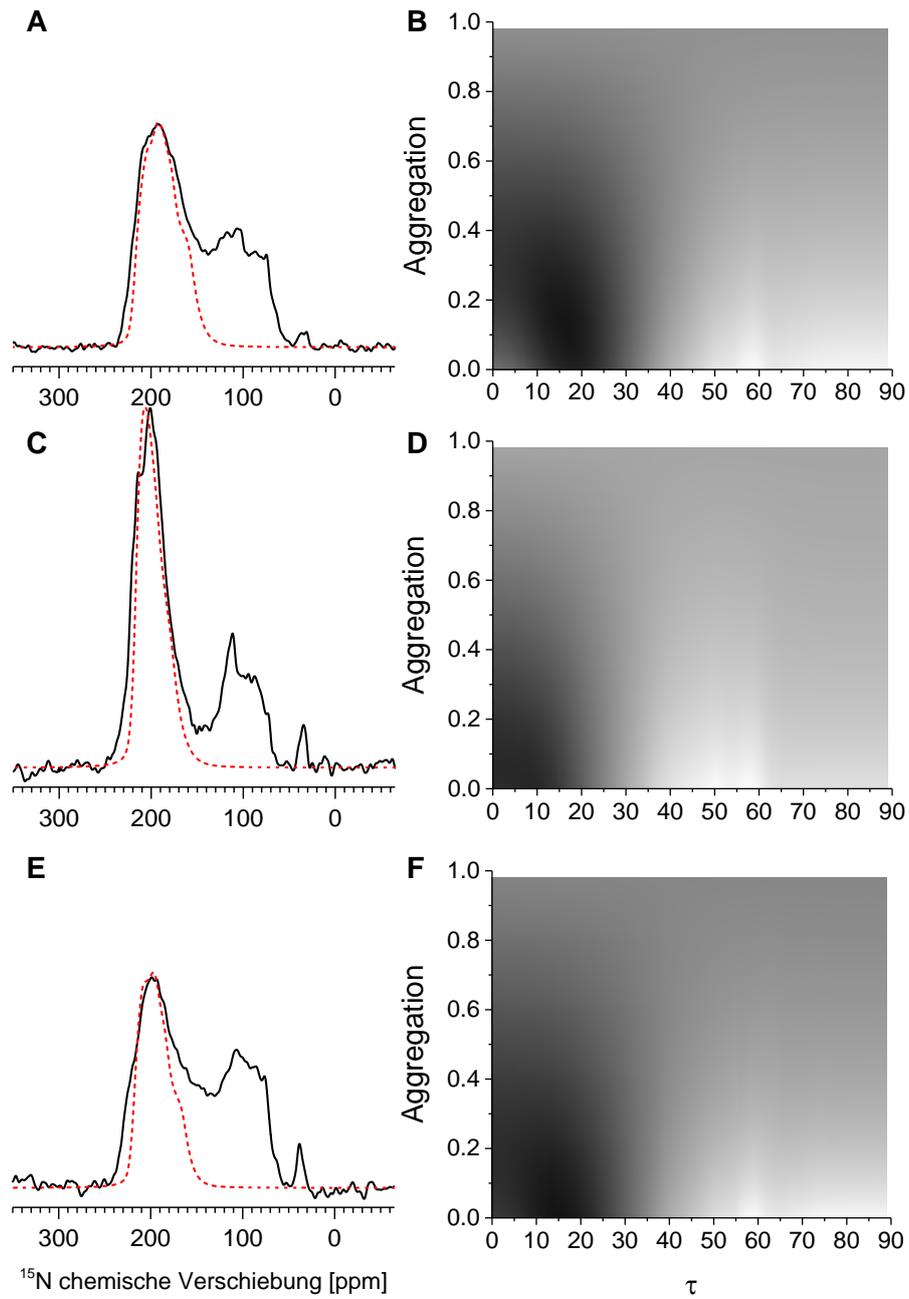
**Abbildung 63:**  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von  $\Delta\text{E5}$  (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen (rot) und RMSD Diagramme. **A** und **B**: DNPC; **C** und **D**: DErPC; **E** und **F**: DEiPC; **G** und **H**: Spingomyelin/Cholesterin.



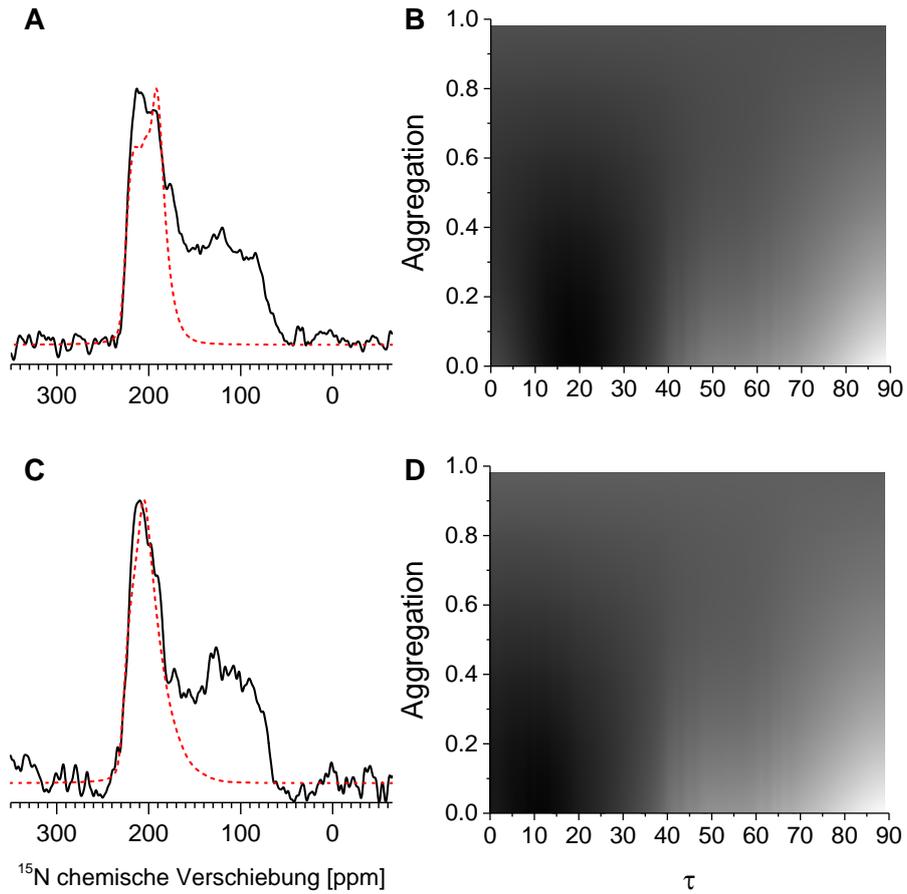
**Abbildung 64:**  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen (rot) und RMSD Diagramme. **A** und **B**: DNPC; **C** und **D**: DErPC; **E** und **F**: DEiPC.



**Abbildung 65:**  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen (rot) und RMSD Diagramme. **A** und **B**: DOPC; **C** und **D**: DPoPC; **E** und **F**: DMPC.



**Abbildung 66:**  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von PDGFR $\beta$ -TMD (schwarz) mit den entsprechenden Tilt-winkelsimulationen (rot) und RMSD Diagramme. **A** und **B**: DOPC/SM/Chol; **C** und **D**: DErPC mit  $^{14}\text{N}$ - $\Delta\text{E5}$ ; **E** und **F**: DOPC mit  $^{14}\text{N}$ - $\Delta\text{E5}$ .



**Abbildung 67:**  $^{15}\text{N}$ -NMR 1D-Spektren von  $\Delta\text{E5}$  (schwarz) mit den entsprechenden Tiltwinkelsimulationen (rot) und RMSD Diagramme. **A** und **B**: DErPC mit  $^{14}\text{N}$ -PDGFR $\beta$ -TMD; **C** und **D**: DOPC mit  $^{14}\text{N}$ -PDGFR $\beta$ -TMD.

---

## Publikationen

### Fachartikel:

D. Windisch, C. Ziegler, J. Bürck, A. Ulrich, "Structural characterization of a C-terminally truncated E5 oncoprotein from papillomavirus in lipid bilayers" *Biological Chemistry*, 395(2014) pp.1443-1452 DOI:10.1515/hsz-2014-0222

D. Windisch, C. Ziegler, S.L. Grage, J. Bürck, M. Zeitler, P. L., et al., The E5 oncoprotein emulates the membrane alignment of the PDGF receptor via hydrophobic mismatch, *Biophys. J.* (2015) submitted.

### Tagungsbeiträge:

Ziegler, C.; Windisch, D; Grage, S.L.; Ulrich, A.S. "Structural investigations of the heterotetrameric PDGFR<sub>TMD</sub>/E5 Complex" *Membrane Biophysics and Lipid-Protein Interaction: EBSA Biophysics Course*, 24-29.06. 2012, Bordeaux, Frankreich, Posterbeitrag

### Posterbeiträge

Windisch, D.; Ziegler, C.; Bürck, J.; Grage, S.; Ulrich, A.S. "Solid-state NMR, synchrotron CD and oriented CD of a receptor tyrosine kinase transmembrane segment and its interactions with a viral oncoprotein." *Physical Approaches to Membrane Proteins : 564.WE-Heraeus Seminar*, Bad Honnef, Mai 25-28, 2014

9.Transport Colloquium, Rauischholzhausen, 8.-9. Mai 2014

Windisch, D.; Ziegler, C.; Bürck, J.; Grage, S.; Ulrich, A.S. "Solid-state NMR and oriented CD of a receptor tyrosine kinase transmembrane segment and its interactions with a viral oncoprotein." *2nd Workshop Structural Biology in the Helmholtz Association*, München, November 28-29, 2013