



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

Vienna University of Technology

Institut für angewandte Physik
Arbeitsgruppe Biophysik

Diplomarbeit

Das Verhalten von Plasmamembran–Nanostrukturen bei milden Heat–Shock Bedingungen

Joschka Hellmeier

Studienrichtung: Biomedical Engineering

Matr.-Nr.: 0825797

Oktober 04, 2016

Betreuer: Univ.–Prof. Dipl.–Ing., Dr. Gerhard Schütz
Univ.–Ass. Dipl.–Ing., Dr. Mario Brameshuber

Meiner liebevollen Familie und meiner Freundin Nikola gewidmet, die mich nicht nur durch mein Studium begleitet haben, sondern mir auch in schwierigen Momenten immer wieder den Rücken gestärkt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Biophysik–Arbeitsgruppe, allen voran Gerhard Schütz und Mario Brameshuber. Durch das angenehme Arbeitsklima war es für mich jeden Tag eine Freude ans Institut zu kommen.

Vielen Dank Mario für die intensive, geduldige und nette Betreuung während der gesamten Zeit meiner Diplomarbeit. Durch deine konstruktiven Ratschläge, dein offenes Ohr und deine motivierenden Worte konnte ich nicht nur sehr viel lernen, sondern du hast es auch geschafft, dass ein Teil deiner Begeisterung für die Biophysik auf mich übersprungen ist.

Weiters möchte ich mich auch bei Elena Parkinson bedanken, die mich zu Beginn geduldig in der Zellkultur eingeschult hat.

Ein Dankeschön auch an Martin Fölser, der mir sehr hilfreich bei der Auswertung meiner Kalziumdaten war und dafür einiges seiner Zeit geopfert hat.

Kurzfassung

Ein seit Jahrhunderten bewährter Überlebensmechanismus ist „Fieber“, wobei wir im weiteren Kontext von einem Heat-Shock sprechen. Durch den Anstieg der Temperatur über die übliche, physiologische Körpertemperatur wird in den Zellen eine spezifische Reaktion ausgelöst. Dabei werden vermehrt Heat-Shock-Proteine produziert, um den Gleichgewichtszustand der Zelle wieder herzustellen. Fehler oder unvollständige Abläufe in dieser Kaskade sind Bestandteil vieler schwerer Krankheiten. Abgesehen von einer veränderten Expression von Proteinen bzw. einer erhöhten Produktion von Heat-Shock-Proteine können weitere intrazelluläre und extrazelluläre Effekte während und nach einem Heat-Shock beobachtet werden.

In dieser Arbeit wird auf Veränderungen der äußeren Seite der Plasmamembran und ein intrazelluläres Feedback von modifizierten Chinese Hamster Ovary-Zellen durch einen Heat-Shock eingegangen. Die Zellen sind dabei über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit einem grün fluoreszierenden Protein versehen. Mit Hilfe spezieller Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie wird die Stabilität von Nanoplatfformen auf der äußeren Zellmembran für physiologische und erhöhte Temperaturen untersucht. Dabei wird sowohl der zeitliche Verlauf der Nanoplatfformen als auch der Oberflächendichte, der Expression und der Mobilität von GFP-GPI-Molekülen durch einen Heat-Shock gezeigt. Weiters werden die Auswirkungen der sauren Sphingomyelinase, der Endozytose und der Polymerisation von Aktin auf die Stabilität der Nanoplatfformen veranschaulicht.

Zur Überprüfung einer intrazellulären Antwort wird für unterschiedliche Heat-Shock-Szenarien der zeitliche Verlauf des Ca^{2+} -Signals analysiert. Mit Hilfe eines Vergleichs der intrazellulären und extrazellulären Reaktionen wird eine mögliche Erklärung für diese Heat-Shock-Effekte gegeben.

Abstract

During the last centuries there was one specific survival mechanism that proved itself worthwhile. In further context we will talk about that survival mechanism, namely fever, and refer to it as 'heat-shock'. Due to the rise of temperature above the usual physiological body temperature a specific reaction is triggered in the cells. An increased amount of heat-shock-proteins is produced to reestablish the state of equilibrium of the cell. If errors or incomplete sequences occur during this cascade, the faults can lead to different severe diseases or become parts of such diseases. Besides a changed expression of proteins or a raised production of heat-shock-proteins, further intracellular and extracellular effects during and after a heat-shock can be observed.

In this thesis changes of the outer side of the plasmamembrane and an intracellular feedback of modified chinese-hamster-ovary cells affected by a heat-shock are examined. The cells are hereby furnished with a glycosylphosphatidylinositol-anchor with a green fluorescent protein. With the aid of special application possibilities of the fluorescence microscopy the stability of nanoplatforms on the outer cellmembrane in the case of physiological and elevated temperatures is investigated. Thereby the time course of nanoplatforms as well as the surface density, the expression level and the mobility of GFP-GPI-molecules affected by a heat-shock are visualized.

To check for an intracellular answer, the time course of the Ca^{2+} -signal is analyzed for different heat-shock-scenarios. By comparing the intracellular and extracellular reactions, a possible explanation for those heat-shock-effects is given.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1	Plasmamembran	4
1.1	Aufbau	4
1.2	Dynamik	8
1.3	Funktion	10
1.3.1	Membrantransport	10
1.3.2	Zellkommunikation	11
1.4	Nanoplatfformen	14
2	Zelluläre Stress–Antwort (ZSA)	17
2.1	Grundlagen	17
2.2	Heat–Shock–Response (HSR)	19
2.3	Heat–Shock–Protein (HSP)	22
2.3.1	Geschichte	22
2.3.2	Aufbau	24
2.3.2.1	HSP 90	25
2.3.2.2	HSP 70	27
2.3.2.3	HSP 60	27
2.3.2.4	HSP40	28
2.3.2.5	sHSP	29
2.3.3	Funktion	30
2.3.3.1	HSP 90	30
2.3.3.2	HSP 70	30
2.3.3.3	HSP 60	32
2.3.3.4	HSP 40	33
2.3.3.5	sHSP	33
3	Membransensor Hypothese	35

Inhaltsverzeichnis

4	Struktur der Plasmamembran während eines Heat-Shocks	38
5	Fluoreszenzmikroskopie	41
5.1	Grundlagen	41
5.2	Grenzen der Fluoreszenzmikroskopie	43
5.3	Spezielle Anwendungsmöglichkeiten	44
5.3.1	Einzelmolekülmikroskopie	44
5.3.2	TIRF-Mikroskopie	45
5.3.3	FRET	46
5.3.4	TOCCSL	48
2	Problemstellung	53
3	Materialien & Methoden	61
1	Zellkultur und Probenpräparation	61
1.1	CHO mGFP-GPI	61
1.2	CHO SNAP	62
1.3	Probenpräparation	62
1.3.1	CHO mGFP-GPI-Messungen	62
1.3.2	aSMase-Inhibitor-Messungen	63
1.3.3	Endozytose-Inhibitor-Messungen	64
1.3.4	Aktin-Messungen	64
1.3.5	FRET-Messungen	64
1.3.6	Ca^{2+} -Messungen	65
2	Versuchsaufbau	67
2.1	Setup 1 (SDT 1)	67
2.2	Setup 3 (SDT 3)	68
3	Bildaufzeichnung	69
3.1	CHO mGFP-GPI-Messungen	69
3.2	aSMase-Inhibitor-Messungen	70
3.3	Endozytose-Inhibitor-Messungen	71
3.4	FRET-Messungen	71
3.5	Aktin-Messungen	73
3.6	Ca^{2+} -Messungen	73

4	Bildanalyse	74
4.1	Einzelmolekülmessungen	74
4.2	FRET-Messungen	78
4.3	Ca ²⁺ -Messungen	79
4	Resultate	83
1	Auswirkungen eines HS auf NS der PM von CHO-Zellen	83
2	Auswirkungen von aSMase und Endozytose auf Nanoplattformen der PM	94
3	Abhängigkeit von PM und Zytoskelett	104
4	FRET-Effizienz während eines Heat-Shocks	106
5	Zusammenfassung	109
	Abkürzungsverzeichnis	115
	Abbildungsverzeichnis	119
	Tabellenverzeichnis	121
	Literaturverzeichnis	123

1 Einleitung

Der menschliche Körper besteht aus knapp 10^{14} Zellen, wobei sich deren Aufgabengebiete teilweise stark unterscheiden. Strukturen und Funktionen der einzelnen Zellen sind an deren Aufgabengebiete angepasst. [1]

Um einen reibungslosen Ablauf garantieren zu können, sind die Zellen einer ständigen Erneuerung unterworfen. Dabei sterben jeden Tag mehrere Millionen Zellen, doch fast ebensoviele Zellen werden parallel dazu neu gebildet.

Äußere Einflüsse haben nicht immer positive Effekte auf das System, sondern können den Zustand der Homöostase auch gravierend beeinflussen. Spezielle Abwehrmechanismen sind deshalb gefordert, um die Zelle zu schützen. Diese Einflüsse können unterschiedlichster Natur sein. Nicht nur mechanischer und thermischer Stress können zu einer Umstrukturierung der Zelle führen, sondern auch Bakterien, Viren und Toxine. Die Auswirkungen müssen aber nicht immer tödlich für die Zelle sein, sondern können auch lediglich temporär sein. Soll sich die Zelle von diesen Einflüssen regenerieren, wird ein intaktes Abwehrsystem vorausgesetzt.

Bereits bei einem geringen Anstieg der Temperatur, beginnt die Zelle unverzüglich spezielle Proteine zu synthetisieren, die einer äußeren und inneren Schädigung der Zelle entgegenwirken sollen, sogenannte Stress-Proteine oder Heat-Shock-Proteine (HSPs). Dabei tragen die HSPs neben ihrer schützenden Wirkung für die Zelle auch noch dazu bei, dass Proteine korrekt synthetisiert und gefaltet werden.[2] Da bei einem milden Heat-Shock (HS) Proteine für gewöhnlich nicht denaturieren, stellt sich die Frage, welche Rolle HS-Proteine hierbei spielen. Dachte man zu Beginn, dass diese Zellreaktion lediglich bei einem rapiden Temperaturanstieg zu beobachten sei, konnte man in weiterer Folge diesen Effekt auch mit anderen Initiatoren nachweisen (z. B. Alkohol, UV-Strahlung, Toxine, Entzündung...).[3, 4, 5]

1 Einleitung

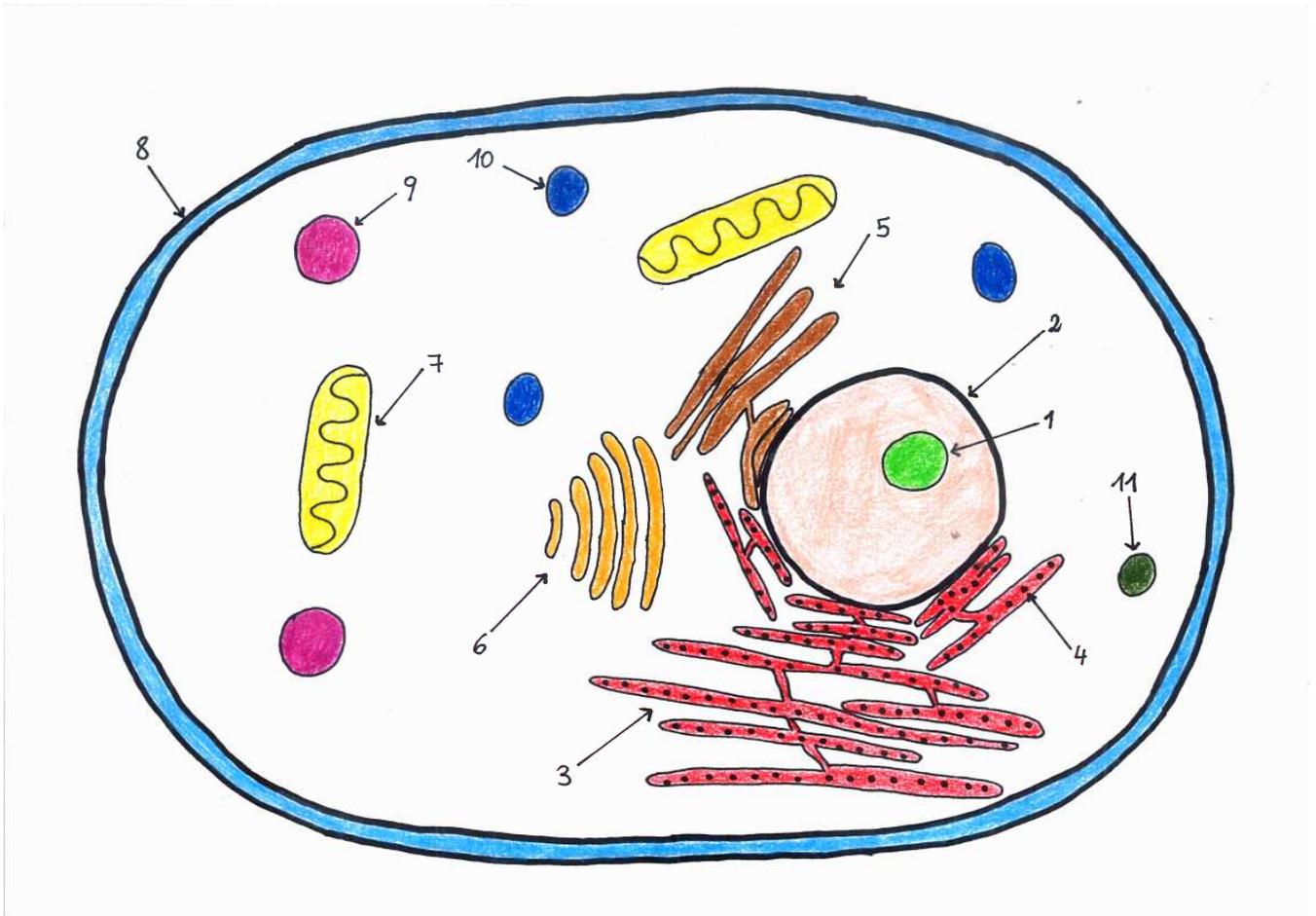


Abbildung 1.1: Veranschaulichung einer gewöhnlichen, eukaryotischen Zelle mit den darin vorkommenden Organellen: 1. Nucleolus, 2. Zellkern (Nukleus), 3. raues Endoplasmatisches Reticulum (ER), 4. Ribosomen, 5. glattes ER, 6. Golgi-Apparat, 7. Mitochondrien, 8. Plasmamembran, 9. Lysosom, 10. Peroxisom, 11. Vesikel

Eine fehlerhafte oder unvollständige Abfolge dieser Mechanismen ist Bestandteil vieler schwerer Krankheiten (z. B. Alzheimer[6], Parkinson[6], Krebs[7],...). Mögliche neue, klinische Behandlungsmethoden oder verbesserte, innovative, medikamentöse Behandlungen für diese Krankheiten setzen ein detaillierteres Wissen über die darin involvierten molekularen Mechanismen voraus.

In den folgenden Kapiteln werden die Auswirkungen milder Heat-Shocks auf die Plasmamembran von modifizierten Chinese Hamster Ovary (CHO) -Zellen beobachtet. Durch Hinzugabe diverser Additive kann das Zusammenspiel bestimmter Signalkaskaden (z. B. Sphingomyelin-Abbau, Aktin-Polymerisation, Endozytose) und milder Heat-Shocks untersucht werden. Mit Hilfe spezieller, mikroskopischer Anwendungen werden sowohl die Stabilität einzelner Nanoplatfformen auf der äußeren Zellmembran als auch intrazelluläre Kalzium (Ca^{2+})-Signale analysiert.

1 Plasmamembran

1.1 Aufbau

Bei der Plasmamembran handelt es sich um eine semipermeable Biomembran. Sie setzt sich aus einer Lipiddoppelschicht zusammen, die sich selbst unter einfachsten Bedingungen spontan erzeugen lässt. In diese Membran sind unterschiedliche Moleküle eingebettet, denen mehrere Funktionen zukommen. Ein Großteil der Membran wird über nicht-kovalente Bindungen stabilisiert.[8]

Die Zellmembran ist jedoch kein immobiles Gebilde, sondern ein dynamisches Konstrukt, in dem sich Moleküle relativ ungehindert bewegen können. Ungefähr die Hälfte der Masse der Membran besteht aus Lipiden. Die andere Hälfte setzt sich fast ausschließlich aus Proteinen zusammen.[9]

Bei einem Großteil der Membranproteine handelt es sich um Oligomere, die sich durch die gesamte Membran ziehen und auch aus dieser herausragen können.[10] Lipide sind amphipatisch. Das heißt, sie besitzen sowohl einen hydrophilen (polaren) Kopfteil als auch ein lipophiles (unpolares) Ende. Die häufigsten Lipide in der Zellmembran sind die Phospholipide.[8, 11] Phospholipide besitzen eine polare Kopfgruppe und zwei lipophile Kohlenwasserstoff (CH)-Ketten, die normalerweise Fettsäuren sind. Die Länge der Ketten kann dabei variieren. In einigen Fällen besitzt eine der CH-Ketten einen leichten Knick. Dies entsteht durch eine C-C Doppelbindung, meist in der cis-Konfiguration, und führt zu einer weniger dichten Anordnung der Lipide in der Membran. Man spricht bei diesen Fetten von *ungesättigten* Fetten. Je höher die Sättigung ist, desto dicker ist die Membran. Die Fläche pro Lipid wird dadurch aber reduziert.[8, 12, 13]

Zusätzlich sind die einzelnen Phasenzustände¹ der Plasmamembran von der Sättigung und Temperatur abhängig. In einer Membran mit einer Komponente können maximal zwei Phasenzustände bei einer bestimmten Temperatur existieren. Je höher die Ordnung des Phasenzustandes ist, desto dicker ist die Membran.[8, 13, 14, 15]

Eine wichtige Gruppe der Phospholipide sind die Phosphoglyceride, die auch

¹kristalline Phase, Gel-Phase, flüssige Phase

einen wesentlichen Bestandteil tierischer Zellen ausmachen. Dabei ist Glycerin² an zwei der drei Hydroxy (OH)–Gruppen mit den hydrophoben Fettsäuren verestert³. An der übrigen OH–Gruppe kann sich eine Phosphatgruppe befinden. Welche Gruppe zusätzlich noch an die Phosphatgruppe bindet, entscheidet über einige der Eigenschaften des Phospholipids. Zu den wichtigsten Phospholipiden gehören (siehe Abbildung 1.2):

- Phosphatidylethanolamine
- Phosphatidylserine
- Phosphatidylcholine
- Sphingomyelin

Bei Sphingomyelin (SM) dient nicht Glycerin als Bindeglied, sondern Sphingosin⁴. Sphingosin bindet mittels einer Amidbindung⁵ eine Fettsäure und an eine der OH–Gruppen eine Phosphatidylcholine (PC)–Gruppe. Dadurch bleibt eine OH–Gruppe frei, die nicht nur zu den polaren Eigenschaften des Lipids beiträgt, sondern auch eine Bindestelle für andere Lipide oder Moleküle bietet.[8, 12]

Cholesterol und Glycolipide sind ein weiterer wichtiger Bestandteil der Zellmembran, wobei vor allem Cholesterol in eukaryotischen Zellen häufig vorkommt. Es gehört zur Gruppe der Sterole⁶ und besitzt eine steife Ringstruktur, an die eine polare OH–Gruppe und eine hydrophobe CH–Kette anschließen. Dabei richtet Cholesterol seine OH–Gruppe nahe den polaren Gruppen der anderen Phospholipide aus und sorgt so dafür, dass diese dichter aneinandergepackt werden. Dadurch reduziert sich die Permeabilität und Fluidität der Membran.[8, 16]

²Glycerin ist der einfachste dreiwertige Alkohol.

³Die Veresterung ist eine chemische Reaktion, bei der ein Alkohol und eine Carbonsäure unter Abspaltung von Wasser einen stabilen Carbonsäureester bilden.

⁴Sphingosin ist ein Alkohol, der sich aus einer CH–Kette, einer Amino–Gruppe und zwei OH–Gruppen an einem Ende zusammensetzt.

⁵Bei einer Amidbindung handelt es sich um eine chemische Reaktion, bei der eine Amino–Gruppe und eine OH–Gruppe unter Abspaltung von Wasser eine Bindung eingehen.

⁶Sterole gehören zu einer Untergruppe der Steroide und bilden die Vorstufe zu einigen Vitaminen und Steroidhormonen.

1 Einleitung

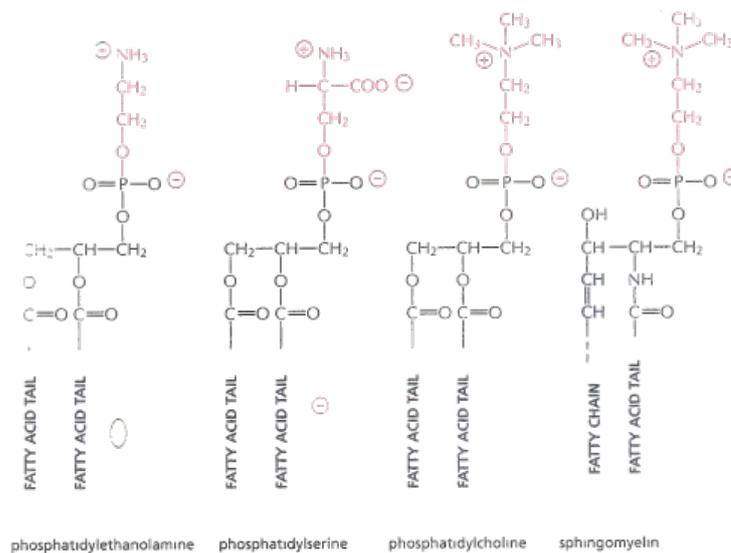


Abbildung 1.2: Gezeigt werden die vier wichtigsten Phospholipide im Überblick. Die unterschiedlichen Farben der Kopfgruppen symbolisieren verschiedene, chemische Zusammensetzungen und daraus resultierend verschiedene Eigenschaften.[8]

Glycolipide sind auf der extrazellulären Lipiddoppelschicht zu finden. Um die Wechselwirkung dieser Lipide zu erklären, gibt es unterschiedliche Modellansätze. Eine Theorie besagt, dass sich Glycolipide durch Wechselwirkung bevorzugt in sogenannten *Lipid-Rafts* zusammengruppierten. [8] Diese *Lipid-Rafts* sind reich an Cholesterol und Sphingomyelin. Durch die langen CH-Ketten der Sphingolipide weisen diese Rafts eine höhere Dicke als die restliche Membran auf.[8, 12, 17, 18] Spezielle Proteine

(z. B. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine) sammeln sich vermehrt in diesen Rafts und können diesen damit nicht nur eine spezifische Funktion verleihen, sondern zusätzlich stabilisieren.[8, 18]

Mit Hilfe von Cholesterol kann es zu einer Phasenseparation auf der Plasmamembran in eine *“liquid-ordered“* und eine *“liquid-disordered“* Phase kommen. Dieses Phänomen konnte bei synthetischen Membranen beobachtet werden. Will man bei lebenden Zellen einen identischen Effekt beobachten, findet man sich vor einem schwierig zu lösenden Problem wieder. Durch die chemische Heterogenität der Zellmembran können bis zu 100.000 verschiedene Lipidvari-

anten dort vorkommen. Zusätzlich kann es zu einer Interaktion dieser Lipide mit Membranproteinen oder auch kortikalem Aktin kommen. Beobachtungen bei synthetischen Modellen können also nur mit Einschränkungen auf lebende Zellen angewendet werden. [19]

Im Rahmen des *Keystone Symposiums* einigten sich Biophysiker, Biochemiker und Zellbiologen letztendlich auf eine Definition⁷ für Lipid–Rafts. [20] Die Existenz dieser Lipid–Rafts konnte noch nicht direkt bewiesen werden und so wird nach alternativen Erklärungen für Phänomene gesucht, die ohne Weiteres bis jetzt den Lipid–Rafts zugeschrieben wurden. [21]

Direkt unter der Plasmamembran liegt das Zytoskelett, das nur wenige Nanometer dick ist. Der Begriff „Skelett“ ist jedoch nicht ganz passend, da es sich um ein äußerst dynamisches Konstrukt handelt. Durch die Interaktion mit Membranproteinen spielt es eine tragende Rolle für die Form und Elastizität der Membran, kann aber auch eine Auswirkung auf die Anordnung und Funktion dieser Proteine haben. Dabei kann die Interaktion entweder direkt oder indirekt über Lipide mit langen, gesättigten Acyl–Ketten stattfinden. Mit Hilfe von Motorproteinen, wie z. B. Myosin, kann es nicht nur die Membran stabilisieren, sondern auch am Transport von Vesikeln beteiligt sein. [22, 23, 24]

Das Zytoskelett besteht zu einem großen Teil aus dünnen, flexiblen Fäden, die sich aus Spektrin zusammensetzen. Spektrin unterteilt sich in α –Spektrin und β –Spektrin. β –Spektrin verknüpft kurzes filamentöses Aktin (F–Aktin)⁸, um ein verzweigtes Netzwerk über die gesamte Membranoberfläche zu erzeugen. Dabei halten sich F–Aktin und die monomere Form, globuläres Aktin (G–Aktin), die Waage. Verschiedene Proteine (z. B. Ankyrin, α –Catenin, Adducin) verbinden das Aktin–Spektrin Netzwerk mit Transmembranproteinen.

⁷“Membrane rafts are small (10–200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes. Small rafts can sometimes be stabilized to form larger platforms through protein–protein and protein–lipid interactions.”

⁸F–Aktin ist ein doppel–helixförmiges Polymer, das sich aus globulärem Aktin (G–Aktin) zusammensetzt. Die Polymerisation geschieht am N–Terminus des Proteins. Die Depolymerisation am C–Terminus. Durch spezielle Proteine (Arp2/3, Capping Protein) können diese Prozesse unterbrochen werden. [25]

1 Einleitung

Langes F-Aktin am äußeren Aktinring interagiert mit den angrenzenden Mikrotubuli⁹. Zusätzlich durchziehen Aktinfasern („*Stress-Fibers*“), bestehend aus kurzem F-Aktin, die Zelle und können mit Hilfe von Myosin den Spannungszustand der Zelle verändern.[26, 27, 28]

1.2 Dynamik

Wie vorhin erwähnt, handelt es sich bei der Plasmamembran um ein dynamisches Gebilde, deren Fluidität eine wichtige Rolle für einige Funktionen der Membran einnimmt. Die Bewegungsmöglichkeiten der einzelnen Lipide sind die folgenden:[8]

- laterale Bewegung
- Rotationsbewegung
- „Flip-Flop“

Die Fick'schen Gesetze liefern eine brauchbare Lösung zur Beschreibung der Diffusion. Durch das erste Fick'sche Gesetz wird ein Zusammenhang zwischen der Teilchenstromdichte J und dem Konzentrationsgradienten ∇c inklusive der Diffusionskonstante D hergestellt.

$$J = -D\nabla c \quad (1.1)$$

Für den eindimensionalen Fall ($\nabla = \frac{\partial}{\partial x}$) erkennt man, dass der Teilchenstrom proportional zum Konzentrationsgradienten entgegen der Diffusionsrichtung ist. Mit Hilfe der Kontinuitätsgleichung ergibt sich für die Diffusionsgleichung folgende Definition.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right) = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1.2)$$

Daraus ergibt sich die folgende Wahrscheinlichkeit p ein Teilchen an einem Ort x zu einem Zeitpunkt t zu finden.[29]

⁹Die Mikrotubuli sind dünne Hohlzylinder, die für die Stabilisierung von Organellen verantwortlich sind und durch Motorproteine (Dynein, Kinesin) in Transportprozesse involviert sind.

$$p(x, t)dx = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} dx \quad (1.3)$$

Die Diffusionskonstante lässt sich mit Hilfe des Saffman–Delbrück Modells berechnen.[30] Ausgehend von der Stokes–Einstein Beziehung¹⁰ konnten die beiden Wissenschaftler eine Gleichung für einen zylindrischen Körper mit Radius r in einem zweidimensionalen Fluid mit den Viskositäten η_m (Membran) und η_f (Fluid) aufstellen. Die Dicke h der Membran und eine Konstante γ fließen dabei auch noch ein.

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\eta_m h} \left(\ln \frac{\eta_m h}{\eta_f r} - \gamma \right) \quad (1.4)$$

Daraus erkennt man, dass für die laterale Bewegung $D \propto \ln(\frac{1}{r})$. Unter normalen Bedingungen beläuft sich die laterale Diffusion in der Plasmamembran bei Lipiden auf $D \sim 1\mu m^2/s$ [31], bei sehr langsamen Membranproteinen sogar nur noch auf $D \sim 10^{-4}\mu m^2/s$. [32]

Für die Rotation der einzelnen Moleküle ergibt sich $D \propto \frac{1}{r^2}$. Die Rotationsrate von Lipiden ist um einiges höher ($10^6 - 10^7 s^{-1}$) im Vergleich zu den Membranproteinen ($10^0 - 10^4 s^{-1}$). [33]

Das Wechseln der Moleküle von einer Seite der Membran zur anderen (Flip–Flop) geschieht weitaus langsamer. Dadurch hätten es neu synthetisierte Moleküle schwer die äußere Seite der Membran zu erreichen. Mit Hilfe von Phospholipid–Translokatoren wird dieser Prozess erheblich beschleunigt. [8, 33]

Die Zusammensetzung der beiden Membranschichten weist eine Asymmetrie auf. Findet man an der extrazellulären Schicht einen Überschuss an Phosphatidylcholine und Sphingomyelin, setzt sich die dem Zytoplasma zugewandte Schicht vermehrt aus Phosphatidylserine, Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylinositol zusammen. Durch die unterschiedlichen Kopfgruppen entsteht ein Ladungsunterschied, der für die Signaltransduktion signifikant ist. [8, 34]

¹⁰Für ein sphärisches Objekt in einer dreidimensionalen Flüssigkeit beträgt die Diffusionskonstante $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$, wobei k_B für die Boltzmann–Konstante, T für die Temperatur, η für die Viskosität des Mediums und r für den Radius des Objektes steht.

1 Einleitung

1.3 Funktion

Die Aufgaben der Zellmembran sind sehr vielfältig. Durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften bietet sie einen sehr effektiven Schutz sowohl gegen elektrisch geladene, polare als auch große Moleküle. Für die Zelle sind aber Moleküle, wie z. B. Glukose, essentiell für den Energiehaushalt. Mit Hilfe spezieller Transmembranproteine ist es möglich, große Moleküle durch die Plasmamembran zu schleusen.

In einem multizellulären Organismus ist darüber hinaus die Zellkommunikation ein wesentlicher Bestandteil. Rezeptoren, die in der Membran verankert sind, bieten Bindestellen für extrazelluläre Botenstoffe. Dieser Mechanismus ist vor allem in Nervenzellen essentiell.

1.3.1 Membrantransport

Betrachtet man eine gewöhnliche Lipiddoppelschicht, stellt man fest, dass nach einer gewissen Zeit jedes Molekül entlang eines Konzentrationsgradienten in die Zelle diffundieren kann. Entscheidend dabei ist neben der Größe des Moleküls auch die Ladung und Polarität. Besonders schwer haben es dabei Ionen (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , Mg^{2+}). Um es diesen Molekülen zu ermöglichen, in das Zytoplasma zu diffundieren, gibt es zwei Arten von Membrantransportmolekülen.

- Transporter
- Kanäle

Dabei handelt es sich in vielen Fällen um einen passiven Transport, bei dem die Moleküle entlang des elektrochemischen Gradienten der Zelle transportiert werden. Mit Hilfe von Adenosintriphosphat (ATP) oder einem gekoppelten Transport¹¹ können Moleküle aktiv entgegen des elektrochemischen Gradienten transportiert werden. Um den pH-Wert des Zytoplasmas aufrecht zu erhalten, ist ein aktiver Transport nötig.

¹¹Durch den Transport eines Moleküls entlang eines elektrochemischen Gradienten wird der Transport eines anderen Moleküls entgegen des Gradienten ermöglicht. Dabei kann es sich um einen gleichgerichteten oder entgegengesetzten Transport handeln.

Bei beiden Varianten tritt jedoch eine Sättigung der Transportrate ein. Diese hängt mit den möglichen Bindestellen für die einzelnen Moleküle zusammen.[8, 35] Transporter binden dabei ein bestimmtes Molekül an sich und transferieren es nach einer Reihe von Konformationsänderungen in das Zellinnere.[8] Bei Kanälen ist die Interaktion mit dem Molekül geringer. Die Poren durchziehen die komplette Membran und öffnen sich, um ein bestimmtes Molekül durchzulassen. Dabei ist der Transport immer passiver Natur.

Ionenkanäle spielen hierbei eine tragende Rolle in der Erhaltung des Ruhepotentials der Zelle. Vorteil der Ionenkanäle ist, dass sie eine weitaus höhere Transportrate aufweisen, verglichen mit den Transportern. Sie zeigen jedoch eine hohe Selektivität für bestimmte Ionen. Dies setzt eine sehr spezifische Struktur der einzelnen Kanäle voraus, um nur Ionen bestimmter Ladung und Größe durchzulassen. Die Diffusionsrate läuft aufgrund des Selektionsfilters¹² einer Sättigung entgegen.[8, 36, 37, 38]

Für die Erhaltung des Ruhepotentials der Zelle sind vor allem die K^+ -Kanäle notwendig. Durch Reduktion der Na^+ -Konzentration in der Zelle gelangt über die Na^+-K^+ -Pumpe K^+ in das Zytosol. Über die K^+ -Kanäle kann das elektrische Potential wieder reduziert werden.

Die Ionenkanäle wechseln im regelmäßigen Abstand von einer offenen in eine geschlossene Konformation. Mit Hilfe bestimmter Stimuli (elektrische oder mechanische Spannung, Bindung eines Liganden) kommt es zur Konformationsänderung des Kanals.[8, 36, 38] Speziell in Muskelzellen sowie im Nervensystem spielen die Ionenkanäle eine wichtige Rolle.[8, 38]

1.3.2 Zellkommunikation

Um die Existenz eines komplexen, multizellulären Organismus zu gewährleisten, ist das Zusammenspiel der einzelnen Zellen grundlegend. Mit Hilfe von Kommunikationsmechanismen wird dieses Zusammenspiel koordiniert. Dabei muss die Zelle nicht nur die Fähigkeit besitzen, extrazelluläre Signale zu erkennen und verwerten zu können, sondern selbst fähig sein, Signale zu generieren und

¹²Der Selektionsfilter ist eine strukturelle Engstelle, wodurch Moleküle nicht nur nach chemischen Eigenschaften, sondern auch nach Größe und Form selektiert werden.

1 Einleitung

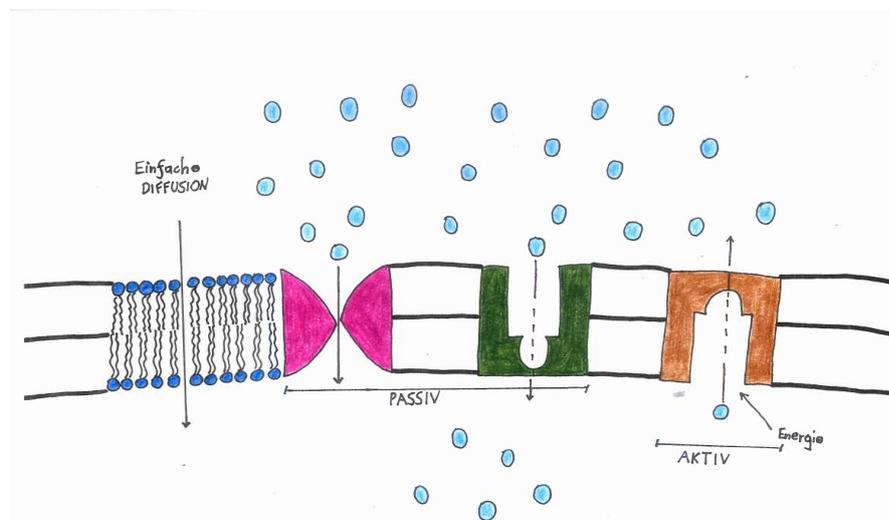


Abbildung 1.3: Zu sehen ist eine Plasmamembran, die auf der extrazellulären Seite eine höhere Konzentration an Molekülen aufweist. Die Moleküle können das Zytosol entweder über die klassische Diffusion, über Ionenkanäle (rosa), über passive Transporter (grün) oder über aktive Transporter (braun) erreichen.

zu emittieren. Vier Formen existieren, um ein interzelluläres Signal zu senden.

- Zell-Zell Kontakt
- Paracrine Sekretion
- Synaptische Sekretion
- Endokrine Sekretion

Die nötigen Rezeptoren dafür sind meistens an der äußeren Seite der Plasmamembran lokalisiert, können aber auch an der inneren Seite gefunden werden. Bereits geringe Konzentrationen an Signalmolekülen im extrazellulären Raum sind ausreichend, um eine Zellreaktion hervorzurufen, da die Rezeptoren diese mit einer hohen Affinität binden. Dadurch wird der Rezeptor aktiviert und eine intrazelluläre Signalkaskade wird ausgelöst. Nicht jeder Zelltyp verfügt aber über identische Rezeptoren. So kann nur bei bestimmten Zellen eine Reaktion

bezweckt werden. Zusätzlich hängt die Reaktion der Zellen von der intrazellulären Übersetzung ab. Bei identischen Rezeptoren an der Plasmamembran kann dennoch eine andere Reaktion hervorgerufen werden.

Ionenkanal-gekoppelte, Guanosintriphosphat (GTP)-gekoppelte und enzymatisch gekoppelte Rezeptoren gehören zu den drei größten Rezeptorklassen an der Zelloberfläche.

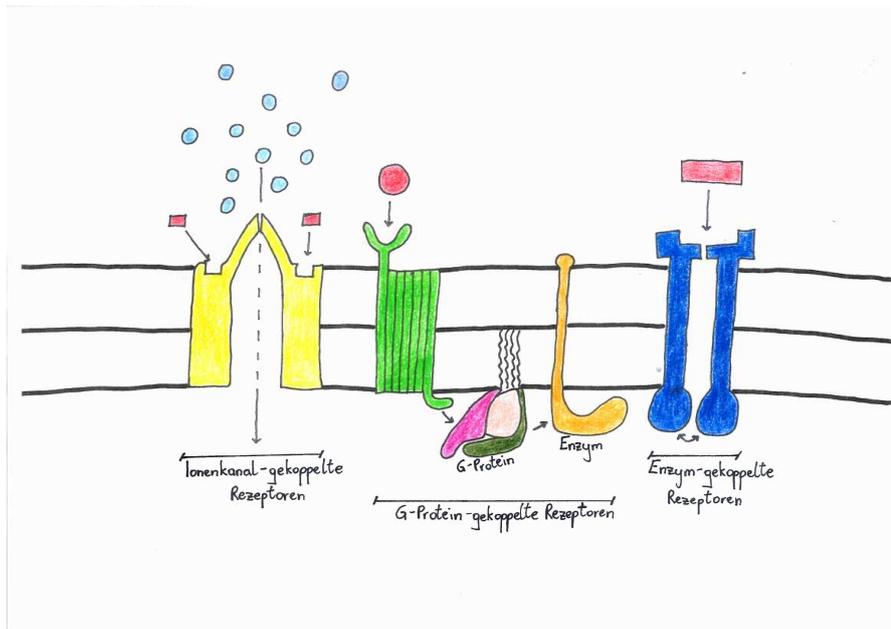


Abbildung 1.4: Die drei wichtigsten Rezeptorklassen sind veranschaulicht. Die roten Moleküle symbolisieren die zu den einzelnen Rezeptoren passenden Signalmoleküle. Bindet das Molekül an den Rezeptor, wird dieser aktiviert und weitere Kaskaden können dadurch ausgelöst werden.

Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren sind vor allem für die Übertragung von Nervenimpulsen wichtig. Durch die Freisetzung von Neurotransmittern (z. B. Acetylcholin) kommt es zu einer Depolarisierung der Membran und die Ionenkanäle öffnen sich. Mit Hilfe von hemmenden Transmittern (z. B. Glutamate) kann das Ruhepotential wieder hergestellt werden. Diese Rezeptoren ermöglichen eine äußerst schnelle Signaltransmission.[8, 36, 39]

Beim GTP-gekoppelten Rezeptor handelt es sich um eine indirekte Form der Signaltransmission. Ein Rezeptor wird mittels eines Moleküls aktiviert. Dadurch wird das Guanosin-gebundene Protein aktiviert, indem Guanosindiphosphat

1 Einleitung

(GDP) gegen GTP ausgetauscht wird. Durch die Interaktion mit Ionenkanälen und Enzymen kann deren Aktivität reguliert werden.

Bei enzymatisch gekoppelten Rezeptoren kann mittels eines Signalmoleküls entweder direkt eine enzymatische Funktion beim Rezeptor ausgelöst werden oder ein angrenzendes Enzym indirekt aktiviert werden.[8, 39]

1.4 Nanoplattformen

Die einzelnen Moleküle der Plasmamembran sind nicht komplett homogen angeordnet. Eine mögliche Erklärung der Wechselwirkung der einzelnen Moleküle bietet das Modellbild der *Lipid-Rafts*. Diese sind bevorzugt auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran. Sie können auch intrazellulär auftreten, aber erst nach der Sphingolipid-Synthese im Golgi. Besonders in der Signaltransduktion spielen sie eine wichtige Rolle.[40]

Wie bereits beim Aufbau der Plasmamembran erwähnt (siehe Kapitel 1.1), ist das Modellsystem der *Lipid-Rafts* umstritten, da es bis jetzt nur indirekte Indizien für dessen Existenz gibt. Während in synthetischen Modellen Rafts im Mikrometerbereich nachgewiesen werden konnten [19], war dies bei lebenden Zellen bis jetzt noch nicht der Fall. [41]

Mit Hilfe von Detergenzien wurden bei Plasmamembranen unlösliche Komponenten (Sphingolipide, Cholesterol und GPI-verankerte Proteine) festgestellt. [42, 43] Beobachtungen an Modellmembranen ließen vermuten, dass diese unlöslichen Komponenten auch Rafts auf der Plasmamembran von lebenden Zellen formen, die Membranproteine in funktionelle Domänen teilen.[44]

In einem Versuch wurde untersucht, ob durch Immobilisierung von monomeren, grün fluoreszierenden Proteinen, die mit Hilfe eines GPI-Ankers an der äußeren Seite der Plasmamembran verankert sind, eine Formation von größeren, geordneten Phasen innerhalb dieser Bereiche induziert werden kann. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. [41]

Mit Hilfe spezieller Techniken der Fluoreszenzmikroskopie könnten jedoch auf Membranoberflächen Nanostrukturen beobachtet werden, die relativ dicht und homogen über die gesamte Oberfläche verteilt sind.[40, 45, 46] Bei GFP-GPI-Molekülen ist eine Homoassoziation zu beobachten. Die Stabilität dieser

Molekülecluster ist nicht komplett geklärt.[45] Da nur Teile der Raft-Kriterien erfüllt sind (siehe Definition *Lipid-Rafts* S. 7), sprechen wir in weiterer Folge von *Nanoplattformen*.

Mit Hilfe neuer Techniken, wie zum Beispiel TOCCSL (siehe S.48), ist es möglich, einzelne Nanoplattformen in lebenden Zellen zu detektieren. Dabei können Komplexe, die mit GPI-Ankern in der Plasmamembran verankert sind, beobachtet werden. Einige dieser Komplexe spielen dabei eine Rolle für Signalkaskaden der Zelle. Kommt es zur Auflösung dieser Strukturen, kann es zu einer Initiierung oder einem Abbruch der Signalkaskade kommen. [47]

Verknüpfte GPI-Proteine können Kinasen rekrutieren und in weiterer Folge ein intrazelluläres Signal generieren. [48, 49] Bei T-Zellen kommt es zum Beispiel zu einer Aktivierung durch die Verknüpfung von GPI-Proteinen mittels Antikörpern. [50] In weiteren Studien wurden Zusammenlagerungen von GPI-Proteinen gefunden, die eine modifizierte Erklärung zur *Lipid-Raft* Hypothese lieferten. [22, 23, 24]

Der Sättigungsgrad der einzelnen Acyl-Ketten ist wesentlich für die Formation der Domänen. Sphingomyelin, mit seinen stark gesättigten Acyl-Ketten, ordnet sich bevorzugt in diesen Domänen an und bindet mittels Wasserstoffbindungen. Cholesterol verstärkt die dichte Anordnung zusätzlich.[40, 45]

Die Zellmembran teilt sich in eine geordnete (*Nanoplattformen*) und ungeordnete (Phospholipid-Matrix) Phase auf. Bei beiden Phasen handelt es sich um mobile Konstrukte. [17, 45] Innerhalb der geordneten Phase sind bevorzugt Proteine zu finden, die entweder mittels GPI-Anker verbunden sind, eine Palmitoyl-Gruppe oder zwei Acyl-Ketten aufweisen. Diese Proteine sorgen für eine spezifische Funktion der Domäne und sind unregelmäßig über die gesamte Membranoberfläche verteilt.[40, 45, 41, 51]

Es wird angenommen, dass die Rolle der angrenzenden Lipide dieser Proteine nicht nur darin liegt, die Proteine zu binden und in der Domäne zu fixieren, sondern auch in der Regulierung der Funktion der Proteine. Eine unterschiedliche Zusammensetzung der Lipide führt demnach zu einer unterschiedlichen Anordnung von Proteinen in den Nanoplattformen.[52]

Der Unterschied zwischen der Expression von Proteinen an der inneren und äußeren Plasmamembran beruht mitunter darauf, dass an den beiden Seiten

1 Einleitung

Unterschiede in der Komposition der Lipide existieren. Trotz des Mangels an Sphingomyelin auf der intrazellulären Seite existieren dort Nanoplattformen. Eine mögliche Erklärung dafür kann die Interaktion der beiden Membranschichten oder aber auch die Verbindung beider Lipidschichten durch Transmembranproteine sein.[53, 54]

Die Stabilität der Nanoplattformen ist relativ hoch. Durch Hinzugabe von oxidierten Phospholipiden oder Cholesteroxidase (COase) kommt es aber zu einer Destabilisierung der Nanoplattformen, was in weiterer Folge zum Verlust der Funktionen der Domänen führen kann. Dieser Effekt ist unabhängig von einem HS. Im Fall von oxidierten Phospholipiden kann dieser Prozess durch Blockierung der sauren Sphingomyelinase (aSMase)-Aktivität unterbunden werden. [47]

2 Zelluläre Stress–Antwort (ZSA)

2.1 Grundlagen

Die zelluläre Stress–Antwort (ZSA) ist eine notwendige Reaktion der Zelle auf unterschiedliche Stresssituationen. Je vielfältiger die Möglichkeiten der ZSA ausfallen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, unliebsamen Umwelteinflüssen zu widerstehen.

Die Ursache der Stresssituation kann sehr mannigfaltig sein. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, kann die Zelle durch thermische und mechanische Einflüsse in Alarmbereitschaft versetzt werden, aber auch durch Toxine, Bakterien oder Viren. Dabei werden nicht nur Proteine und Lipide geschädigt, sondern es können auch Desoxyribonukleinsäure (DNS)–Sequenzen irreparabel beschädigt werden.[55] Erkennt die Zelle die Gefahr nicht rechtzeitig genug bzw. fällt die ZSA zu schwach aus, kann dies in weiterer Folge zu schweren Erkrankungen führen.[6, 7] Es kann aber auch sein, dass mittels thermischer und mechanischer Reize Signale übermittelt werden, auf die die Zelle reagieren kann. Dabei muss nicht zwingend ein Überlebensmechanismus ausgelöst werden.

Betrachtet man einen größeren Organismus, liefert die ZSA zwei Möglichkeiten, um das Überleben des gesamten Organismus zu gewährleisten. Entweder versucht man die geschädigte Zelle zu retten oder bei zu starker Beschädigung die Zelle abzutöten¹³. Für welche Option sich der Organismus entscheidet, hängt von der Qualität des Stresses und der Art der Zelle ab. Die einzelnen Stufen der ZSA unterteilen sich folgendermaßen:

1. Reparatur
2. Temporäre Adaption
3. Autophagozytose
4. Zelltod

Das Absterben von Zellen muss aber nicht zwingend etwas Negatives bedeuten. Unser Organismus unterläuft eine ständige Erneuerung von Zellen. Dabei

¹³Apoptose, Nekrose, Pyroptose, Autophagozytose

1 Einleitung

hält sich das Zellsterben und die Generation von neuen Zellen ungefähr die Waage, auch wenn die Anzahl der Zellen mit dem Alter kontinuierlich abnimmt. Hauptaufgabe der ZSA ist es, die Homöostase aufrecht zu erhalten.[56, 57] Erkennt die Zelle das Problem rechtzeitig, gibt es in Abhängigkeit von der Bedrohung verschiedene Lösungen. In Tabelle 1.1 wird dies veranschaulicht.

Tabelle 1.1: grundlegende ZSA-Reaktionsmechanismen[58]

Bedrohung	Transkriptionsfaktor (TF)	Sensor	Hauptüberträger
oxidativer Stress	Nrf2	Keap1	MAPK, ERK, p38, PKC
Hitzeschock	HSF-1	HSP90	CaMK2, CK2
DNS Beschädigung	p53	MDM2	ATM, JNK, Chk1, Chk2
Hypoxie	HIF-1	VHL	p38, PI3K
Entzündungen	NF- κ B	I κ B	IKK

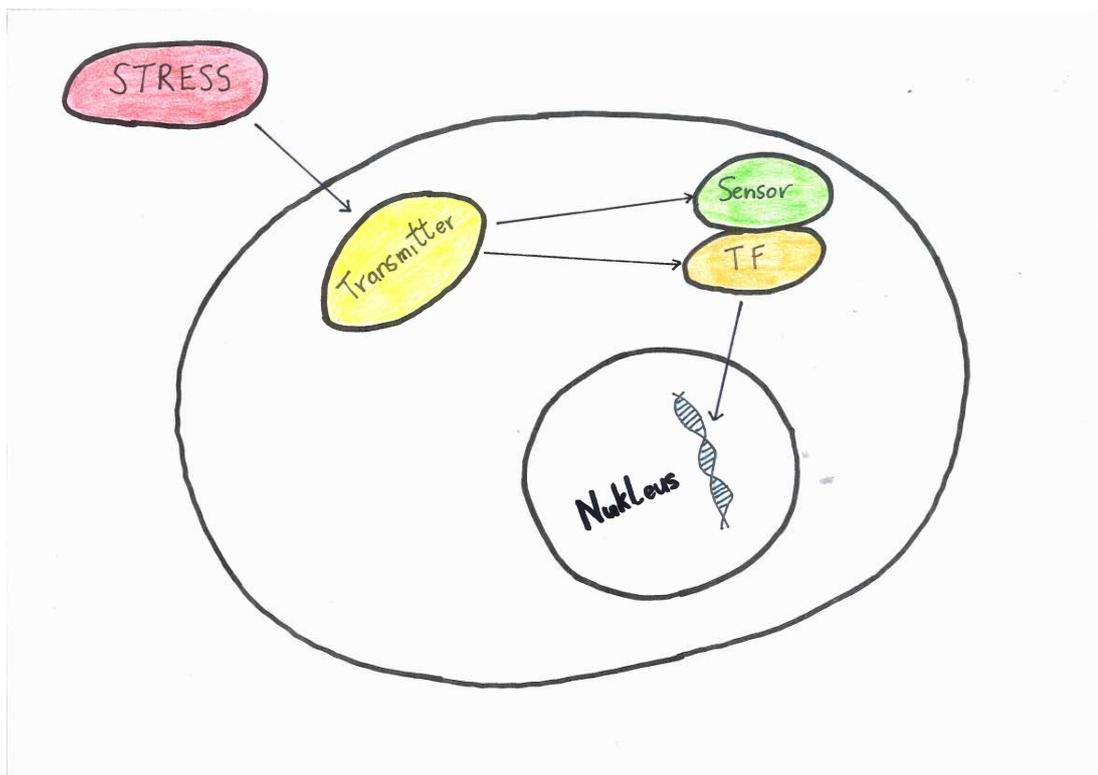


Abbildung 1.5: ZSA-Reaktionsmechanismus: Die Pfeile markieren grob die einzelnen Schritte, die notwendig sind, um eine passende ZSA zu erhalten. Nachdem der TF in den Nukleus eingedrungen ist, kann mit der Synthese von HSPs begonnen werden.

Vereinfacht können diese einzelnen Mechanismen in drei Teile geteilt werden (siehe Abbildung 1.5). Erfährt die Zelle extern oder intern einen Stress, wird dies registriert und mittels eines Enzyms an einen Sensor weitergegeben. Dabei kann das Enzym entweder indirekt den Transkriptionsfaktor (TF) über den Sensor aktivieren oder direkt. Der Sensor ist im Zytoplasma an einen inaktiven TF gebunden. Wird der TF aktiviert, löst er sich vom Sensor und dringt in den Nukleus ein, um dort bestimmte Gene zu aktivieren.

Mögliches Endprodukt dieser aktivierten Gene können Chaperone¹⁴ sein, zu denen auch die Heat–Shock–Proteine gehören. Mit Hilfe der Chaperone können denaturierte Proteine unschädlich gemacht werden.[56, 58]

2.2 Heat–Shock–Response (HSR)

Steigt die Temperatur in einem Organismus über einen bestimmten Grenzwert, wobei dieser sehr stark unter den verschiedenen Organismen variieren kann, kommt es zu einem Heat–Shock. [59] Die genaue Zusammensetzung an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren der Plasmamembran der jeweiligen Zelle ist entscheidend dafür, ab welcher Temperatur ein Heat–Shock–Response ausgelöst wird. [60]

Im alltäglichen Sprachgebrauch verwenden wir den Begriff „Fieber“. Dies ist ein Mechanismus, der sich über die Jahrhunderte hinweg bewährt hat. Dabei handelt es sich um eine milde Erhöhung der ursprünglichen Körpertemperatur über einen längeren Zeitraum hinweg. Die Ursachen für den Temperaturanstieg können recht unterschiedlich sein und sowohl physischer als auch chemischer Natur sein.[61, 59]

Um bei Säugetieren einen Heat–Shock auszulösen, zeigte sich, dass eine Temperaturerhöhung von $\geq 4^{\circ}\text{C}$ über der durchschnittlichen Körpertemperatur notwendig ist. [59] Beim HS gibt es die Heat–Shock–Transkriptionsfaktoren (HSFs), wobei speziell der Heat–Shock–Transkriptionsfaktor-1 (HSF-1) eine äußerst wichtige Rolle für den HSR einnimmt. Durch Wechselwirkung mit HSP 90 kann HSF-1 als Monomer im inaktiven Zustand an genau dieses gebunden werden.[62, 63] Erhöht sich die Temperatur in der Zelle, denaturieren Proteine. Diese Proteine

¹⁴Chaperone sind Proteine, die anderen Proteinen helfen sich korrekt zu falten.

1 Einleitung

werden von den bereits existierenden HSPs erkannt und gebunden. Da die fehlerhaften Proteine gemeinsam mit HSF-1 um die Bindestelle an HSP 90 kämpfen, wird vermehrt HSF-1 ins Zytosol freigegeben. Dort binden sich mehrere HSF-1 Monomere aneinander und bilden einen Homotrimer.[57]

Parallel zu diesem Prozess wird HSF-1 mittels Phosphorylierung durch die beiden Proteinkinasen, Calmodulin Proteinkinase 2 (CaMK2) und Casein Kinase 2 (CK2), aktiviert. Dieser Trimer kann nun in den Nukleus eindringen und dort an eine bestimmte Stelle der DNS binden. Die betroffenen Stellen der DNS sind für die Expression von weiteren HSPs verantwortlich.[58]

Durch die Expression von HSPs bekommt die Zelle eine gewisse Thermotoleranz und denaturierte Proteine werden isoliert oder bei der Erlangung ihrer Sekundärstruktur unterstützt. Durch das Binden von Heat-Shock-bindendes Protein-1 (HSBP-1) wird HSF-1 inaktiviert und die vermehrte Produktion von HSPs eingestellt.[58, 64, 65]

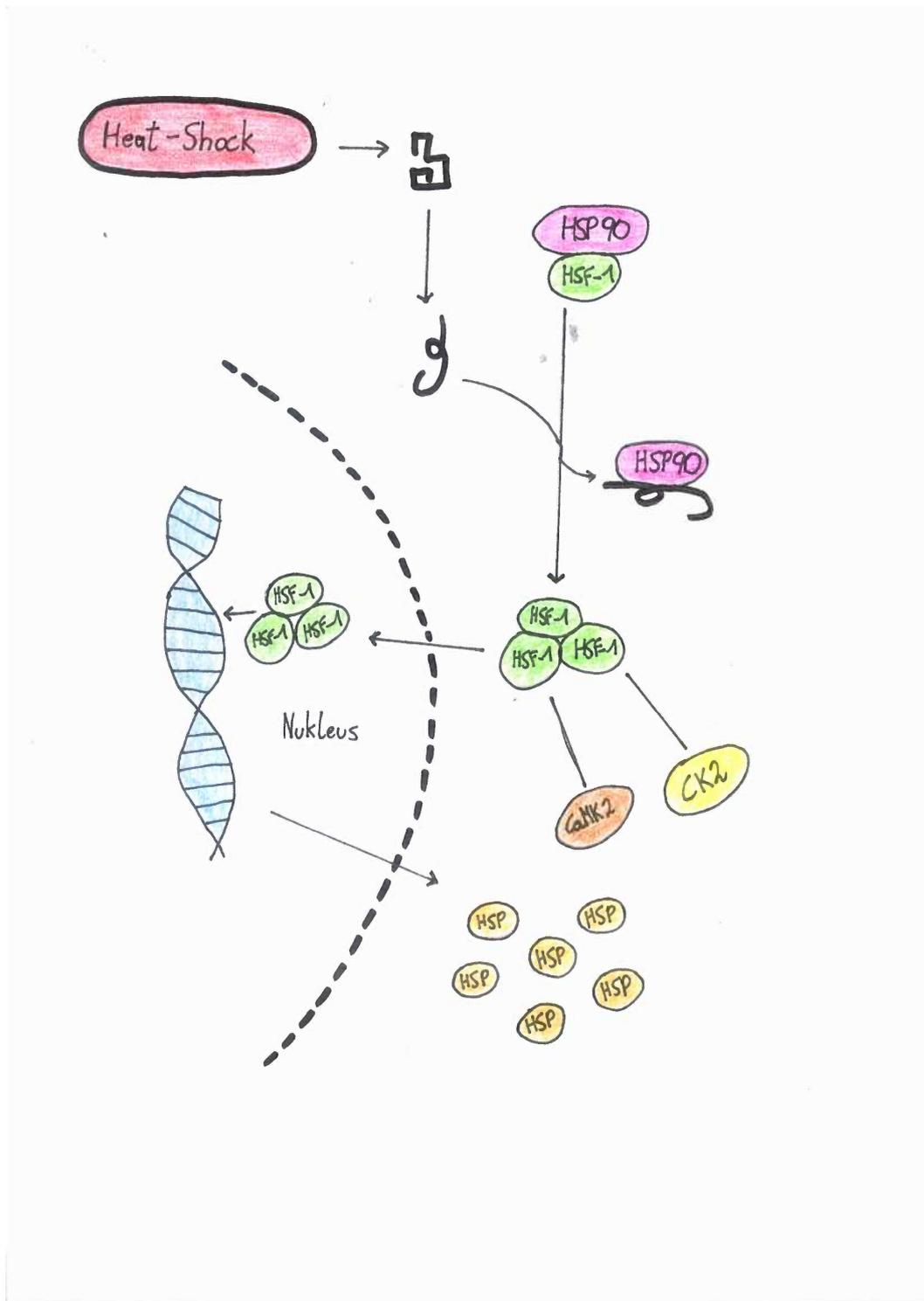


Abbildung 1.6: Ein HS kann bei höheren Temperaturen zur Denaturierung von Proteinen führen. Durch Verlust der Sekundärstruktur werden diese Proteine von HSPs erkannt, was in weiterer Folge durch Oligomerisation des HSF-1 zur erhöhten Produktion von weiteren HSPs führt.

1 Einleitung

2.3 Heat–Shock–Protein (HSP)

2.3.1 Geschichte

Die Heat–Shock–Proteine wurden das erste Mal in den frühen 1960er Jahren erwähnt und feierten vor wenigen Jahren ihr 50–jähriges Jubiläum. Die Entdeckung schien jedoch eine Aneinanderreihung glücklicher Zufälle gewesen zu sein, was in den Naturwissenschaften nicht zum ersten Mal zu einer bahnbrechenden Entdeckung geführt hätte.

Der italienische Genetiker *Ferruccio Ritossa* befasste sich damals am genetischen Institut in Pavia mit der Nukleinsäuresynthese in sogenannten Puffs¹⁵ der Speicheldrüse der Fruchtfliege, *Drosophila Melanogaster*.

Für gewöhnlich setzte man die Zellen Temperaturen von 25°C aus, doch dieses Mal wurden die Zellen einer weitaus höheren Temperatur, nämlich 37°C, ausgesetzt. Dachte man zuerst, die Zellen seien unbrauchbar, entschied man sich dennoch, einen Blick auf sie zu werfen.[66] *Ritossa* äußerte sich zu diesem Umstand folgendermaßen:

„I cannot remember whether it was John Pulitzer or Inge or Clara Ghini or Giordano who shifted the temperature of my incubator, but one day I noticed a different puffing pattern!”[66]

Unter dem Mikroskop stieß man auf den außergewöhnlichen Effekt, den man mit diesem leichten Heat–Shock provoziert hatte. *Ritossa* teilte dabei die einzelnen Abschnitte der Chromosomen in Zonen ein und untersuchte deren Genabschnitte. Unter bestimmten metabolischen Umständen entspiralisierten bestimmte Abschnitte, um Proteine zu synthetisieren.

Wie man in Abbildung 1.7 sehen kann, blähen Regionen der Chromosomen auf, die sogenannten Puffs. Diese Puffs zeigen eine äußerst hohe Spezifität bei ihrem zeitlichen und örtlichen Erscheinen. Die Ribonukleinsäure (RNS) ist das Hauptprodukt dieses Prozesses und wird für die weitere Synthese von Proteinen benötigt. Die genaue Untersuchung und Beschreibung dieser Genabschnitte

¹⁵Puffs sind Aufblähungen bzw. verdickte Stellen bei Chromosomen. Dieser Effekt tritt auf, wenn Gene für bestimmte Proteine abgelesen werden sollen und sich Teile der DNS entspiralisieren.

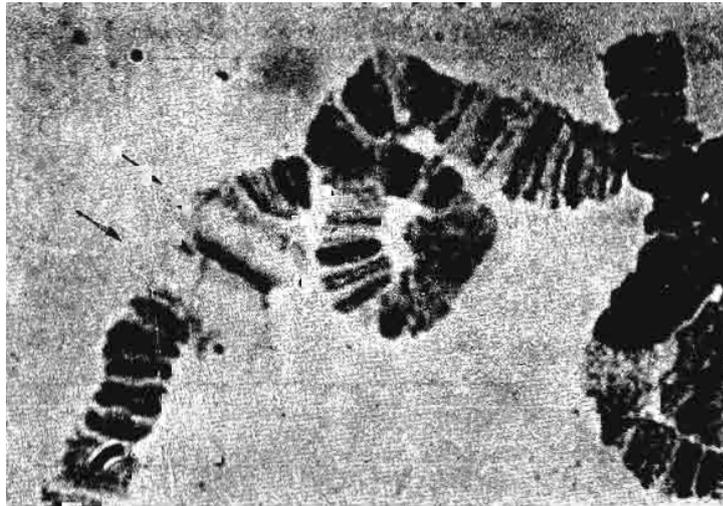


Abbildung 1.7: Die aufgeblähten Stellen (Puffs) der Chromosomen sind mit Pfeilen veranschaulicht. Die Zellen zeigten dieses Verhalten bereits nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 37°C. [67]

würden Rückschlüsse auf metabolische Bedürfnisse des Organismus geben. *Ritossa* war die Bedeutung seiner Entdeckung sofort klar. Um jedoch einen Zufall ausschließen zu können, wiederholte er die Versuche weitere Male und stieß immer wieder auf diesen bemerkenswerten Effekt.[67, 68, 69]

In weiterer Folge variierte man die Temperaturen und versuchte mit geringeren Temperaturen diesen Effekt zu provozieren. Dabei stieß man auf ähnliche Ergebnisse, jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt. Der Effekt beruht als weniger auf einem bestimmten Temperaturanstieg, sondern mehr darauf, dass man einen bestimmten Grenzwert überschreitet. Dieser Effekt ist nicht nur auf thermische Impulse eingeschränkt. Ähnliche Effekte konnten auch mit Hilfe anderer Stimuli provoziert werden. Durch Hinzugabe von Chemikalien¹⁶ konnte man an denselben Stellen Puffs beobachten wie bei den hitzegeschockten Proben. Was haben diese beiden Stimuli gemeinsam, dass sie zu einem identischen Ergebnis führen?[68, 69]

Man geht davon aus, dass sowohl die beiden Chemikalien DNP und Natriumsalicylat als auch ein HS einen wichtigen Prozess zur Gewinnung von ATP stark behindern bzw. unterbinden, nämlich die oxidative Phosphorylierung

¹⁶z. B. 2,4-Dinitrophenol (DNP), Natriumsalicylat

1 Einleitung

in den Mitochondrien.[69] Dieser Prozess ist ein Teil des Energiestoffwechsels und speichert Energie, die durch die Atmungskette bereitgestellt wird, in Form von ATP. Durch das Verwerten von Kohlenhydraten wird im Mitochondrium zwischen dem Intermembranraum¹⁷ und der Matrix¹⁸ ein pH-Gradient bzw. ein Protonengradient erzeugt. Dieser Protonengradient wird Stück für Stück abgebaut und Wärme wird freigesetzt. Als Gegenmaßnahme kann die Zelle den Stoffwechsel ankurbeln, um den minimierten Gradienten wieder aufzubauen.[8]

Fasziniert von diesen Ergebnissen hatte es *Ritossa* zu Beginn sehr schwer seine Ergebnisse zu publizieren, da ihm vorgeworfen wurde, es fehle seiner Studie an wissenschaftlicher Bedeutung. Letztendlich konnte er es im Jahre 1962 im Journal '*Experientia*' dennoch publizieren.[66]

In weiterer Folge konnte nicht nur bewiesen werden, dass sich noch weitere Initiatoren zu den vorhin erwähnten Stimuli hinzugesellten, sondern zusätzlich konnte der Effekt in einer Vielzahl von zellulären Organismen nachgewiesen werden.[4, 5, 64, 70]

Der Begriff „Hitzeschockprotein“ scheint demnach etwas veraltet. HSPs sind weitaus vielfältigere Proteine, die eine passende Lösung für unterschiedlichste intrazelluläre oder extrazelluläre Bedrohungen liefern und dadurch zu einer der beeindruckendsten Entdeckungen auf diesem Gebiet zählen.

2.3.2 Aufbau

Heat-Shock-Proteine (HSPs) sind in vielen Zellen allgegenwärtig, da sie nicht nur einen Abwehrmechanismus für die Zelle bereitstellen, sondern auch anderen Proteinen helfen eine gewünschte Struktur zu erlangen oder zu behalten bzw. beschädigte Proteine davor bewahren, schadhaft zu werden.[70, 71]

Meint man jedoch, alle HSPs seien identisch aufgebaut und erfüllen dieselben Aufgaben, täuscht man sich. HSPs lassen sich in mehrere Familien einteilen, die unterschiedliche Funktionen haben und darüber hinaus auch biochemische Unterschiede aufweisen. Innerhalb der einzelnen Familien existieren diverse Isoformen, unter denen sich jedoch Übereinstimmungen finden lassen.[72] Die

¹⁷Der Intermembranraum ist der Raum zwischen der äußeren und der inneren Membran des Mitochondriums.

¹⁸Die Matrix wird von der inneren Membran des Mitochondriums umschlossen.

HSPs lassen sich nach ihren Molekülmassen¹⁹ (in kDa) ordnen und können in mehrere Familien eingeteilt werden:

- HSP 90
- HSP 70
- HSP 60
- HSP 40
- kleine HSPs (15–30)

HSPs weisen Gemeinsamkeiten mit Chaperonen (engl. Anstandswauwau) auf, da sie Proteine unterstützen, die nicht selbständig korrekt falten, ihre Sekundärstruktur zu erlangen. Dies verbraucht große Mengen an Energie, die in Form von ATP zur Verfügung gestellt wird. Eine geeignete Nukleotid–Bindestelle an ihrem N–Terminus ermöglicht einigen HSPs das Binden von ATP. Zusätzlich besitzen sie eine Substrat–Bindestelle an ihrem C–Terminus. Um ihre Effektivität zu steigern, interagieren manche HSPs miteinander. HSPs kommen nicht nur im Zytoplasma vor, sondern können auch in Organellen²⁰ oder sogar an der Zellmembran nachgewiesen werden.[3, 73, 74]

2.3.2.1 HSP 90

HSP 90 ist ein hochspezialisiertes Molekül, das in Säugetieren zwei Isoformen besitzt. *HSP90 α* und *HSP90 β* werden von zwei unterschiedlichen Genen produziert und existieren beide als Homodimere. *HSP90 β* kann darüber hinaus auch als Monomer existieren. Durch Erhöhung der Temperatur ist eine Oligomerisation beider Isoformen möglich. Oligomere können aber auch unter normalen, physiologischen Bedingungen existieren.[75]

HSP 90 weist drei verschiedene Domänen auf. Am N–Terminus können neben ATP auch andere Peptide (z. B. HSP 90 Inhibitoren) binden. In Eukaryoten ist teilweise der N–Terminus und der mittlere Teil über eine kurze, geladene

¹⁹Bei der Molekülmasse handelt es sich um eine Maßeinheit der Masse. Sie beträgt 1/12 der Masse des Kohlenstoffisotopes ¹²C und wird in Dalton (Da) angegeben.

²⁰z. B. Endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien

1 Einleitung

Aminosäuresequenz (ASS) miteinander verbunden. Im mittleren Teil werden gewünschte Proteine oder Substrate gebunden. Darüber hinaus dient er als γ -Phosphat Akzeptor von ATP und beeinflusst so die ATPase Aktivität. Der N-Terminus und der mittlere Abschnitt sind durch eine geladene Sequenz miteinander verbunden. Der C-Terminus ist verantwortlich für die Dimerisierung des Moleküls.[76, 77, 78]

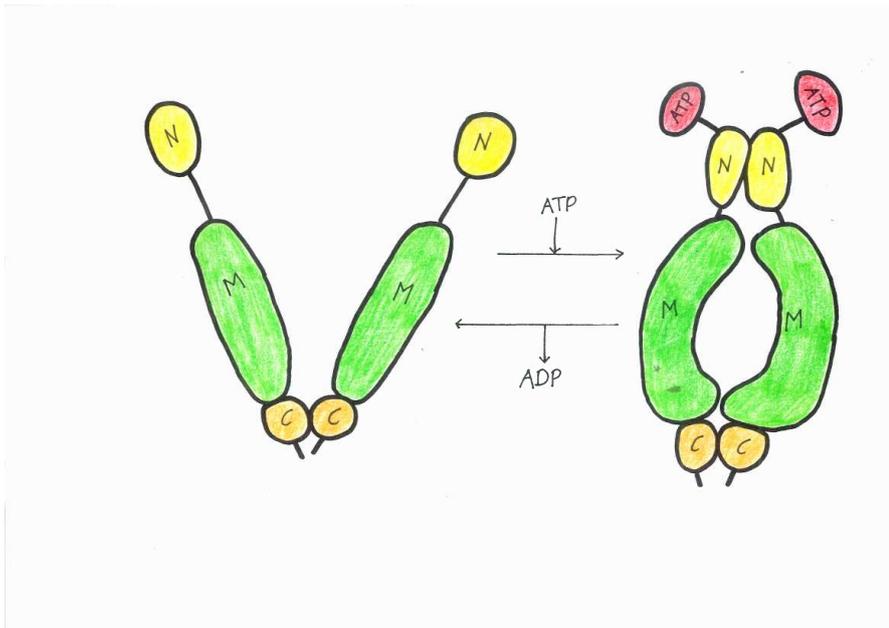


Abbildung 1.8: HSP90 nimmt im inaktiven Zustand eine V-förmige Konformation ein, die am C-Terminus (C) miteinander verbunden ist. Durch Hinzugabe von ATP nähern sich die beiden N-Termini (N) und die mittleren Domänen (M) einander an und können dadurch miteinander agieren.

Ist kein Nukleotid gebunden, bilden die beiden C-Termini zweier HSP 90 Monomere einen V-förmigen Homodimer. Mit Hilfe von ATP nähern sich die beiden N-Termini einander an und umschließen das gebundene Nukleotid. Dadurch können die beiden N-Termini und die mittlere Domäne miteinander interagieren und ATP in Adenosindiphosphat (ADP) umwandeln. Löst sich ADP vom Komplex, geht HSP 90 in seinen ursprünglichen Zustand über.[79, 80, 81]

2.3.2.2 HSP 70

HSP 70 setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Am N–Terminus befindet sich eine ATPase Domäne und am C–Terminus eine Substrat bindende Domäne (SBD). Dabei unterteilt sich die SBD in eine β –Sheet Subdomäne, die die Peptidhauptkette des Substrats binden kann und in eine α –Helix Subdomäne, die die β –Domäne unterstützt und das Substrat zusätzlich fixiert. Dabei wechselt die SBD regelmäßig von einer offenen in eine geschlossene Konformation.[82, 83] Dadurch, dass HSP 70 nur ein Teilsegment des Substrates bindet, hat es den großen Vorteil, dass die Größe des gebundenen Proteins nicht so stark eingeschränkt ist, wie zum Beispiel bei HSP 60.[81]

Die beiden Subdomänen sind lokal voneinander getrennt und mit Hilfe einer Verbindungssequenz mit dem N–Terminus verbunden. Ist ATP gebunden, können an der β –Subdomäne Proteine gebunden werden, jedoch relativ schwach, was zu einer kurzen Kontaktzeit führt. Kommt es zur Hydrolyse von ATP zu ADP, wird das Peptid zusätzlich durch die α –Subdomäne stark an die SBD gebunden. Die Hydrolyse von ATP zu ADP stellt also einen wichtigen Regulationsmechanismus dar. Die Hydrolyse von ATP und das Freisetzen von ADP geschieht jedoch relativ langsam, kann aber durch HSP 40 (siehe S. 29) positiv beeinflusst werden. Löst sich ADP vom Komplex, kann durch erneutes Binden von ATP der Prozess wiederholt werden.[3, 81]

2.3.2.3 HSP 60

Bei HSP 60 handelt es sich um ein zylindrisches Oligomer. Die einzelnen Monomere bilden dabei eine doppelte Ringstruktur, in deren Mitte das gewünschte Protein mittels hydrophober Wechselwirkungen binden kann. Mit Hilfe von ATP kann das Protein in seine vorgesehene Form gebracht werden. Jeder einzelne Ring besteht aus sieben Untereinheiten, die sich jeweils in drei Domänen unterteilen:[84]

- Eine äquatoriale Domäne, welche nicht nur ATP bindet, sondern auch die Ringstruktur stabilisiert
- Eine mobile mittlere Domäne, welche die äquatoriale Domäne und die äußere Domäne miteinander verbindet

1 Einleitung

- Eine äußere Domäne, welche eine Bindestelle für Substrate und HSP 10 anbietet

Bindet ATP an einem Ring des Hitzeschockproteins, kommt es zu einer Aktivierung des Moleküls. Durch Umstrukturierung der einzelnen Domänen wird unvollständig gefalteten Proteinen eine hydrophobe Fläche im Inneren des Rings zum Binden angeboten. Es kann immer nur einer der beiden Ringe ein Protein binden. Um das Protein im Inneren des Rings zu behalten, bindet zusätzlich noch HSP 10 an die äußere Domäne des aktivierten Rings und wirkt wie eine Art Deckel. Durch das Binden von HSP 10 wird der Durchmesser des Ringes vergrößert, was sich auf das darin eingeschlossene Protein auswirken kann. Durch Hydrolyse von ATP und der erneuten Bindung von ATP öffnet sich der Zylinder und gibt das Protein frei, unabhängig davon, ob es korrekt gefaltet worden ist oder nicht. Anschließend kann sich der Vorgang wiederholen. Dadurch, dass das Protein im Inneren von HSP 60 gebunden wird, ist die Größe des Peptids beschränkt.[8, 81, 85]

2.3.2.4 HSP 40

HSP 40 unterteilt sich in HSP40-1 und HSP40-2, wobei sich beide aus drei Domänen zusammensetzen.[86] Am N-Terminus befindet sich eine Aminosäuresequenz, die auch J-Domäne genannt wird. Durch die J-Domäne kann HSP 40 unter anderem mit HSP 70 interagieren und dessen ATPase Aktivität um fast das 1000-fache erhöhen.[3]

An die J-Domäne schließt eine flexible Glycin und Phenylalanin Sequenz an. Bei HSP40-1 folgt eine Aminosäuresequenz, die reich an Cystein ist und aus vier zu Paaren angeordneten Sequenzen besteht. Diese Paare können Zinkionen binden und mit denaturierten Proteinen interagieren.[87, 88] Am C-Terminus können ebenfalls Peptide gebunden werden.

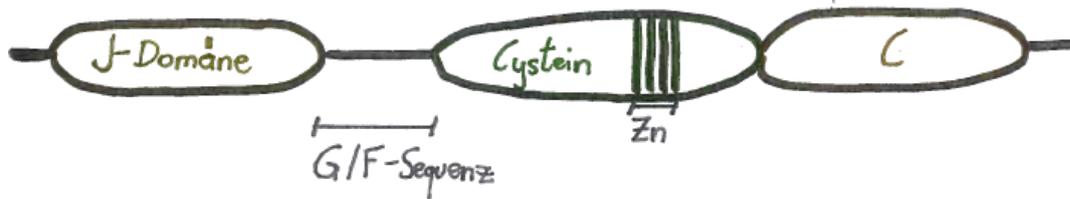


Abbildung 1.9: Zu sehen sind die einzelnen Domänen von HSP40. Am N-Terminus befindet sich die J-Domäne, die über eine flexible ASS-Sequenz an den zentralen Teil des Proteins anschließt. In HSP40-1 befinden sich hier Zinkionen. Der C-Terminus (C) bildet das Ende von HSP40.

Der wesentliche Unterschied zu den HSPs davor ist, dass HSP 40 keine Bindestelle für ATP aufweist.[86, 88, 89]

2.3.2.5 kleine Heat-Shock-Proteine (sHSP)

Die Gruppe der kleinen Heat-Shock-Proteine (sHSP) beinhaltet Proteine im Bereich von 15–30kDa. Ähnlich wie HSP 40 besitzen sie keine Bindestelle für ATP. Sie können dennoch denaturierte Proteine binden und sie unter bestimmten Umständen zu größeren HSPs bringen. sHSP setzen sich aus zwei Domänen zusammen. Sie besitzen am C-Terminus eine dichtgepackte Aminosäuresequenz, die α -kristalline Domäne, die β -sheets formt und eine stabilisierende Wirkung hat. Die α -Domäne wird mittels einer sehr flexiblen Aminosäuresequenz mit

1 Einleitung

dem N-Terminus verbunden. Der N-Terminus ist für die Oligomerisation notwendig, kann aber auch als Schutzmechanismus gegen Hitze wirken. sHSP bevorzugen es, als größere Oligomere angeordnet zu sein. Kommt es zu einem zellulären Stress, teilen sie sich in Dimere auf. Dabei kommt es oft zur Phosphorylierung der sHSP am N-Terminus.[89, 90]

2.3.3 Funktion

2.3.3.1 HSP 90

HSP 90 ist eines der häufigsten Proteine, die in Zellen vorkommen, und essentiell für die richtige Faltung von denaturierten oder neu synthetisierten Proteinen ist. Dabei bietet es diesen Proteinen, die aufgrund ihrer unvollständigen Faltung hydrophobe Bereiche aufweisen, in seiner ATP-gebundenen Form hydrophobe Bindestellen an. Ist das gewünschte Protein erst einmal gebunden, kommt es zur Hydrolyse von ATP. Dies bezweckt eine Konformationsänderung des Homodimers und fixiert das Protein stärker.[79, 80, 81]

Weiters spielt es indirekt eine wichtige Rolle bei der Degradation von Proteinen. Das 26S Proteasom baut schadhafte Proteine kontinuierlich ab. Um dies auch unter Stresssituationen realisieren zu können, ist es notwendig, dass es seine Struktur beibehält. HSP 90 unterstützt es dabei, indem es einen Teil, der für die Bindung notwendigen Energie, in Form von ATP zur Verfügung stellt.[91]

2.3.3.2 HSP 70

HSP 70 besitzt eine schwache ATPase Aktivität. So kommt es vor, dass HSP 70 im ATP gebundenen Zustand für einige Zeit verweilen kann. Durch Kopplung von HSP 40 kann die ATPase Aktivität dramatisch erhöht werden.[3] Falls nötig, bindet am C-Terminus ein Peptid, das sich jedoch relativ schnell wieder lösen kann, falls es zu keiner Hydrolyse von ATP kommt. Ist ein Protein erst einmal fest gebunden, wird es erst wieder freigegeben, wenn es seine gewünschte Konformation eingenommen hat. ADP löst sich vom HSP und gibt das fertige Protein frei.[81, 92]

HSP 70 unterstützt jedoch nicht nur die Zelle beim korrekten Falten von neu synthetisierten Proteinen, sondern schützt die Zelle auch vor Schäden. So

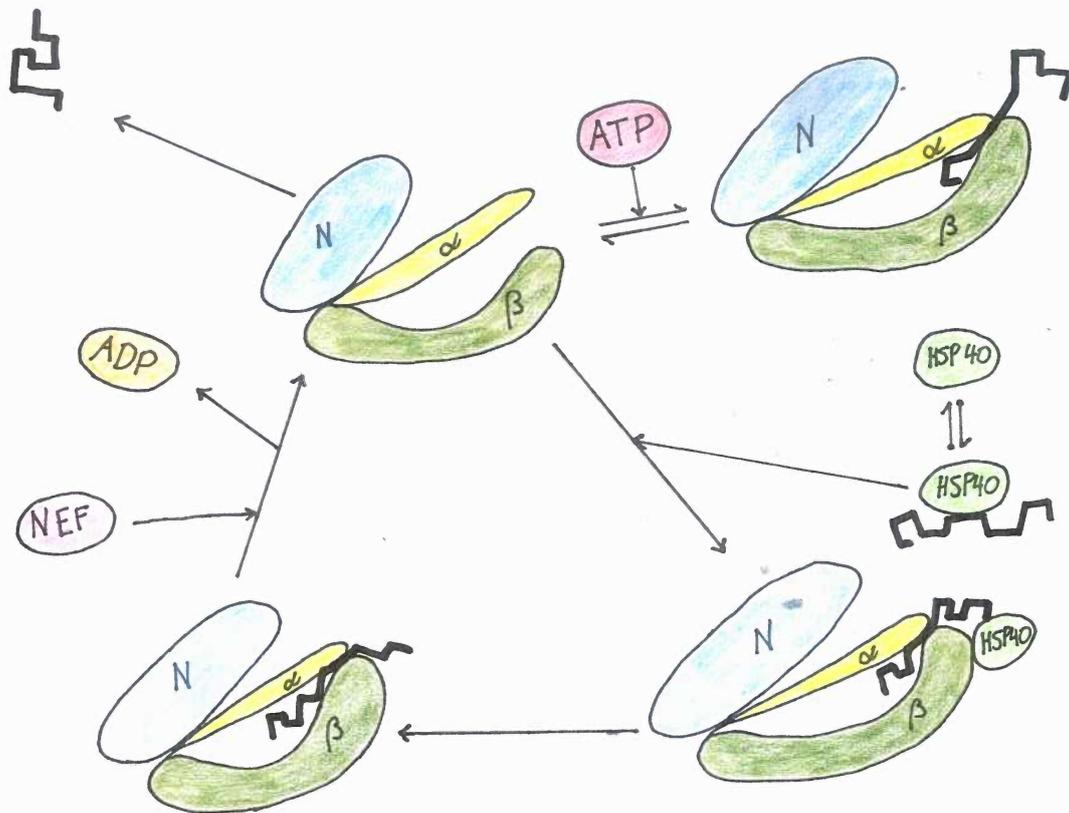


Abbildung 1.10: Gezeigt wird der zeitliche Ablauf der Proteinfaltung von HSP70. Durch Kopplung von ATP am N-Terminus (N) können Proteine zwischen α -Domäne (α) und β -Domäne (β) gebunden werden. Erst durch Hydrolyse von ATP wird das denaturierte Protein endgültig gebunden. Dieser Prozess kann durch HSP40 stark beeinflusst werden. Durch einen Nukleotid Austauschfaktor (NEF) kommt es zur Abgabe von ADP. Das Protein kann sich nun wieder lösen.

1 Einleitung

hindern sie schädliche Prione²¹ daran sich zu vermehren oder eine bestimmte Konformation einzunehmen.

Weiters spielen sie eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung. HSP 70 kann signalübertragende Proteine entweder vor Proteasomen schützen oder sie diesen zum Abbau überlassen. Dieser Schutzmechanismus kann aber auch sehr negative Folgen für den Organismus haben. Durch die erhöhte Resistenz erleidet die betroffene Zelle durch schädliche Einflüsse geringeren Schaden. Bei malignen Zellen wird dadurch eine medizinische Behandlung erheblich erschwert.[3, 93]

2.3.3.3 HSP 60

HSP 60 ist ein Protein, das bei der Faltung und Anordnung von neu synthetisierten oder fehlerhaften Proteinen hilft. Dabei unterstützt es die Zelle nicht nur im Inneren der Zelle, sondern auch an der Zelloberfläche. Um seine Aufgaben ausführen zu können, interagiert HSP 60 mit anderen Heat-Shock-Proteine, z. B. HSP10.

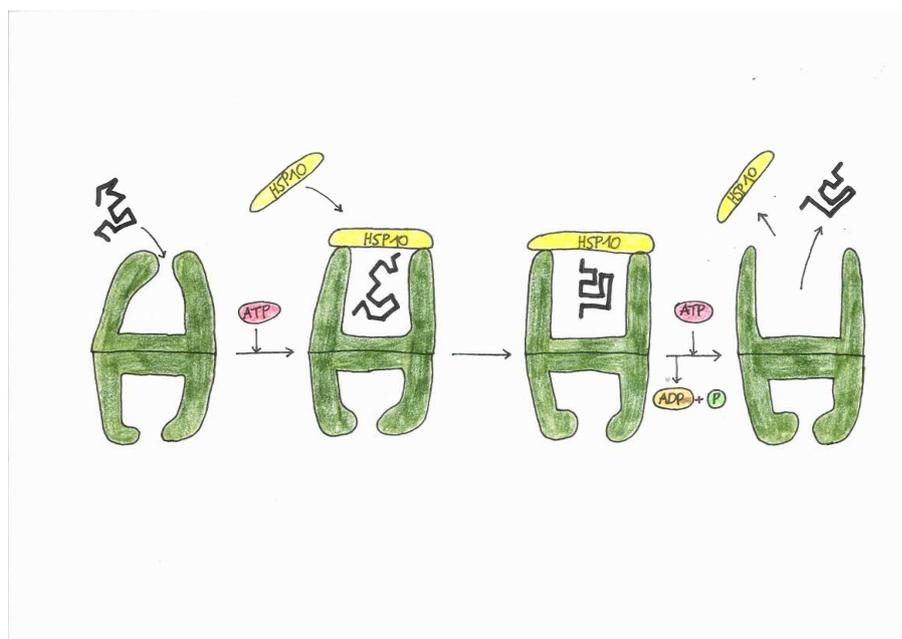


Abbildung 1.11: Mit Hilfe von ATP und HSP 10 kann HSP 60 denaturierten Proteinen ihre ursprüngliche Sekundärstruktur wiedergeben.

²¹Prione sind Proteine, die für schwerwiegende, neurodegenerative Erkrankungen, wie z. B. die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, verantwortlich sind.

Eine besonders wichtige Rolle nimmt es beim Proteintransport in den Mitochondrien ein. Einerseits sorgt es für das korrekte Falten von Proteinen, die für die äußere Matrix bestimmt sind, andererseits behält es mangelhaft gefaltete Proteine in der inneren Membran. Mittels Hydrolyse von ATP kann sich das fertige Protein lösen und die Mitochondrien verlassen.[94, 95] Kommt HSP 60 im Zytoplasma vor, unterstützt es die Zelle bei der Immunabwehr. Dabei kann es an der Zelloberfläche vorkommen oder sogar die Zelle verlassen, um Monozyten, Makrophagen oder andere Zellen zu aktivieren.[8, 96, 85]

2.3.3.4 HSP 40

HSP 40 hilft anderen Proteinen, richtig zu falten. Sie dienen aber auch als Transporter oder helfen, Proteine abzubauen. Mit Hilfe des C–Terminus binden sie das gewünschte Peptid und bringen es im Anschluss zum HSP 70. Über ihre J–Domäne können sie mit HSP 70 interagieren, indem sie an den N–Terminus des HSP andocken. Dadurch kann die ATPase Aktivität von HSP 70 gesteuert und angekurbelt werden. Durch die Hydrolyse von ATP kommt es zu einer Umstrukturierung des C–Terminus von HSP 70 und ein Protein kann fest gebunden werden. Nachdem dieser Vorgang beendet ist, löst sich HSP 40. [87, 92, 97]

2.3.3.5 kleine Heat–Shock–Proteine (sHSP)

Kleine Heat–Shock–Proteine existieren im ganzen menschlichen Organismus und haben bei einigen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle inne. Sie ermöglichen es der Zelle nicht nur, unter diversen Stressbedingungen²² zu überleben, sondern verleihen ihr darüber hinaus auch eine leichte Temperaturreistenz. Dabei unterstützen sie bei einem Heat–Shock das Zytoskelett, indem sie die Aktin–Polymerisation ankurbeln.

Sie können fehlerhafte Polypeptide binden und sie entweder zu ATP–abhängigen Chaperonen bringen, um dort wieder in die passende Konformation gebracht zu werden, oder zu Proteasomen, um die fehlerhaften Proteine abzubauen und unschädlich zu machen. Steigt die Belastung in der Zelle über ein gewisses Maß an, tritt Apoptose ein.

²²z. B. oxidativer Stress, Heat–Shock, denaturierte Proteine,...

1 Einleitung

Dabei muss man zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg unterscheiden. Kommt es beim extrinsischen Pfad auf bestimmte Membranrezeptoren²³ an, ist beim intrinsischen Pfad die Freilassung von Cytochrome c aus den Mitochondrien essentiell. sHSP besitzen nun mehrere Möglichkeiten, um den Zelltod zu verhindern. Sie können einerseits Cytochrome c daran hindern, mittels Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-Kinase die äußere Membran der Mitochondrien zu durchdringen, andererseits kann es direkt an das Cytochrome c binden und so den Zelltod verhindern. Beim extrinsischen Pfad verhindern sie in ihrer phosphorylierten Form das Binden von Daxx (Death-associated protein 6) an den FAS-Rezeptor.[90, 98]

²³Der FAS-Rezeptor gehört zu den Tumornekroserezeptoren und spielt eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Apoptose.

3 Membransensor Hypothese

Die zelluläre Stress–Antwort ist eine Reaktion der Zellen auf einen unliebsamen Einfluss. Dabei ist die Art des Stresses oft gar nicht ausschlaggebend für den makromolekularen Schaden an der Zelle. Betrachtet man den Heat–Shock, stellt man fest, dass es erst bei hohen Temperaturen ($> 43^{\circ}\text{C}$) zu einer Zerstörung von Plasmamembran und Proteinen kommt.[99, 100] Bei pathophysiologischen Temperaturen bzw. Fieber, wo diese Umstrukturierung noch nicht zwingend eintritt, beobachtet man dennoch einen Heat–Shock–Response. Dies wirft die Frage auf, mit welchem Mechanismus die Zelle diesen Einfluss wahrnimmt.

Die Hypothese des *Membransensors* bietet eine mögliche Erklärung dafür. Dabei wird vermutet, dass die Regulierung und Expression von HSPs über Veränderungen an der Plasmamembran bestimmt wird. Selbst bei geringen Temperaturschwankungen kann es zu einer Veränderung der Fluidität und Mobilität der Lipidschichten kommen, was in weiterer Folge zu einer Umstrukturierung der Nanoplatfformen führen kann. [101, 102]

Spezielle Fluoreszenzmikroskopie (siehe S. 48) ermöglicht es unter anderem bei modifizierten CHO–Zellen, diese Nanoplatfformen zu detektieren. Mit Hilfe von mGFP–GPI konnten sowohl Monomere als auch Dimere dieser Moleküle beobachtet werden. Durch Induzierung eines HS reduzierte sich die Anzahl an Dimeren. [45] Durch diesen Effekt kann es zu einer Bildung oder Aktivierung von potentiellen Stresssensoren in neu geformten Domänen kommen.[101, 102] Ein Anstieg des Ca^{2+} –Spiegels innerhalb der Zelle bei bereits geringen Temperaturanstiegen erhöht den Verdacht.

Durch Destabilisierung der einzelnen, funktionellen Domänen können einzelne Signalkaskaden aktiviert oder deaktiviert werden. Ähnlich einem HS sorgen oxidierte Phospholipide für eine Auflösung von Nanoplatfformen [47] und eine Signalkaskade wird ausgelöst, die bis zum Zelltod führen kann. Die Aktivierung von saurer Sphingomyelinase (aSMase) spielt dabei eine wichtige Rolle. Ein Produkt dieses Enzyms ist der Botenstoff *Ceramide*. [47, 103]

1 Einleitung

Durch *Ceramide* kann der Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)–Weg²⁴ initiiert werden, wodurch die Zelle in Apoptose übergehen kann. [103, 104] Inhibierung von *sMase* kann die Membranstruktur stabilisieren und den Zelltod unterdrücken.[47]

Von Heat–Shock–Proteinen weiß man, dass sie permanent in der Zelle vorkommen und gemeinsam mit ihren Partnern ein komplexes Netzwerk bilden. Ein Teil dieser Proteine ist permanent oder zumindest temporär mit der Zellmembran verbunden, wobei die Interaktion mit Lipiden dies verstärken kann (siehe S. 24). HS–Sensoren, die wie Thermometer wirken, können an der Membranoberfläche entstehen und einen Temperaturunterschied wahrnehmen, bevor es zu einer ernststen Beschädigung der Zelle kommt.[99, 105, 106]

Eine Interaktion der HSPs mit der Zellmembran kann auch Auswirkungen auf die Regulation verschiedener Zellprozesse haben, unter anderem auf die Endozytose.[107] Clathrin spielt bei der Endozytose eine wichtige Rolle, da es runde Vesikel formt, die in weiterer Folge in das Zytosol diffundieren können. Dadurch können nicht nur Moleküle transportiert werden, sondern auch Teile der Plasmamembran recycelt werden. Somit können bestimmte Lipide und Membranproteine ins Zellinnere gelangen, wodurch es zu einer Umstrukturierung einzelner, funktioneller Domänen auf der Plasmamembran kommen könnte und in weiterer Folge zu einer Aktivierung oder Deaktivierung dieser. Neben der Clathrin–abhängigen–Endozytose (CAE) existiert auch die Clathrin–unabhängige–Endozytose (CUE). Beide können mit Hilfe des Toxins *Pitstop 2* blockiert werden, was eine Umstrukturierung der Plasmamembran erschwert, jedoch auch zur Apoptose führen kann.[108, 109]

Cholesterin oder Sphingolipide können Nanoplattformen stabilisieren und in weiterer Folge ihre Sensitivität beeinflussen.[101, 102, 105, 110, 111] Am Beispiel des EGF–Rezeptors (engl. Epidermal Growth Factor)²⁵ konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung unabhängig von einem Signalmolekül provoziert werden kann. Durch den Entzug von Cholesterin kommt es zu einer Destabilisierung

²⁴Bei dem MAPK–Weg handelt es sich um eine mehrstufige Signalkaskade, die mehrere Proteinkinase in Serie schaltet. In Abhängigkeit von den Stimuli existieren verschiedene Signalwege.

²⁵Der Epidermal Growth Factor (EGF) ist ein extrazelluläres Signalprotein, das Auswirkungen auf die Zellteilung hat.[8]

der Domänen, in denen die Rezeptoren verankert sind. Diese können sich dadurch auf der Plasmamembran neu anordnen, was die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Aktivierung erhöht. Durch Modifikation der Zellmembran kann so ein Heat-Shock-Response in Abwesenheit eines HS ausgelöst werden.[102, 111]

Eine Gruppe von Ionenkanälen in der Plasmamembran, die TRP-Kanäle (engl. transient receptor potential), spielen nicht nur bei der Übertragung von chemischen und mechanischen Stimuli eine wichtige Rolle, sondern auch bei thermischen. Einige TRP-Kanäle weisen einen hohen Q-Wert²⁶ auf.[112] Durch einen geeigneten Stimulus werden die TRP-Kanäle depolarisiert und ein Aktionspotential wird generiert. TRP-Kanäle können sowohl durch einen positiven (z. B. TRPV1) als auch einen negativen (z. B. TRPM8) Temperaturgradienten aktiviert werden. Woraus diese Temperatursensitivität resultiert ist nicht ganz klar.[100, 102] Eine Vermutung ist, dass eine Veränderung der Spannung der Zellmembran zur Aktivierung führt.[100] Eine andere Hypothese ist, dass intrazelluläre Produkte, z. B. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP2), den TRP-Kanal regulieren.[102, 106]

Lipide spielen bei der Modulation dieser Kanäle eine wichtige Rolle. Um die Abhängigkeit der Ionenkanäle von einzelnen Lipiden zu ermitteln, werden Lipidschichten mit bekannter Komposition synthetisch erzeugt und mit den gewünschten Proteinen versehen.[101, 102] Aber auch zusätzliche Proteine in den geordneten Domänen können Auswirkungen auf die Eigenschaften der darin fixierten Sensoren haben. So kommt es zum Beispiel sowohl zu einer Veränderung der Thermotoleranz als auch der Aktivität von TRPM8 außerhalb der geordneten Domänen, wobei vermutet wird, dass neben der unterschiedlichen Lipidzusammensetzung auch eine mangelnde Wechselwirkung mit anderen Proteinen Auswirkungen hat.[100, 102, 105, 106, 113]

²⁶Der Q-Wert gibt an, um wieviel schneller ein System bei einem Temperaturanstieg von 10K reagiert.

4 Struktur der Plasmamembran während eines Heat-Shocks

Nicht jeder Heat-Shock führt zu makromolekularen Schäden und dennoch reagiert die Plasmamembran bereits auf geringe Temperaturschwankungen, um den Zustand der Homöostase wiederherzustellen.[61] Aufgrund der vielseitigen Zusammensetzung der Plasmamembran besitzt sie eine hohe Sensibilität für Temperaturunterschiede. Diese können zu einer Veränderung der Fluidität und in weiterer Folge zu einer Veränderung der Mobilität der darin befindlichen Moleküle führen. Dadurch kann es zu einer Umstrukturierung der einzelnen Phasen der Lipidschicht kommen, was auch eine Reaktion der darin verankerten Membranproteinen hervorrufen kann [101]. Proteinkomplexe können destabilisiert werden, woraus sich einzelne Komponenten lösen und so einen neuen funktionierenden Komplex bilden können, der in weiterer Folge Heat-Shock-Transkriptionsfaktoren rekrutieren kann.[114]

Aufgrund der durch Hitze veränderten Fluidität der Plasmamembran kommt es zu einer Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels mit Hilfe von Ionenkanälen. Calmodulin (CaM), ein sekundärer Botenstoff, wird dadurch an eine Kinase gebunden und kann in weiterer Folge HSF-1 phosphorylieren.[61]

PIP2 ist ein Phospholipid, das bevorzugt auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran vorkommt. Durch Aktivierung von Phospholipase C (PLC), z. B. durch Protein-Kinasen oder GTPasen[61], wird PIP2 gespalten, wobei Diacylglycerol (DAG) in der Plasmamembran fixiert bleibt und die Kopfgruppe, Inositoltriphosphat (IP3), im glatten ER zur Freigabe von Ca^{2+} sorgt. Dadurch wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, was mittels Phosphorylierung zur direkten oder indirekten Aktivierung oder Deaktivierung von Ionenkanälen führen kann.[61, 115] Es kann aber auch zur Aktivierung von Phospholipase D kommen, was die Kopfgruppen der einzelnen Phospholipide abspaltet und so zur Generierung von Phosphatidsäure führt. Dadurch kann es zu einer Veränderung des pH-Wertes innerhalb der Zelle kommen.[102]

In der Plasmamembran befinden sich auch unterschiedliche, thermosensitive Rezeptoren (z. B. TRP-Kanäle), die mit der Plasmamembran assoziierte Enzyme

4 Struktur der Plasmamembran während eines Heat-Shocks

(z. B. Lipasen, Kinasen) aktiveren können.[61, 102]

Nicht nur beim oxidativen Stress, sondern auch bei einem HS kann es zu einer Hyperpolarisation oder Depolarisation der Mitochondrien kommen, was zu einer Oxidation von Lipiden in der Zellmembran führen kann. Die chemische Zusammensetzung der einzelnen Phospholipide bestimmt darüber, ob und wie viele Lipide oxidieren. Die Membran erfährt dadurch eine Veränderung der Fluidität und der Proteinstrukturen. Mit Hilfe von Phospholipase A₂ (PLA₂) können die oxidierten Fettsäurereste abgetrennt werden und durch natürliche Acyl-Ketten ersetzt werden.[61, 101]

Das Mengenverhältnis der Lipide in der Zellmembran ist, wie schon erwähnt, entscheidend für deren Eigenschaften. Vor allem das richtige Verhältnis zwischen Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylcholine ist ausschlaggebend für eine gesunde Zelle.[61] Durch Temperaturschwankungen kann aber auch die Synthese von Sphingolipiden beeinflusst werden. Organismen, die ihre Sphingolipidsynthese nicht erhöhen können, besitzen eine geringere Thermotoleranz. Der Grund dafür liegt in der signalübertragenden Funktion von Sphingosinbasen, die mittels Kinasen phosphoryliert werden können. Hydrolyse dieser Sphingolipidkomplexe kann die Formation von Ceramiden ankurbeln. Ein erhöhter Ceramide-Spiegel kann zur Verdrängung von Cholesterol in der Plasmamembran führen.[61, 116, 115]

Am Beispiel des monomeren, grün fluoreszierenden Protein (mGFP)-GPI Konstruktes bei CHO-Zellen konnte man einen erheblichen Effekt durch einen Temperaturanstieg wahrnehmen. Das in der Plasmamembran verankerte Konstrukt diffundiert zu einem großen Teil (~ 30%) als Dimer. Durch Cholesterol und Aktin werden diese Dimere stabilisiert. Bei einem Anstieg der Temperatur auf 41°C reduziert sich der Anteil der Dimere drastisch und beträgt nur noch ~ 5%.[102]

Aber auch indirekte Mechanismen können einen erheblichen Effekt auf die Plasmamembran haben. So werden während eines HS vermehrt Stress-Hormone (z. B. Glucocorticoide) ausgeschüttet. Mit Hilfe dieser Hormone wird es betroffenen Zellen ermöglicht, physiologische Veränderungen vorzunehmen, um auf die Stresssituation entsprechend reagieren zu können. Durch erhöhten Ausstoß von Corticosteroiden erhöht sich ebenfalls die Fluidität der Zellmembran, was

1 Einleitung

in weiterer Folge zu einer Umstrukturierung der einzelnen Nanoplatattformen führen kann.[102, 117]

Lässt man etwas Zeit nach dem HS vergehen, beginnt der Organismus Hormone auszuschütten. Glucocorticoide, wie Cortisol, können den Metabolismus der Zelle ankurbeln. Durch ihre katabole Wirkung helfen sie der Zelle, den erhöhten Energiebedarf während einer Stresssituation, wie einem HS, zu decken.[102, 118] Ein erhöhter Cortisolspiegel sorgt weiters für eine verminderte Expression von Heat-Shock-Proteinen während eines HS. Dabei wird jedoch hauptsächlich die neue Synthese von Heat-Shock-Proteinen behindert und nicht bestehende Heat-Shock-Proteine abgebaut.[119]

Cortisol sorgt für eine Aktivierung von verschiedenen Kinasen (PKC, ERK1/2²⁷), die in weiterer Folge HSF-1 phosphorylieren. Dadurch wird HSF-1 stärker an HSP 90 gebunden und so ein Heat-Shock-Response unterdrückt bzw. minimiert. Es verbleibt somit in seinem inaktiven, monomerischen Zustand. [102, 117, 120]

²⁷Bei Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2 (ERK1/2) handelt es sich um ein Enzym, das zu den Serin/Threonin-Kinasen gehört. Es unterstützt dabei den Transfer einer Phosphatgruppe auf die OH-Gruppe einer Aminosäure.

5 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopische Verfahren ermöglichen es, Strukturen und dynamische Prozesse in den kleinsten Organismen zu visualisieren. Heutzutage gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, die unterschiedlichen Ebenen eines Organismus aufzulösen. Die Anfänge der Lichtmikroskopie gehen zurück in das 17. Jahrhundert. War damals nur eine geringe Auflösung möglich, konnten die einzelnen Komponenten und Visualisierungsverfahren im Laufe der Jahre stark verbessert werden. Dadurch sind heutzutage Auflösungen im unteren nanoskopischen Bereich möglich.[121, 122]

5.1 Grundlagen

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie und ermöglicht eine Verschiebung der klassischen Auflösungsgrenze. Die maximale Auflösung eines Lichtmikroskops ist durch das Phänomen der Beugung begrenzt. Das *Abbe-Limit*²⁸ definiert diese Grenze. Der minimale Abstand d zwischen zwei voneinander getrennten, selbstleuchtenden Punkten ist über das *Rayleigh-Kriterium*²⁹ definiert.

$$d = 1,22 \cdot \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha} \quad (1.5)$$

Wie man sieht, ist der minimale Abstand von der Wellenlänge λ der Strahlungsquelle abhängig. Der Term $n \cdot \sin \alpha$ ist eine charakteristische Größe des Objektivs eines Mikroskops und wird *numerische Apertur (NA)* genannt. Es ist von Vorteil, Objektive mit möglichst hoher NA zu verwenden. Daraus folgt, dass Strukturen, die kleiner als die halbe Wellenlänge des beleuchteten Lichtes sind, nicht aufgelöst werden können.[122, 123]

Der Effekt der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Phänomen der *Fluores-*

²⁸Das Abbe-Limit definiert das Auflösungsvermögen eines Objektes, das mit kohärentem Licht bestrahlt wird. Um Informationen über den Abstand zu erhalten, muss mindestens die erste Beugungsordnung dargestellt werden.

²⁹Zwei voneinander getrennte Punkte können gerade noch aufgelöst werden, wenn das Intensitätsmaximum des Beugungsmuster des ersten Punktes in das erste Intensitätsminimum des Beugungsmusters des zweiten Punktes fällt.

1 Einleitung

zenz. Mit Hilfe einer geeigneten, möglichst kohärenten Strahlungsquelle können Moleküle innerhalb der zu untersuchenden Struktur angeregt werden. Dabei kann es sich um autofluoreszente Teilchen handeln oder man verwendet spezielle Fluorophore, die an ein Molekül gebunden werden können. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes bei der Fluoreszenz unterscheidet sich von der Wellenlänge der einstrahlenden Quelle. Dies kann durch die *Stokessche Regel* erklärt werden.

Hierzu machen wir uns den Teilchencharakter des Lichtes zunutze. Die einstrahlende Lichtquelle entsendet Lichtquanten mit einer spezifischen Wellenlänge λ_{in} bzw. Energie $E = h \cdot f$, wobei h für das Plancksche Wirkungsquantum und f für die Frequenz des Photons steht. Diese Lichtquanten werden von den markierten Molekülen absorbiert, was zu einer Erhöhung des Energieniveaus bestimmter Elektronen führen kann. Dieser Zustand ist nur von kurzer Dauer und durch Emission eines weiteren Lichtquants nehmen die Elektronen wieder ihren Grundzustand ein. Dabei gehen Teile der Anregungsenergie E_{in} in andere Energieformen über, was zu einer Reduktion von E_{out} führt.

$$\Delta E = E_{in} - E_{out} \quad (1.6)$$

Aus dem Energieunterschied ΔE ergibt sich eine Veränderung der emittierten Wellenlänge λ_{out} . Die Konstante c steht hierbei für die Lichtgeschwindigkeit.

$$\Delta E = h \cdot c \cdot \left[\frac{1}{\lambda_{out}} - \frac{1}{\lambda_{in}} \right] \quad (1.7)$$

Mit Hilfe spezieller Erregerfilter können nur die gewünschten Spektren der Lichtquelle transmittieren. Ein Kondensator bündelt das Licht zusätzlich. Das emittierte Licht weist eine geringere Intensität als das Anregungslicht auf. Um die einzelnen Fluorophore dennoch wahrzunehmen, befindet sich nach dem Objektiv ein Sperrfilter, der nur eine bestimmte Bandbreite des emittierten Lichtes durchlässt.

Neben der Wahl passender Filtersysteme ist ebenfalls entscheidend, dass das Absorptionsmaximum des fluoreszierenden Stoffes idealerweise mit der Wellenlänge der Strahlungsquelle übereinstimmt. Dies ist jedoch in vielen Fällen nicht realisierbar, da sich die Absorptionsspektren diverser Fluorophore vonein-

ander unterscheiden und die Wellenlänge der verwendeten Strahlungsquelle nicht immer beliebig variierbar ist. Die Kenntnis der Absorptionskurven der einzelnen Fluorochrome ist daher unabdingbar, um eine intensive Fluoreszenz zu erreichen.

Verwendet man Fluorochrome, die zwei ausreichend voneinander getrennte Absorptionsmaxima besitzen, kann eine Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen erzeugt werden. Brauchbare Ergebnisse erhält man aber nur dann, wenn sich daraus zwei separierbare Fluoreszenzfarben ergeben.[122]

5.2 Grenzen der Fluoreszenzmikroskopie

Auch für das Auflösungsvermögen der Fluoreszenzmikroskopie gilt das Abbe-Limit (siehe S. 41). Durch das Aufleuchten der Fluorophore können kleinste Strukturen mit hohem Kontrast dargestellt werden. Bei diesen aufleuchtenden Punkten ist ein Beugungsmuster zu erkennen. Damit nun benachbarte Fluorophore getrennt voneinander abgebildet werden können, müssen sie sich nur in einem geeigneten Abstand voneinander befinden. Die trifft gerade noch zu, wenn das Intensitätsmaximum des ersten Fluorophors in das erste Minimum des zweiten Fluorophors fällt. In Abhängigkeit von Wellenlänge und NA erhält man den entsprechenden minimalen Abstand. Spezielle Methoden (photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM)[124], Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)[125], Stimulated Emission Depletion (STED)[126, 127]) schaffen es sogar, Strukturen im unteren nanoskopischen Bereich zu visualisieren. Dennoch sind auch den fortschrittlichsten Methoden der Fluoreszenzmikroskopie Grenzen gesetzt.

Neben den üblichen optischen Abbildungsfehlern (z. B. sphärische Aberration, Koma, Astigmatismus,...) existieren noch andere limitierende Faktoren (Photobleichung, toxischer Effekt).

Um einen zufriedenstellenden Kontrast zu bekommen, ist es nötig, das Präparat mit einer ausreichenden Intensität zu bestrahlen. Durch die daraus resultierende Elektronenanregung kommt es beim Fluorophor zu einem photochemischen Prozess, der sogenannten *Photobleichung*. Die Photobleichung ist ein dynamischer Prozess, bei der die Fluorochrome ihre lumineszierende Fähigkeit

1 Einleitung

verlieren. Die Resistenz eines Fluorochromes gegen diesen Effekt ist neben der einstrahlenden Intensität des Lichtes auch noch von der gewählten Wellenlänge abhängig. Durch Photobleichung können Strukturinformationen des zu untersuchenden Präparates verloren gehen. Zusätzlich kann bei lebenden Präparaten durch eine Bestrahlung mit hochenergetischem, kurzwelligem Licht ein toxischer Effekt hervorgerufen werden. Dadurch kann es zu einer zellulären Veränderung kommen.

5.3 Spezielle Anwendungsmöglichkeiten

5.3.1 Einzelmolekülmikroskopie

Bei der Einzelmolekülmikroskopie handelt es sich um eine spezielle Methode, um einzelne, mit Fluorophoren markierte, Moleküle sichtbar zu machen. Die Dichte der Moleküle darf dabei nicht zu hoch sein, sodass die einzelnen Moleküle noch getrennt voneinander wahrgenommen werden können (siehe Kapitel 5.2). In der Biophysik ist hier die Verfolgung einzelner Moleküle in der Plasmamembran lebender Zellen (Single Particle Tracking (SPT)[128]) von besonderem Interesse. Regt man die markierten Moleküle mit einem geeigneten Laser an, emittieren diese Photonen, die detektiert werden können. Wichtig ist, dass der gewählte Farbstoff während der Messung möglichst hell und bleichresistent ist, da ansonsten Informationen verloren gehen.

Mit Hilfe einer zweidimensionalen Gauß-Kurven Approximation können die registrierten Photonen als einzelne, beugungsbegrenzte Lichtpunkte dargestellt werden. Durch geeignete CCD-Kameras ist eine schnelle Abfolge mehrerer Bildsequenzen (wenige Millisekunden) möglich. [129] In jedem Bild werden den lokalisierten Teilchen i Koordinaten $\vec{a}_i = (x_i, y_i)$ zugeordnet. Wiederholt man dies über mehrere Bildsequenzen τ hinweg und vergleicht die Teilchenpositionen $\vec{a}(\tau)$ der Moleküle mehrerer Bildsequenzen, können Aussagen über Eigenschaften der Einzelmoleküle getroffen werden. Dabei können sowohl Informationen zum Diffusionsverhalten als auch zur Existenz von Nanoplattformen gewonnen werden.

Für die Einzelmolekülspektroskopie eignen sich die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Mikroskopieverfahren. Großer Vorteil der Einzelmole-

külmikroskopie ist die durch Separierung der Moleküle erreichte hohe Positionsgenauigkeit, die sich im Bereich von wenigen Nanometern bewegen kann (siehe Kapitel 5.2).

5.3.2 Interne Totalreflexionsfluoreszenz (TIRF)–Mikroskopie

Bei der TIRF–Mikroskopie handelt es sich um eine spezielle Visualisierungsmöglichkeit, zelluläre Prozesse und Strukturen in den äußersten Bereichen der Zelle zu analysieren. Dadurch können Regionen, wie z. B. die Plasmamembran, detailliert untersucht werden, ohne störende Effekte darüberliegender Strukturen zu erfahren. Üblicherweise verwendet man ein inverses Lichtmikroskop mit einem Objektiv mit Ölimmersion und einer hohen NA ($\geq 1,40$), um den notwendigen kritischen Einfallswinkel zu erreichen.

Mit Hilfe eines kritischen, flachen Einstrahlwinkels kommt es an der Grenzfläche zwischen Probenplättchen und Probe zur Totalreflexion. Durch das Phänomen der Evaneszenz³⁰ breitet sich ein Teil des reflektierten Lichtes innerhalb des Probenplättchens aus und dringt teilweise in die angrenzende Zelle ein. Dies geschieht, wenn Licht von einem Medium mit einem hohen Brechungsindex (Glasplättchen) in ein Medium mit einem niedrigen Brechungsindex (Zelle bzw. Medium) übergeht. Dadurch kommt es zur Anregung der Fluorophore in diesem Bereich. Die Eindringtiefe liegt im Nanometerbereich ($\sim 100\text{--}200\text{nm}$) und ist von der Wellenlänge der einstrahlenden Strahlung abhängig.

Vorteil dieser Methode ist, dass störende Fluoreszenz außerhalb der Fokalebene unterdrückt wird und ein sehr hoher Kontrast erzielt werden kann. Es kann jedoch nur die direkt angrenzende Schicht hinter dem Glasplättchen untersucht werden.[121, 130, 131]

³⁰Bei der Evaneszenz breiten sich Wellen innerhalb eines Materials, an dem sie totalreflektiert werden, trotzdem etwas aus. Die Abnahme der Intensität innerhalb des Materials ist jedoch exponentiell.

1 Einleitung

5.3.3 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Um Aussagen über die direkte Interaktion von Proteinen machen zu können, ist FRET geeignet. *Theodor Förster* berichtete erstmals 1948 vom Phänomen, dass das Binden zweier Proteine mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers dargestellt werden kann. Die Energie eines angeregten Fluorophors (Donor) geht dabei strahlungslos über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf einen anderen, nahegelegenen Fluorophor (Akzeptor) über. Die Fluoreszenz des Donors wird durch die Übertragung der Energie auf den Akzeptor reduziert bzw. ausgelöscht. Das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors müssen überlappen, um diesen Prozess zu ermöglichen.

Der Akzeptor gibt die empfangene Energie in Form von Strahlung wieder ab. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem eine Energieübertragung stattfindet, bewegt sich im Bereich von wenigen Nanometern ($\sim 1-10\text{nm}$). Sind Donor und Akzeptor weiter voneinander entfernt, tritt kein FRET auf. Dadurch können relativ genau Aussagen über den intermolekularen Abstand zwischen Molekülen und in weiterer Folge über deren Interaktion gemacht werden. Mittels Einzelmolekül-FRET-Messungen lassen sich dynamische Veränderungen an Molekülen oder anderen Komplexen analysieren. Die Effizienz des Energietransfers E hängt dabei vom Donor-Akzeptor Abstand R_{DA} und dem charakteristischen Förster-Radius R_F ³¹ ab.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_F}\right)^6} \quad (1.8)$$

Dabei setzt sich der Förster-Radius aus der relativen Orientierung der beiden Dipolmomente κ^2 , der Fluoreszenzausbeute ϕ_F , dem Integral J der Überlappung des Emissions-Absorptions-Spektrums von Donor und Akzeptor und dem Brechungsindex n des umgebenden Mediums zusammen.

$$R_F = 0,211 \cdot \sqrt[6]{\frac{\kappa^2 J \phi_F}{n^4}} \quad (1.9)$$

FRET kann zusätzlich zur Energieübertragung auf den Akzeptor entweder

³¹Der Förster-Radius ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, wo die Effizienz der Energieübertragung von Donor auf Akzeptor 50% beträgt.

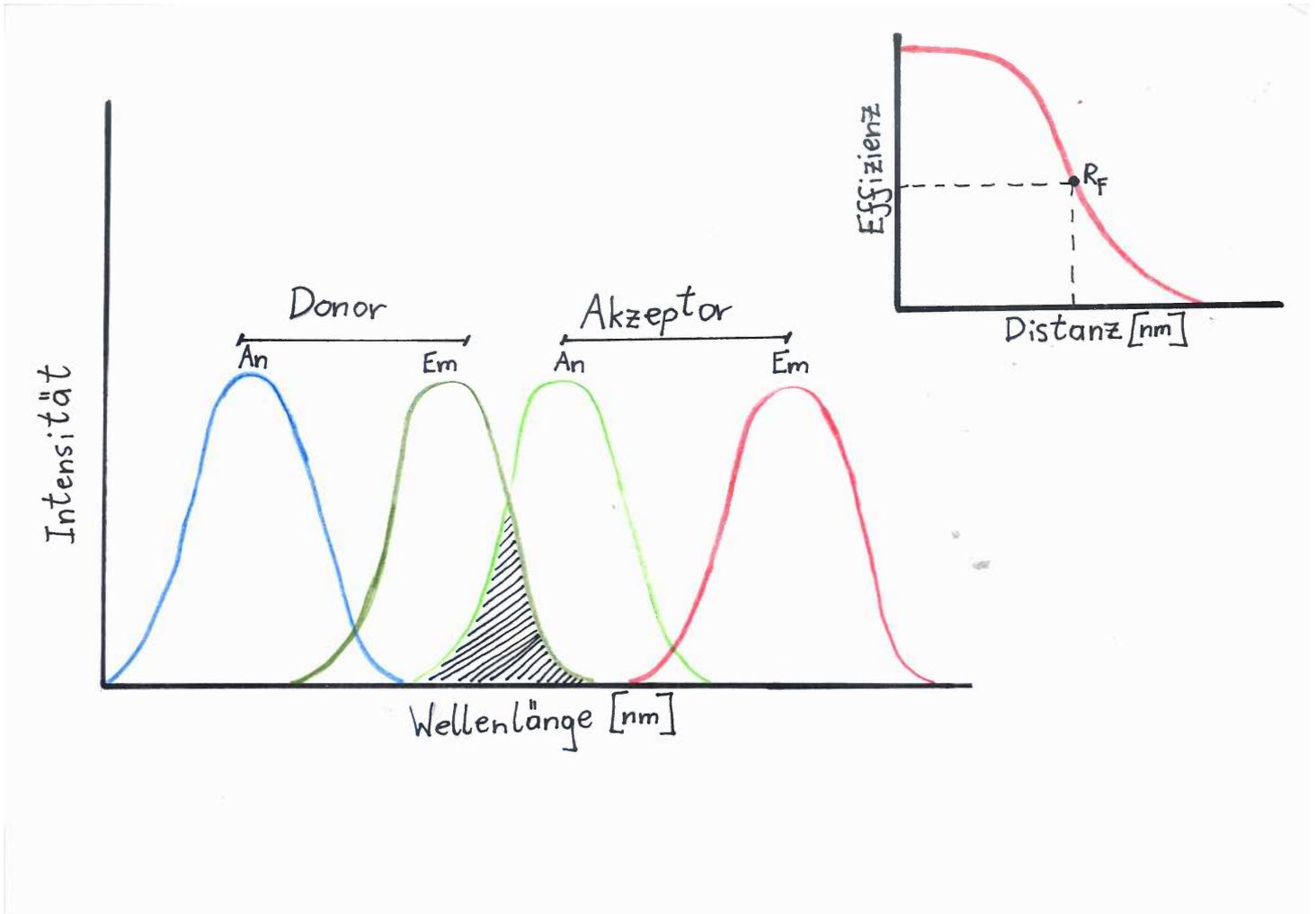


Abbildung 1.12: Für ein effizientes FRET-Signal ist neben der starken Abhängigkeit von der Entfernung der beiden Moleküle auch noch die Überlappung des Emissionsspektrums (E_m) des Donors und des Anregungsspektrums (A_n) des Akzeptors wesentlich. Bei den einzelnen Spektren handelt es sich um Gaußverteilungen. Der Förster-Radius R_F gibt den Abstand an, bei dem 50% der Akzeptoren durch die Donoren angeregt werden. Die Effizienz nimmt mit der Entfernung sehr stark ab und bewegt sich nur im Bereich von wenigen Nanometern.

1 Einleitung

über die abnehmende Strahlungsemission des Donors festgestellt werden oder aber auch über die reduzierte Lebensdauer des Donorfluorophors. Alle drei Varianten erlauben eine Aussage über die Existenz und Effizienz von FRET.[121, 132, 133]

5.3.4 Thinning Out Clusters while Conserving Stoichiometry of Labeling (TOCCSL)

In den letzten Jahren wurde zur Visualisierung von kleinsten Strukturen auf der Plasmamembran unter der Leitung von Gerhard Schütz eine weitere Methode der Fluoreszenzmikroskopie entwickelt. Der Name dieser Technik lautet *Thinning Out Clusters while Conserving Stoichiometry of Labeling* (TOCCSL). Bei TOCCSL handelt es sich um eine weiterentwickelte Variante von Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP), welche im Einzelmolekülbereich eingesetzt werden kann. Für TOCCSL ist es notwendig, dass die Fluoreszenzmarkierung der zu untersuchenden Moleküle stöchiometrisch³² erfolgt. Das bedeutet, dass an jedes zu untersuchende Molekül genau ein Farbstoffmolekül gebunden wird. Ausgehend von einer hohen Clusterdichte auf der zu untersuchenden Plasmamembran, die aufgrund des Abbe-Limits nicht mehr getrennt voneinander wahrgenommen werden können, löst man dieses Problem mit Hilfe von *Photobleichen*.

Bei FRAP wird zuerst an einer beliebigen Stelle der Zelle die Fluoreszenzintensität gemessen. An derselben Stelle werden mittels eines Laserimpulses die fluoreszierenden Moleküle irreversibel in einen nicht-fluoreszierenden Zustand gebracht. Dieser Prozess wird *Photobleichung* genannt. Dadurch entsteht an dieser Stelle ein dunkler Fleck. Aus den angrenzenden Bereichen der Zelle können fluoreszierende Moleküle, die von der Photobleichung nicht betroffen wurden, in diesen Bereich eindiffundieren. Durch Messung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensität an der gebleichten Stelle können Aussagen über die Mobilität der Moleküle getroffen werden.

TOCCSL setzt an dieses Prinzip an. Ausgehend von einer fluoreszierenden Moleküldichte, deren Dichte so hoch ist, dass einzelne Moleküle nicht mehr

³²Die Stöchiometrie ist ein mathematisches Hilfsmittel in der Chemie und stellt einen quantitativen Zusammenhang zwischen Ausgangs- und Endprodukt dar.

voneinander getrennt wahrgenommen werden können, wird dies zu Beginn des Experiments durch Aufnahme eines Pre-Bleach Bildes festgehalten (siehe Abbildung 1.13, roter Bereich). Mit Hilfe eines kurzen, hochenergetischen (mehrere kW/cm^2) Laserimpulses werden anschließend an einer bestimmten Stelle der Zellmembran die darin enthaltenen Fluorophore irreversibel in einen nicht-fluoreszierenden Zustand gebracht. Um die Fluorophore möglichst rasch irreversibel zu bleichen, ist nicht nur eine entsprechende Laserleistung nötig, sondern es setzt auch die Verwendung eines nicht allzu bleichstabilen Fluorophors voraus. Zur Charakterisierung der Mobilität muss man einen Kompromiss zwischen Bleichresistenz und Bleichbarkeit finden. Durch eine Blende kann die ausgewählte Stelle auf einen genau definierten, kleinen Bereich begrenzt werden. Die Blende muss dabei scharf abgebildet werden, um Randeffekte vernachlässigen zu können. Unmittelbar nach dem Bleichimpuls wird ein Kontrollbild aufgenommen, um sicherzugehen, dass sämtliche Fluorophore innerhalb des von der Blende begrenzten Bereiches photogeblicht worden sind (siehe Abbildung 1.13, gelber Bereich).

Aus angrenzenden Regionen, außerhalb des von der Blende begrenzten Bereiches, diffundieren fluoreszierende Moleküle in den gebleichten Bereich ein und vermischen sich mit den nicht-fluoreszierenden Molekülen. Andererseits diffundieren aber auch Moleküle mit vollständig gebleichten Fluorophoren aus diesem Bereich hinaus. Da es sich dabei um keinen instantanen Vorgang handelt, besitzt der gebleichte Bereich zu Beginn eine geringe Dichte an fluoreszierenden Molekülen. Die Abstände zwischen den fluoreszierenden Molekülen sind dadurch größer und so können einzelne, fluoreszierende Moleküle bzw. Nanoplatattformen voneinander getrennt detektiert werden. Innerhalb einer gewissen Regenerationszeit lässt man gerade so viele fluoreszierende Moleküle in den gebleichten Bereich eindiffundieren, sodass sie noch getrennt voneinander abgebildet werden können. Die Regenerationszeit hängt dabei stark von der Mobilität der Moleküle ab und kann sich im Bereich von wenigen Millisekunden bis hin zu einigen Sekunden bewegen (siehe Abbildung 1.13, blauer Bereich).

Zur Analyse der Mobilität der einzelnen Moleküle verwendet man zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie, wodurch mit einer zeitlichen Auflösung von wenigen Millisekunden mehrere Aufnahmen gemacht werden können. Um die

1 Einleitung

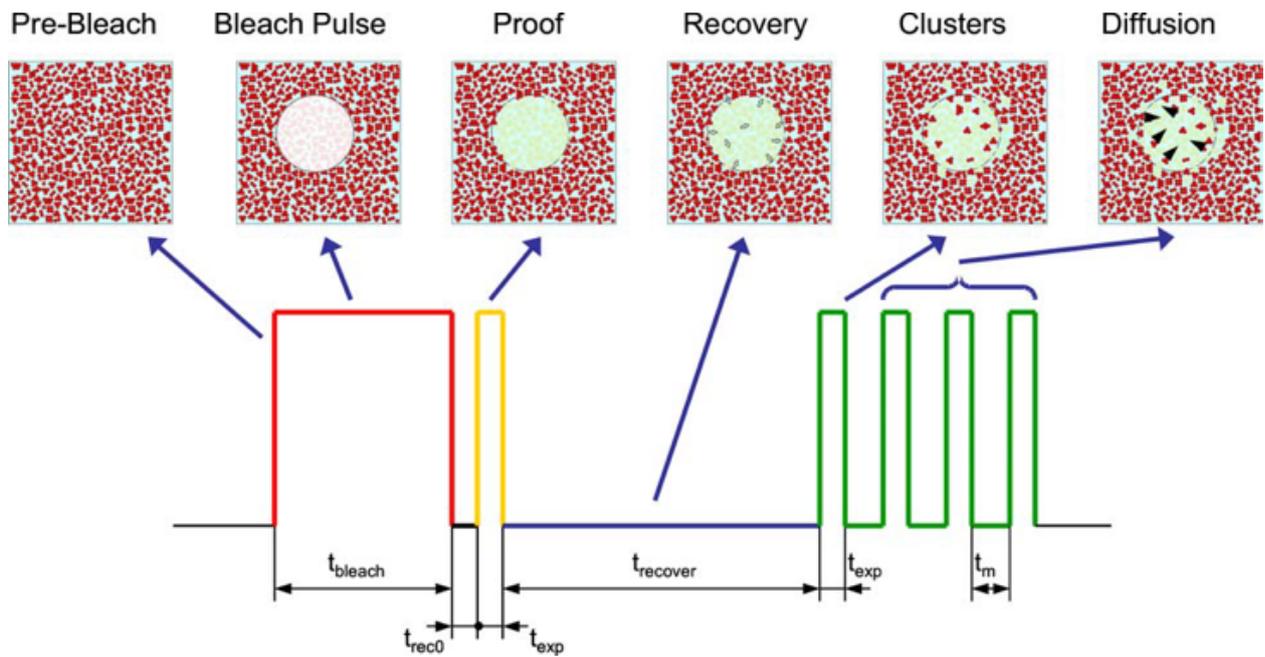


Abbildung 1.13: Gezeigt wird der schematische zeitliche Ablauf eines TOCCSL-Experiments mit den dazugehörigen Laserimpulsen. Das Pre-Bleach Bild zeigt den ungebleichten Bereich der Plasmamembran. Darauf folgt der Bleichpuls (rot) im Zeitintervall t_{bleach} . Mit wenigen Millisekunden Verzögerung (gelb) wird das Proof Bild gemacht, das den vollständig gebleichten Bereich zur Kontrolle zeigt. Während einer passenden Regenerationszeit (blau) können angrenzende, fluoreszierende Moleküle in den gebleichten Bereich diffundieren. Nun werden die einzelnen Bildsequenzen aufgenommen, wobei zur Anregung eine geringere Intensität als zum Bleichen genommen wird. Über eine Anregung mit dem Laser (grün) können Aussagen zur Diffusionskonstante gemacht werden.[17]

Fluorophore nicht zu früh wegzubleichen, wird die Laserintensität stark reduziert und beträgt üblicherweise $1\text{--}2\text{ kW/cm}^2$ (siehe Abbildung 1.13, grüner Bereich). Die Belichtungszeit t_{exp} bewegt sich dabei im Bereich von wenigen Millisekunden. Die Helligkeit der zurückdiffundierten Signale wird mit der Helligkeit von Einzelmolekülen verglichen. [17, 134]

Es können aber auch zwei unterschiedliche Fluorophore verwendet werden, um mögliche Kolo-kalisationen zu erkennen. Dazu werden die Aufnahmen aus den beiden Farbkanälen miteinander verglichen. Mit Hilfe eines speziellen Programms können so mögliche Interaktionen verschiedener, markierter Moleküle beobachtet werden. [135]

2 Problemstellung

In diesem Kapitel wird auf unterschiedliche Fragestellungen zum Thema „Heat-Shock“ eingegangen und mögliche Lösungsvorschläge werden angeführt. Zur Realisierung der einzelnen Experimente wurden modifizierte CHO-Zellen (CHO mGFP-GPI) verwendet, die mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurden. Auf folgende Fragen wurde im Verlauf dieser Arbeit intensiv eingegangen:

Können auf der Plasmamembran von CHO-Zellen bei physiologischen Temperaturen (37°C) Nanoplatattformen nachgewiesen werden und kommt es bereits bei einem milden HS (~41°C) zu beobachtbaren Umstrukturierungen der Zellmembran?

Dafür werden die modifizierten CHO-Zellen in Lab-Tek Kammern ausgesät und mittels einem blauen (488nm) Laser angeregt. Die CHO-Zellen haften an der Glasoberfläche und können so in TIRF (siehe S. 45) betrachtet werden. Durch eine stabile und hohe Expression des GFP-GPI-Moleküls an der Zelloberfläche können zu Beginn keine Einzelmolekülaufnahmen gemacht werden, da die Dichte an der Oberfläche noch zu hoch ist. Mit Hilfe einer speziellen Methode (TOCCSL, siehe S. 48) kann die Dichte der Fluorophore in einem ausgewählten Bereich stark reduziert werden, sodass einzelne Molekülsignale über mehrere Bildsequenzen hinweg aufgezeichnet werden können. Um die Proben während des Versuchsablaufes konstant auf 37°C zu halten, wird um das Mikroskop eine Inkubationsbox angebracht. Zusätzlich wird ein Objektivheizer verwendet, wodurch Temperaturen von bis zu 41°C realisiert werden können. Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)+2% Fetal Calf Serum (FCS) wird als Puffer während der Messung verwendet, um den pH-Wert stabil zu halten. Es werden mehrere Probenkammern untersucht, wobei pro Kammer mehrere Zellen aufgenommen werden, um ausreichend Statistik zu erhalten. Zur Simulation eines milden HS

2 Problemstellung

wird das Setup nun auf 41°C aufgeheizt. Der Puffer wird ebenfalls im Wasserbad auf 41°C erwärmt. Mehrere Probenkammern werden wieder mit TOCCSL untersucht, wobei ebenfalls pro Kammer zwecks ausreichender Statistik mehrere Zellen analysiert werden.

Mittels einer speziellen Analysesoftware (siehe S. 74) kann der Grad der Oligomerisation und die Diffusionskonstante der einzelnen Moleküle auf der Plasmamembran bestimmt werden. Sowohl die Messung bei 37°C als auch bei 41°C werden am selben Tag durchgeführt, um die Ergebnisse relativ miteinander vergleichen zu können.

Wie verläuft der Zerfall und Aufbau von Nanoplattformen auf der Plasmamembran während eines HS von 60 Minuten und ändert sich die Oberflächendichte und Diffusionskonstante der einzelnen Moleküle während des HS?

Um den Zerfall der Oligomere zu beobachten, wird die Inkubationsbox auf 41°C vorgeheizt. Der Puffer (HBSS + 2% FCS) wird adäquat dazu ebenfalls auf 41°C temperiert. Um ausreichend Statistik zu erhalten, werden nacheinander mehrere Lab-Tek Kammern für einen Zeitraum von 60 Minuten untersucht. Dadurch erhält man pro gewählten Zeitpunkt ausreichend Datenpunkte, wodurch ein Zeitverlauf des Zerfalls dargestellt werden kann. Die Messung beginnt, sobald sich die Probe in der Inkubationsbox befindet. Die Daten jeder Lab-Tek Kammer werden hinterher in die jeweiligen Zeitintervalle eingeteilt und gemittelt. Zusätzlich können aus den aufgenommenen Bildern Informationen zur Mobilität und Oberflächendichte der GFP-GPI-Moleküle entnommen werden (siehe S. 74). Als Ausgangswert für den Zerfall der Nanoplattformen, die Oberflächendichte und die Mobilität der Moleküle wird eine separate Messung bei 37°C durchgeführt.

Analog dazu wird das Experiment für den Aufbau der Nanoplattformen durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Lab-Tek Kammern zuerst im Wasserbad einem HS von 41°C für 60 Minuten ausgesetzt sind und anschließend bei 37°C untersucht werden. Die Oberflächendichte und Diffusionskonstante berechnet sich identisch zum vorausgehenden Experiment. Als Ausgangswert für den Aufbau der Nanoplattformen, die Oberflächendichte und die Mobilität

der Moleküle wird eine eigene Messung bei 41°C durchgeführt.

Bewirkt ein Heat-Shock eine intrazelluläre Reaktion und kommt es bei zwei zeitlich versetzten HS-Plateaus zu einer erneuten Reaktion?

Ca^{2+} ist ein wichtiger Botenstoff und innerhalb der Zelle in mehrere Prozesse involviert. Ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels kann in Verbindung mit möglichen Zellprozessen gebracht werden. Dabei kann aber nicht zwingend zwischen den einzelnen Zellprozessen unterschieden werden, sondern nur eine Aussage dahingehend getroffen werden, ob eine intrazelluläre Reaktion der Zelle eintritt oder nicht.

Dazu werden die CHO-Zellen auf Glasplättchen ausgesät und mit FURA-2AM (siehe S. 65) markiert. Um die Zellen möglichst rasch den gewünschten Temperaturen auszusetzen (23–45°C), werden die Proben in ein spezielles Heizelement eingespannt (siehe S. 68). Um Aussagen über eine zeitliche Korrelation des Ca^{2+} -Signals mit dem HS treffen zu können, wird der Verlauf der Temperatur parallel zur Bildaufzeichnung aufgezeichnet.

Vor der Messung wird das von den Zellen nicht aufgenommene FURA-2AM herausgewaschen und anschließend HBSS + 2% FCS als Puffer verwendet. Die Zellen werden dem jeweiligen HS nach ~ 200 Sekunden bei 37°C ausgesetzt.

Um zu überprüfen, ob nach einer gewissen Regenerationszeit nach einem HS erneut ein Ca^{2+} -Signal mithilfe eines weiteren HS generiert werden kann, werden die Zellen bei 37°C mit FURA-2AM markiert. Nach 200 Sekunden werden die Zellen für ~ 200 Sekunden ein erstes Mal einem HS ausgesetzt. Im Anschluss daran reduziert man die Temperatur auf 37°C und induziert nach einer gewissen Regenerationszeit erneut einen HS für ~ 200 Sekunden. Das Ca^{2+} -Signal kann mit Hilfe einer speziellen Software berechnet und analysiert werden (siehe S. 79).

2 Problemstellung

Spielt der saure Sphingomyelinase (aSMase)–Pfad, die Clathrin–abhängige–Endozytose (CAE) oder die Clathrin–unabhängige–Endozytose (CUE) eine Rolle für die Stabilität von Nanoplatzformen von CHO–Zellen bei einem milden Heat–Shock?

Wie in einer aktuellen Studie gezeigt werden konnte, löst die Hinzugabe von oxidierten Phospholipiden bei der Zelle eine Auflösung der vorhandenen Nanoplatzformen aus. Der Anteil an Dimeren reduzierte sich dadurch erheblich. Durch Blockierung der aSMase (siehe S. 63) wird die Reduktion von Nanoplatzformen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran bei 37°C inhibiert.[47]

Wie in Kapitel 3 bereits erwähnt, kann auch eine teilweise Blockierung der Endozytose zu einer möglichen Umstrukturierung der Plasmamembran führen. Dies könnte ebenfalls ein Mechanismus sein, wodurch der Zerfall der Nanoplatzformen während eines HS erklärbar wäre.

Nun will man untersuchen, ob die Auflösung der Nanoplatzformen durch einen HS ebenfalls an eine aSMase–Aktivität gebunden oder ein Effekt von Endozytose ist und durch Inhibierung unterdrückt werden kann. Dazu wird in einem ersten Experiment der zeitliche Verlauf der Dichte der GFP–GPI–Moleküle der gesamten Zelle bei 37°C und bei 40°C untersucht, um negative Auswirkungen auf die GFP–GPI–Synthese ausschließen zu können. Pro Temperatur werden 3 Lab–Tek Kammern benötigt. Die erste Kammer dient als Kontrolle, bei der nächsten wird der Sphingomyelin–Abbau blockiert und bei der letzten Kammer wird die CAE und die CUE unterdrückt (siehe S. 64).

Ist die Dichte ausreichend hoch, betrachtet man bei identischer Vorgehensweise wie beim Experiment zuvor die Dichte der GFP–GPI–Moleküle an der extrazellulären Seite der Plasmamembran. Hier werden pro Szenario 2 Zellkammern benötigt. Mittels TIRF (siehe S. 45) werden die Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtet. In einem nächsten Schritt wird der Anteil an Oligomeren bei 40°C ermittelt. Dazu werden Lab–Tek Kammern entweder mit dem aSMase–Inhibitor Nb19 oder dem Endozytose–Inhibitor Pitstop2 beladen. Nachdem die Inkubationsbox aufgeheizt ist, wird mittels TOCCSL der Grad und der Anteil an Oligomeren ermittelt. Pro Kammer werden mehrere Zellen untersucht. Die Daten werden analog zu den vorausgehenden TOCCSL–Experimenten ausgewertet.

Hat eine Blockierung des sauren Sphingomyelinase-Pfades Auswirkungen auf ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal während eines Heat-Shocks?

Zur Messung des Ca^{2+} -Signals wird analog zu S. 55 vorgegangen. Die Glasplättchen mit den darauf haftenden Zellen werden wieder in die *BioCellTM* eingespannt und mit FURA-2AM markiert. Anschließend wird den Zellen ein aSMase-Inhibitor hinzugegeben. Ausgehend von 23°C werden die Zellen nach ~200s auf 37°C aufgewärmt. Parallel zum Ca^{2+} -Signal wird wieder die Temperaturkurve aufgezeichnet. Dies wird mit mehreren Glasplättchen wiederholt. Als Nächstes wird die gleiche Menge an Glasplättchen ausgehend von 23°C nach ~200s einem milden HS von 41°C ausgesetzt.

Die beiden Ca^{2+} -Signale können mit Hilfe einer speziellen Software miteinander verglichen werden (siehe S. 79). Zusätzlich können die Daten mit denen von unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen aus vorausgehenden Experimenten verglichen werden.

Wird durch Hinzugabe von oxidierten Phospholipiden ein Ca^{2+} -Signal generiert und kann dieses durch Blockierung der aSMase unterdrückt werden?

Die Zellen werden analog zur vorausgehenden Fragestellung untersucht. Für jede Ca^{2+} -Messung wird ein eigenes Glasplättchen verwendet. Zu Beginn wird das Ca^{2+} -Signal von unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen analysiert. Ausgehend von 23°C werden die Zellen nach ~200s auf 37°C erhitzt. Bei der nächsten Messung wird nach ~200s von 23°C auf 37°C erhöht. Sobald ~37°C erreicht sind, werden den Zellen oxidierte Phospholipide hinzugegeben. Durch den apoptotischen Effekt von oxidierten Phospholipiden [47] sollte ein starkes Ca^{2+} -Signal generiert werden können.

In einem nächsten Versuch wird Zellen ein aSMase-Inhibitor hinzugegeben. Die Messung wird bei 23°C gestartet und nach ~200s auf 37°C erhöht. Sobald die 37°C erreicht sind, werden wieder die oxidierten Phospholipide hinzugefügt. Da durch die Blockierung der aSMase die apoptotische Wirkung von oxidierten Phospholipiden unterdrückt wird [103], stellt sich dennoch die Frage, ob dies

2 Problemstellung

auch für die Generation eines Ca^{2+} -Signals gilt. Hier soll untersucht werden, ob ein geringeres Ca^{2+} -Signal als im Experiment ohne Deaktivierung der aSMase zu beobachten ist.

Besteht ein Zusammenhang bezüglich der Stabilität von Nanoplattformen auf der extrazellulären Seite der Zellmembran und dem darunterliegenden Zytoskelett?

In aktuellen Studien wird der Zusammenhang zwischen Nanoplattformen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran und dem darunterliegenden Zytoskelett diskutiert. Aktin wird dabei eine wichtige Rolle zugeteilt. [24] Laut eines Modellsystems wird eine Kopplung von Aktin an Membranproteine vermutet, wodurch deren Interaktion beeinflusst werden könnte und so die Existenz von Nanoplattformen erklärbar wäre.[23]

Um die Abhängigkeit der Nanoplattformen auf der äußeren Plasmamembran von Aktin zu untersuchen, werden CHO mGFP-GPI Zellen in Lab-Tek Kammern ausgesät. Um die Polymerisation des Aktins zu unterbinden, wird Latrunculin B hinzugegeben. Die Inkubationsbox wird auf 37°C temperiert. Anschließend werden die Zellen in TIRF mittels TOCCSL analog zu den vorausgehenden Experimenten analysiert (siehe S. 53). Als Kontrolle wird das Experiment mit unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen wiederholt, um einen relativen Vergleich zu erhalten.

Sollte Aktin einen Einfluss auf die Stabilität der Nanoplattformen haben, wird durch die Unterbindung der Polymerisation des Aktins mit einem Zerfall der Nanoplattformen gerechnet.

Wie verändert sich das FRET-Signal bei CHO SNAP-GPI Zellen während eines milden Heat-Shocks und korreliert der Verlauf des Signals mit der Stabilität der Nanoplattformen von CHO mGFP-GPI Zellen?

FRET entsteht, wenn sich zwei unterschiedliche Fluorophore mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren (Donor – Akzeptor) innerhalb weniger Nanometer (1–10nm) voneinander entfernt befinden (siehe S. 46). Da mit Hilfe einer FRET-Bulkmessung schneller Daten generiert werden können als mit

TOCCSL, ist der Grundgedanke dieses Experiments, sich die ersten Minuten bei einem HS anzusehen.

Dazu markiert man CHO SNAP-GPI Zellen mit zwei geeigneten Fluorophoren (siehe S. 64). Die Inkubationsbox wird auf 41°C aufgeheizt. Um den prozentuellen Anteil an FRET-Signalen zu ermitteln, werden die Fluorophore auf der Zellmembran mehrerer Zellen mit zwei unterschiedlichen Lasern (siehe S. 71) angeregt. Damit man einen zeitlichen Verlauf darstellen kann, müssen mehrere Probenkammern verwendet werden, um ausreichend Statistik zu erhalten. Aus den Helligkeitswerten der Aufnahmen der einzelnen Zellen vor und nach dem Bleichimpuls kann auf den prozentuellen Anteil des FRET-Signals geschlossen werden.

Korreliert der Verlauf des FRET-Signals mit der Zerfallskurve der Nanoplattformen von CHO mGFP-GPI Zellen aus den vorausgehenden Experimenten, wird eine Abnahme des FRET-Signals oder zumindest ein gleichbleibendes Signal erwartet.

3 Materialien & Methoden

1 Zellkultur und Probenpräparation

1.1 CHO mGFP–GPI

CHO–Zellen wurden mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP)–GPI Plasmid (pJB20; Jennifer Lippincott–Schwartz, National Institutes of Health, Bethesda, MD) transfiziert, sodass es zu einer stabilen Expression auf der Plasmamembran kam. GFP emittiert grünes Licht unter optischer Anregung. Dabei besitzt es Anregungsmaxima im blauen und UV–Bereich. Eine Mutation des GFP–Moleküls an seiner Aminosäure (AS)–Position 206, zwischen Alanin und Lysin, führt zur Synthese von monomerischem GFP (mGFP).

Fixiert wird das fluoreszierende Protein mittels eines GPI–Ankers an der Membranoberfläche. Die Synthese von GPI findet im ER statt und wird über den COP2–Transportweg (engl. coat protein complex 2) an seinen vorgesehenen Platz gebracht. [136] Hauptaufgabe des GPI ist es, Glycoproteine an die Plasmamembran zu binden. GPI kommt vorzugsweise auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran vor und verstärkt somit die Asymmetrie der beiden Lipidschichten. [137]

Die CHO–Zellen (ATTC CCL-61) wurden in Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)/HAMS-F12 (PAA-Laboratories, Pasching, Österreich) gezüchtet, dem 10% FCS (F7524; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Neomycin (G418, P11-012; PAA-Laboratories, Linz, Österreich) und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin (17-602E; Lonza) hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und einer CO₂ Konzentration von 5% aufbewahrt.

1.2 CHO SNAP

CHO-Zellen wurden mit einem speziellen Plasmid (*pSNAP_f - GPI*; New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) transfiziert. Dadurch kam es zu einer stabilen Expression von SNAP-GPI Molekülen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran.

Beim SNAP-tag handelt es sich um eine besondere Art der Proteinmarkierung. An das gewünschte Molekül wird das sogenannte SNAP-Protein kovalent gebunden. Das ca. 20kD große Molekül bietet für unterschiedliche Farbstoffe Bindestellen an, bindet jedoch selbst durch einen daran geklonten GPI-Anker nur sehr spezifisch an Moleküle. Das Binden der Fluorophore hat keine Auswirkung auf deren Absorptions- und Emissionsspektrum. Hier wurde der GPI-Anker mit dem SNAP-tag versehen. Das SNAP-Protein zeigt dabei in den extrazellulären Raum.

Die CHO-SNAP-Zellen wurden in DMEM/HAMS-F12 (PAA-Laboratories, Pasching, Österreich) gezüchtet, dem 10% FCS (F7524; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin (17-602E; Lonza) hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und einer CO₂ Konzentration von 5% aufbewahrt.

1.3 Probenpräparation

1.3.1 CHO mGFP-GPI-Messungen

Für sämtliche Messungen wurde eine Konfluenz der Zellen von 70-80% vorausgesetzt. Die bei 37°C gelagerten CHO-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen abgelöst und erneut ausgesät. Bevor mit der Probenpräparation begonnen wurde, wurden sämtliche Reagenzien im Wasserbad auf Zimmertemperatur ($\geq 23^{\circ}\text{C}$) vorgewärmt und anschließend in der Sterilkammer bereitgestellt.

Das Medium wird nun aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die mit Zellen übersäte Oberfläche mit $\sim 2\text{ml}$ phosphatgepufferter Salzlösung gespült. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) absaugen und $800\mu\text{l}$ Accutase¹ (00-4555-6; eBioscience, San Diego, CA) hinzugeben. Das Enzym ~ 5 Minuten im Inkubator

¹Das Enzym Accutase löst Zellen von normalen oder präparierten Plastikoberflächen.

1 Zellkultur und Probenpräparation

einwirken lassen. Als Nächstes mit Hilfe von 2ml Zellmedium (DMEM+10% FCS+P/S+G418) die Accutase deaktivieren. Die gesamte Zelllösung in eine Falcon-Tube geben. Die Zellkulturoberfläche noch einmal mit $\sim 2ml$ Medium spülen und die Lösung ebenfalls in die Falcon-Tube geben.

In einer Zentrifuge bei 300G für 3 Minuten die Zellen absetzen lassen. Anschließend die gesamte Flüssigkeit inklusive des Zellpellets am Boden der Tube absaugen. 1ml Medium hinzugeben und gut durchmischen, sodass die Zellen möglichst homogen in der Lösung verteilt sind. Einen Teil der Lösung in die Zellkulturflasche gemeinsam mit $\sim 10ml$ Medium wieder aussäen und im Inkubator lagern.

Für die Messungen wurden Deckgläser (#1.5, BB024060SC; Menzel, Braunschweig, Germany) mit Hilfe eines zwei-komponentigen Dentalklebers (13001001; Picodent, Germany) auf Lab-Tek Kammern (Fisher Scientific, Wien, Österreich) mit jeweils 8 Probenflächen geklebt. Zwei unterschiedliche Zellkonzentrationen ($2\mu l$, $4\mu l$) kamen bei den Messungen zum Einsatz, wobei 20% zu den einzelnen Konzentrationen hinzugerechnet wurden, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen. Beide Konzentrationen wurden mit je $300\mu l$ Medium versehen und auf der Probenoberfläche gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden 24 Stunden im Inkubator gelagert. Am Tag der Messung wurde das Medium in den Kammern durch eine Messlösung ersetzt. Dabei wurde HBSS (BE10-527F; Lonza) + 2% FCS verwendet.

Für Messungen zur Oberflächendichte wurde ein GFP-Booster (Atto647N, 1mg/ml, ChromoTek, Deutschland) verwendet. Der Booster wurde mit HBSS + 2% FCS 1 : 1.000 verdünnt. Die Zellen wurden dabei für 5–10 Minuten mit dem Booster inkubiert.

1.3.2 aSMase-Inhibitor-Messungen

Die Zellen werden völlig analog wie in Abschnitt 1.3.1 präpariert. Am Tag der Messung wird das Medium aus den zu untersuchenden Kammern entnommen und mit $250\mu l$ HBSS gespült. Anschließend werden $250\mu l$ des aSMase-Inhibitors *Nb19* (9-(3-(4-[2-(4-methoxy-phenyl)-ethyl]-3,5-dimethyl-piperazine-1-yl-propyl)-9H-carbazol) hinzugegeben. Für sämtliche Experimente wurde eine Konzentra-

3 Materialien & Methoden

tion von $5\mu\text{M}$ oder $10\mu\text{M}$ verwendet. Nb19 wurde mit HBSS verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von ~ 30 Minuten kann die Lösung entfernt werden und durch $250\mu\text{l}$ des Messpuffers (HBSS + 2% FCS) ersetzt werden.

Für Messungen zur Oberflächendichte wurde ein GFP-Booster (siehe S. 63) verwendet.

1.3.3 Endozytose-Inhibitor-Messungen

Die Zellen werden völlig analog wie in Abschnitt 1.3.1 präpariert. Am Tag der Messung wird das Medium aus den zu untersuchenden Kammern entnommen und mit $250\mu\text{l}$ HBSS gespült. Anschließend werden $250\mu\text{l}$ des Toxins *Pitstop 2* hinzugegeben. Für sämtliche Experimente wurde eine Konzentration zwischen $15\text{--}30\mu\text{M}$ verwendet. Pitstop 2 wurde mit HBSS verdünnt. Die Inkubationszeit betrug $5\text{--}10$ Minuten. Als Messpuffer wurden $250\mu\text{l}$ Aktin HBSS + 2% FCS verwendet.

1.3.4 Aktin-Messungen

Die Zellen werden völlig analog wie in Abschnitt 1.3.1 präpariert. Um die Polymerisation von Aktin zu Mikrofilamenten zu verhindern, wird das Toxin *Latrunculin B* hinzugegeben. Durch die starke, toxische Wirkung wird eine Konzentration von lediglich 50nM verwendet. Konzentrationen ab 500nM bewirken ein Absterben der Zellen. Latrunculin B wird mit HBSS + 2% FCS verdünnt. In jede Probenkammer werden $200\mu\text{l}$ des Gemisches gegeben.

Nach einer Einwirkzeit von ~ 15 Minuten kann mit der Messung begonnen werden. Während der Messung verbleibt das Toxin in den Messkammern.

1.3.5 FRET-Messungen

Bei den Zellen für die FRET-Messungen handelt es sich um CHO-SNAP Zellen. Die Probenvorbereitung der Zellen ist jedoch identisch wie in Abschnitt 1.3.1, einziger Unterschied ist, dass das Medium nicht das Antibiotikum G418 enthält. Bei den FRET-Messungen wurden $4\mu\text{l}$ der Zelllösung verwendet.

1 Zellkultur und Probenpräparation

Für das FRET-Labeling wurden SNAP-AF647, 200nM (SNAP-Surface[®] Alexa Fluor[®] 647, 50nmol, New England Biolabs Inc., USA) und SNAP-Dy549, 250nM (SNAP-Surface[®] 594, 50nmol, New England Biolabs Inc., USA) verwendet. Dazu wurden 50 μ l von AF647 und 40 μ l Dy549 mit 110 μ l DMEM+10% FCS+P/S vermischt. Das Medium wird aus der Messkammer abgesaugt und mit HBSS + 2% FCS gespült. 150 μ l des fertigen Gemisches werden nun in die Messkammer gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten kann das Gemisch abgesaugt werden und mit HBSS + 2% FCS gespült werden. Als Messpuffer werden 300 μ l HBSS + 2% FCS verwendet. Pro SNAP-Molekül kann nur ein Fluorophor binden.

1.3.6 Ca^{2+} -Messungen

Die Zelllösung wird völlig analog wie in Abschnitt 1.3.1 hergestellt. Anstelle der Lab-Tek Kammern verwendet man für die Ca^{2+} -Messungen Glasplättchen (\varnothing 24mm), da diese in der *BioCell*TM fixiert werden konnten. Die Plättchen wurden zuvor in 70% Ethanol steril gewaschen. Die Reste des Ethanols wurden anschließend mit PBS weggespült. Die Glasplättchen wurden in passende Petrischalen (\varnothing 35mm) gelegt. Da es sich dabei um eine größere Oberfläche als bei den Lab-Tek Kammern handelt, muss die Konzentration der Zelllösung dementsprechend angepasst werden. Der Umrechnungsfaktor auf die größeren Kammern ist 1 : 14.

Für die Experimente wurden unterschiedliche Konzentrationen (14–110 μ l) verwendet. Die gewünschte Zelllösung wurde in 2ml Medium (DMEM+10% FCS+P/S+G418) in die Kammer ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnten die Glasplättchen verwendet werden.

Am Tag der Messung wird jedes einzelne Glasplättchen nacheinander in die passende Vorrichtung der *BioCell*TM eingespannt. Die Zelloberfläche wird einmal mit HBSS + 2% FCS gespült. Danach werden 200 μ l Fura-2AM² (10 μ M) hinzugegeben. Auf einer Rüttelplatte lässt man den Farbstoff 30 Minuten einwir-

²Fura-2 ist ein Farbstoff, der mit Ca^{2+} interagieren kann. Durch das Binden von Acetoxymethylester (AM) kann der Komplex in die Membran eindringen. Intrazellulär wird AM abgespalten und Fura-2 aktiviert. Durch Anregung mit Schwarzlicht (340nm, 380nm) kann Ca^{2+} -gebundenes Fura und freies Fura angeregt werden.

3 Materialien & Methoden

ken. Anschließend wird die Lösung abgesaugt und mit HBSS + 2% FCS gespült. Als Messpuffer wird 400 μ l HBSS + 2% FCS verwendet. Während der gesamten Präparationszeit wird die Probe konstant entweder auf Raumtemperatur ($\geq 23^{\circ}\text{C}$) oder 37°C gehalten.

Die Auswirkungen der aSMase Blockierung werden unter anderem bei den Experimenten 1 und 2 (siehe S. 74) analysiert. Zusätzlich wird bei Experiment 1 zuerst die alleinige Wirkung von oxidierten Phospholipiden, POVPC³ (870606P; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), und im Anschluss die kombinierte Wirkung von oxidierten Phospholipiden und einer aSMase Inhibierung untersucht. Für Nb19 wurde eine Konzentration von 10 μ M bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt. 200 μ l des Nb19-Gemisches wurden nach der Markierung mit Fura-2AM hinzugegeben. Das Nb19-Gemisch kann als Messpuffer verwendet werden.

Will man die kombinierte Wirkung von Nb19 und POVPC beobachten, lässt man die Probe auf 37°C erwärmen. Nachdem bei der Messung 37°C konstant erreicht sind, wird der Messpuffer abgesaugt, das POVPC-Gemisch (20 μ M) zum abgesaugten Messpuffer hinzugegeben und die gesamte Lösung erneut auf die Probe gegeben. Analog untersucht man die alleinige Wirkung von POVPC, ohne die Probe zusätzlich mit Nb19 zu präparieren.

³1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

2 Versuchsaufbau

Sämtliche Messungen wurden an den folgenden beiden Setups durchgeführt. Am SDT 1 wurden Einzelmolekülmessungen und FRET-Messungen durchgeführt. Mit Hilfe des SDT 3 wurden Ca^{2+} -Messungen durchgeführt.

2.1 SDT 1

Mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200 Mikroskops, ausgerüstet mit einem 100x, $NA = 1,46$ Objektiv (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), wurden Zellen in TIRF durch einen 488nm Halbleiterlaser (Sapphire; Kohärent, Santa Clara, CA) angeregt. Für FRET-Messungen konnten zusätzlich noch ein grüner, 532 nm Laser (Millennia X, Spectra Physics, Santa Clara, USA) und ein roter, 647nm Krypton Ionenlaser (Innova 300, Coherent, Santa Clara, USA) in Betrieb genommen werden. Die Intensität auf der Probenoberfläche bewegte sich dabei im Bereich von $2 - 10 kW/cm^2$. Zur Flächenbegrenzung des Lasers wurde eine Blende (Thorlabs, Newton, NJ) mit einer Öffnung von $\sim 7 \mu m$ in der Objektebene verwendet. Zur Modulation des Strahls befindet sich ein Akustooptischer Modulator (AOM) (Isomet, Springfield, VA) im Strahlengang.

Versuchsprotokolle wurden generiert und kontrolliert mit Hilfe eines selbst geschriebenen Programmes (Technische Universität Wien, Institut für angewandte Physik, Arbeitsgruppe Biophysik), das in LabVIEW (National Instruments, Austin, TX) implementiert wurde.

Durch Wahl geeigneter Filter (Interferenzfilter: ZT488/640rpc, 2mm, Chroma, Bellows Falls, VT; Emissionsfilter: FF01-538/685-25, Semrock, Rochester, NY) konnten Fluoreszenzbilder aufgenommen werden. Dazu benötigte man eine stickstoffgekühlte CCD-Kamera (Roper Scientific Micro Max, 1300-PB; PI Acton, Trenton, NJ). Die CCD-Kamera wurde dafür auf $-110^\circ C$ gekühlt, um thermisches Rauschen zu reduzieren.

Für FRET-Messungen oder Oberflächenmessungen wurde eine Andor IXon Ultra verwendet. Diese Kamera wurde bei $-60^\circ C$ betrieben, um thermisches Rauschen zu reduzieren. Für Dichtemessungen wurde ein 40x, $NA = 0,65$ Objektiv (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

3 Materialien & Methoden

Die Temperatur konnte durch eine selbst gebaute Inkubationsbox (Technische Universität Wien, Institut für angewandte Physik, Arbeitsgruppe Biophysik), ausgerüstet mit einem Objektivheizer (PeCon, Erbach, Deutschland) und einem weiteren Heizelement, reguliert werden. Temperaturen bis zu 41°C konnten damit realisiert werden.

2.2 SDT 3

Die mit Fura-2AM beladenen CHO mGFP-GPI Zellen wurden mit Hilfe einer monochromatischen Lichtquelle, dem Polychrome V (TILL Photonics-FEI München, Gräfelfing, Deutschland), angeregt. Das UV-Licht wurde mit Hilfe eines TILL Systems, bestehend aus einer Polytrope / Yanus Kombination von TILL Photonics an ein Zeiss Axiovert 200M Mikroskop gekoppelt. Zur Visualisierung der markierten Zellen wurde ein UPlanFN 10x Luftobjektiv (Olympus, Tokio, Japan) verwendet. Zusätzlich wurde das Bild mit einer 1,6x Linse vergrößert, was zu einer Gesamtvergrößerung von 16x führte.

HS-Experimente konnten mit einer temperaturkontrollierten Perfusionskammer (*BioCellTM*, JPK-Instruments, Berlin, Deutschland) durchgeführt werden. Temperaturen im Bereich von -15°C bis 60°C, mit einer Auflösung von 0,1°C, konnten damit realisiert werden.

Die Bilder wurden mit einer Andor IXon+ aufgenommen. Die Kamera wurde bei -60°C betrieben, um thermisches Rauschen zu reduzieren. Zur Bildaufnahme und Adjustierung des Versuchsprotokolls wurde Live Acquisition 5 (TILL Photonics-FEI München, Gräfelfing, Deutschland) verwendet.

3 Bildaufzeichnung

Für sämtliche Messungen wurden die nachfolgenden Protokolle verwendet. In Abhängigkeit vom Experiment bzw. von der Qualität der einzelnen Zellen wurden Parameter im Rahmen der angegebenen Grenzen adaptiert.

3.1 CHO mGFP–GPI–Messungen

Die Zellen wurden in TIRF betrachtet und mit Hilfe von TOCCSL konnten Einzelmolekülsignale aufgenommen werden. Die GFP–Moleküle wurden mit einem blauen Laser (488nm) angeregt. Zur Bildaufzeichnung wurde die Roper–Kamera verwendet. Folgendes Messprotokoll wurde für sämtliche Einzelmolekülmessungen verwendet.

Tabelle 3.1: Messprotokoll CHO mGFP–GPI

N macro = 5 ; 10	Delay macro = 6 – 8s
t delay prebleach = 50ms	t bleach = 500ms
N mini = 18	Delay mini = 18ms
t illumination = 2ms	t recovery = 500ms , 1000ms , 1500ms , 2000ms
Power = 1,5 – 2 kW/cm ²	

Zu Beginn einer jeden Messserie wurde von jeder Zelle eine Aufnahme mit 3 Macros gemacht, wobei die erste und letzte Serie in TIRF und die zweite Serie ohne TIRF gemacht wurde. Dabei unterteilt sich jedes Macro in 18 Minis, an denen der zeitliche Verlauf der Molekülbewegungen zu erkennen ist. Die Regenerationszeit nach dem Bleichpuls betrug dabei nur 1ms. Anschließend wurden Aufnahmen mit einer weitaus höheren Regenerationszeit gemacht (siehe Tabelle 3.1).

Zur Ermittlung des Dimer–Abbaus in CHO mGFP–GPI Zellen wurden 5 Lab–Tek Kammern über einen Zeitraum von 60 Minuten einem Heat–Shock von 41°C ausgesetzt. Pro Zeitpunkt wurde pro Kammer nur eine Zelle verwendet. Um die Zeitskala des Dimer–Aufbaus zu bestimmen, wurden ebenfalls 5 Lab–Tek Kammern leicht zeitversetzt für 60 Minuten in einem Wasserbad einem HS von 41°C ausgesetzt. Für jeden Zeitpunkt wurde pro Kammer eine Zelle verwendet.

3 Materialien & Methoden

Die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde identisch zum Dimer-Zerfall zu jedem Zeitpunkt genau eine Zelle gemessen.

Um die Auswirkungen des HS auf die Dichte der gesamten GFP-GPI-Moleküle der Zelle zu beurteilen, wurden mehrere Zellen (≥ 15) mit Hilfe der Andor-Kamera mit einem 40x, $NA = 0,65$ Luftobjektiv untersucht. Dazu wurde folgendes Messprotokoll verwendet.

Tabelle 3.2: Messprotokoll GFP-GPI-Dichte

N macro = 100	Delay macro = 495ms
Elektronen-Multiplier (EM) = aktiv	EM-Gain = 300
N mini = 0	t illumination = 5ms
Power = 1,5 – 2 kW/cm ²	

Mit Hilfe eines elektrischen Probenstisches wurde die Probe während der gesamten Aufnahme abgefahren, um ausreichend Zellen analysieren zu können. Die einzelnen Aufnahmen wurden dabei für die Auswertung in 30 Minuten Zeitintervalle eingeteilt, um einen späteren Zeitverlauf darstellen zu können.

Zur Messung des zeitlichen Verlaufs der Oberflächendichte der GFP-GPI-Moleküle wurden die Zellen mit einer Andor-Kamera bei hundertfacher Vergrößerung in TIRF untersucht. Dazu wurden mehrere Zellen (≥ 6) über einen Zeitraum von 45 Minuten untersucht, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellen während der Aufnahmen nicht zu stark gebleicht wurden.

Tabelle 3.3: Messprotokoll GFP-GPI-Oberflächendichte

Loop = 1	t illumination = 5ms
EM = aktiv	EM-Gain = 300
Laser (647nm)	Power = 1 kW/cm ²

3.2 aSMase-Inhibitor-Messungen

Die Zellen wurden unter TIRF mit einem blauen Laser (488nm) angeregt. Für die Einzelmolekülmessungen (TOCCSL) wurde dasselbe Messprotokoll wie in

Abschnitt 3.1 verwendet. Dabei wurde jedoch nur auf den absoluten Dimer-Anteil bei den unterschiedlichen Temperaturen Wert gelegt. Die Auswirkungen einer aSMase Blockierung wurden sowohl bei 37°C als auch bei 40°C analysiert.

Um die Auswirkungen des HS auf die Dichte der gesamten GFP-GPI-Moleküle der Zelle zu beurteilen, wurden mehrere Zellen (≥ 15) mit Hilfe der Andor-Kamera untersucht. Dazu wurde dasselbe Messprotokoll wie auf Seite 70 verwendet. Der Versuchsablauf verlief identisch dazu.

Zur Messung des zeitlichen Verlaufs der Oberflächendichte der GFP-GPI-Moleküle wurde identisch wie auf Seite 70 vorgegangen. Es wurde dasselbe Messprotokoll wie bei unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen verwendet.

3.3 Endozytose-Inhibitor-Messungen

Zur Messung der Auswirkungen auf die Dichte der gesamten GFP-GPI-Moleküle der Zelle durch den CAE- und CUE-Inhibitor Pitstop 2 wurden analog zu Abschnitt 3.2 mehrere Zellen (≥ 15) untersucht. Dazu wurde dasselbe Messprotokoll wie in Tabelle 3.2 verwendet. Mit Hilfe eines elektrischen Probenstisches wurde die Probe während der gesamten Aufnahme abgefahren. Die einzelnen Aufnahmen wurden dabei für die spätere Auswertung in 30 Minuten Zeitintervalle eingeteilt, um einen Zeitverlauf darstellen zu können.

Um die Auswirkungen des HS auf die Dichte der gesamten GFP-GPI-Moleküle der Zelle zu beurteilen, wurden mehrere Zellen (≥ 15) mit Hilfe der Andor-Kamera untersucht. Dazu wurde dasselbe Messprotokoll wie auf Seite 70 verwendet. Der Versuchsablauf verlief identisch dazu.

Zur Messung des zeitlichen Verlaufs der Oberflächendichte der GFP-GPI-Moleküle wurden identisch wie auf Seite 70 vorgegangen. Es wurde dasselbe Messprotokoll wie bei unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen verwendet.

3.4 FRET-Messungen

Für die FRET-Messungen wurden mehrere Zellen (≥ 20) analysiert. Die Probe wurde mit Hilfe eines elektrischen Probenstisches abgefahren. Mit Hilfe des grünen Lasers (532nm) konnten die einzelnen Zellen ausgewählt werden. Dafür

3 Materialien & Methoden

wurde eine geringe Intensität verwendet ($\leq 1\text{ kW/cm}^2$), um ein Bleichen möglichst zu verhindern. Für die Aufnahmen wurde anstelle des grünen Lasers ein blauer Laser verwendet, da dieser eine höhere Stabilität aufwies. Anschließend wurden die Zellen mit blauem (488nm) und rotem (647nm) Licht angeregt, wobei die einzelnen Farbkanäle in ein linkes (Dy549) und rechtes (A647) Bild aufgeteilt wurden. Pro Aufnahme wurden 6 Bilder gemacht, wobei das dritte und fünfte Bild für die Auswertung relevant sind.

Die unterschiedlichen Anregungen werden in Tabelle 3.4 dargestellt. Beim ersten und vierten Bild handelt es sich um ein Kontrollbild, ein sogenanntes „Dummy Bild“. Hier ist weder im grünen noch im roten Kanal ein Signal zu erkennen. Im zweiten Bild wird die Zelle mit dem roten Laser angeregt, im dritten Bild mit dem blauen Laser. Im fünften Bild wird nur der blaue Laser verwendet. Als Abschluss kommt der rote Laser noch einmal zum Einsatz.

Tabelle 3.4: Aufnahme FRET: CHO SNAP + AF647 / D549

1.Bild:	Dummy Bild	
2.Bild:		Rot
3.Bild:		Blau
4.Bild:	Dummy Bild	
5.Bild:		Blau
6.Bild:		Rot

Für die Aufnahmen wurde folgendes Messprotokoll verwendet.

Tabelle 3.5: Messprotokoll FRET: CHO SNAP + AF647 / D549

N macro = 1	Delay macro = 95ms
EM = aktiv	EM-Gain = 300
N micro = 6	t illumination = 0ms
Power = 1,5 – 2 kW/cm^2	

Da durch die Anregung ein Teil der Fluorophore wegbleicht wird, muss man einen Korrekturfaktor in die Berechnung des FRET-Signals einbeziehen. Zur Berechnung dieses Bleichfaktors (siehe Gleichung 3.5) werden zusätzliche

Aufnahmen von Zellen (≥ 15) benötigt. Der rote Laser wurde dazu vollkommen abgeschaltet.

3.5 Aktin–Messungen

Für die Einzelmolekülmessungen (TOCCSL) wurde dasselbe Messprotokoll wie in Abschnitt 3.1 verwendet. Dabei wurde jedoch nur auf den absoluten Dimer–Anteil Wert gelegt. Die Zellen wurden unter TIRF betrachtet und mit blauem Laserlicht (488nm) angeregt. Die Auswirkungen von Latrunculin B wurden anhand mehrerer Zellen (≥ 6) bei einer Temperatur von 37°C analysiert.

3.6 Ca^{2+} –Messungen

Für die Ca^{2+} –Messungen wurde ein bestimmter Bereich der Probenoberfläche ausgewählt. Dieser Bereich wurde während der Aufnahme nicht variiert. Mit Hilfe von Live Acquisition 5 kann das Messprotokoll adjustiert werden. Folgendes Messprotokoll wurde für sämtliche Ca^{2+} –Messungen verwendet.

Tabelle 3.6: Messprotokoll Ca^{2+} –Messungen

	340nm	380nm
Exposure	50ms	10ms
Cycle	104	896
Loop count	1000	1000
Delay	0ms	
Total cycle	1000	
EM–Gain	200–300	
Intensität	90%	

Die Messungen wurden bei Temperaturen zwischen 23°C–45°C durchgeführt. Dabei wurde der Anstieg des Ca^{2+} –Signals unter verschiedenen Bedingungen betrachtet. In Tabelle 3.7 werden die 6 verschiedenen Experimente dazu gezeigt.

Bei Experiment 1, 2 wird die Temperatur schrittweise erhöht. Bei Experiment 3–5 werden zwei HS–Plateaus simuliert, wobei die erste Zeitdauer von 37°C vor dem ersten HS ist, danach folgt der erste HS, gefolgt von einer Erholungsphase bei 37°C (zweite Zeitdauer). Abschließend kommt der zweite HS, gefolgt von

3 Materialien & Methoden

Tabelle 3.7: Heat-Shock bei Ca^{2+} -Messungen

	23°C	37°C	41°C	45°C
Experiment 1:	200s	800s		
Experiment 2:	200s		800s	
Experiment 3:		100s / 200s / 100s	100s / 100s	
Experiment 4:		100s / 400s / 100s	100s / 100s	
Experiment 5:		100s / 400s / 100s	100s	100s

einer weiteren Erholungsphase bei 37°C (dritte Zeitdauer). Bei Experiment 5 werden die Zellen zuerst 41°C und danach 45°C ausgesetzt. Der Temperaturan- und -abstieg erfolgt bei allen Experimenten gleichmäßig über ein Zeitintervall von 30–50 Sekunden.

4 Bildanalyse

4.1 Einzelmolekülmessungen

Zur Auswertung der aufgenommenen Bildsequenzen wurden Algorithmen, die in ein mit MATLAB ((The MathWorks, Natick, MA) selbstgeschriebenes Programm (Technische Universität Wien, Institut für angewandte Physik, Arbeitsgruppe Biophysik) implementiert wurden, verwendet. Damit konnten einzelne Moleküle detektiert und quantifiziert werden.

Um die Stöchiometrie der Markierung zu erhalten, wird für die Auswertung das erste Bild nach abgelaufener Regenerationszeit des davor induzierten Bleichpulses verwendet. Eine zweidimensionale Gaußkurve wird durch die jeweiligen Datenpunkte gefittet. Das Integral der Gaußkurve ist repräsentativ für die Helligkeit der Moleküle. Zusätzlich wird die Position der Punkte, die maximale Breite bei der Hälfte des Intensitätsmaximums, die Standardabweichung und der lokale Hintergrund regenerierter mGFP-GPI Moleküle berechnet.

Die Helligkeitswerte B nach der Recovery ergeben eine Intensitätsverteilung $\rho(B)$. Um ein Monomersignal zu erhalten, wird wiederholt gebleicht. Die letzten, verbliebenen mGFP-GPI Moleküle aus allen ausgewählten Zellen, die identischen Bedingungen ausgesetzt waren, wurden zur Berechnung der

Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (pdf) der Monomere $\rho_1(B)$ herangezogen.

Aufgrund des stochastischen Emissionsprozesses der Photonen, kann die pdf von Oligomeren des N-ten Grades mit Hilfe von Faltungsintegralen berechnet werden.

$$\rho_N(B) = \int \rho_1(B') \rho_{N-1}(B - B') dB' \quad (3.1)$$

Die Linearkombination der daraus resultierenden Intensitätsverteilung $\rho(B)$ wurde dazu genutzt, eine Verteilung von Monomeren und Oligomeren zu berechnen.

$$\rho(B) = \sum_{N=1}^{N_{max}} \alpha_N \rho_N(B) \quad (3.2)$$

α_N gibt dabei die Gewichtung der einzelnen N-meren an. Zur Berechnung von α_N wurde die Methode der kleinsten Quadrate angewendet, um eine Gewichtung der einzelnen Intensitätsverteilungen zu erhalten. Die Summe der einzelnen Verteilungen muss stets 1 ergeben.

$$\sum_{N=1}^{N_{max}} \alpha_N = 1 \quad (3.3)$$

Für ein repräsentatives Resultat wurden mindestens 200 Helligkeitswerte benötigt. Bei allen Versuchen konnte jedoch keine höhere Oligomerisation als Dimere (α_2) beobachtet werden. Zur Abschätzung der Fehler wurden zufällig 50% aller Helligkeitswerte der TOCCSL-Aufnahmen entnommen, um erneut α_2 zu berechnen. Dieser Vorgang wurde 100-mal wiederholt. Dadurch erhielt man den Mittelwert, die Standardabweichung und die Sicherheit des Mittelwertes von α_2 .

Um den Zerfall und Aufbau von Dimeren zu berechnen, wurden mehrere Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen. Die ermittelten Werte wurden innerhalb eines kleinen Zeitintervalls (5–15min) gemittelt, zusätzlich die Standardabweichung und die Sicherheit des Mittelwertes bestimmt.

Die Dichte (gesamte Zelle, Plasmamembran) der GFP-GPI-Moleküle wurde bei reinen Dichtemessungen mit dem Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ* (Na-

3 Materialien & Methoden

tional Institute of Health, Bethesda, USA) ermittelt. Dazu wurde ein geeigneter Bereich (ROI) der fluoreszierenden Membran markiert und mit Hilfe von *ImageJ* kann automatisch die Helligkeit im ROI berechnet werden. Die einzelnen Werte wurden gemittelt und die Sicherheit des Mittelwertes berechnet.

Um die Oberflächendichte der GFP–GPI–Moleküle bei TOCCSL–Messungen zu berechnen, wurde ein in MATLAB selbstgeschriebenes Programm verwendet. Dazu wurde das Pre–Bleach Bild der ersten Aufzeichnungen einer jeden gemessenen Zelle verwendet. Daraus wurde die mittlere Helligkeit bestimmt und mit dem mittleren Monomersignal normiert, wodurch die Oberflächendichte der einzelnen Zellen, inklusive der Standardabweichung und der Sicherheit des Mittelwertes berechnet werden konnte.

Existiert ein Molekül über mehrere Bildsequenzen hinweg, kann zusätzlich die Diffusionskonstante berechnet werden, indem über sämtliche, lokalisierte Trajektorien gemittelt wird. Aufgrund der brownischen Bewegung kann man bei Molekülen von keiner ausgezeichneten Bewegungsrichtung ausgehen. Mit Hilfe der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) erhält man in Abhängigkeit von der verstrichenen Zeit einen Wert für das Flächenelement, in dem sich die gesuchten Moleküle befinden können.

Berücksichtigt man die Zeitverzögerung t_{lag} der einzelnen Bilder, können die mittlere quadratische Verschiebung (MSD)–Werte aller Trajektorien berechnet und als Funktion von t_{lag} geplottet werden. Durch eine limitierende Lokalisationspräzision muss ein Korrekturfaktor σ eingeführt werden. Sowohl die Diffusionskonstante D (Steigung) als auch σ (Offset) werden gefittet (siehe Abbildung 3.1).

$$MSD = 4 \cdot D \cdot t_{lag} + 4 \cdot \sigma \quad (3.4)$$

Durch zufällige Wahl verschiedener MSD–Werte, die aus einer Gaußverteilung der gemessenen MSD–Werte und der dazugehörigen Varianz ermittelt werden, wird eine Simulation mindestens 100-mal durchgeführt, wieder gefittet und D bestimmt. Abschließend wird der Mittelwert dieser 100 D –Werte berechnet. Mit dem daraus ermittelten Wert für D kann die tatsächliche Diffusionskonstante und ihre Standardabweichung sehr genau abgeschätzt werden.[32, 138]

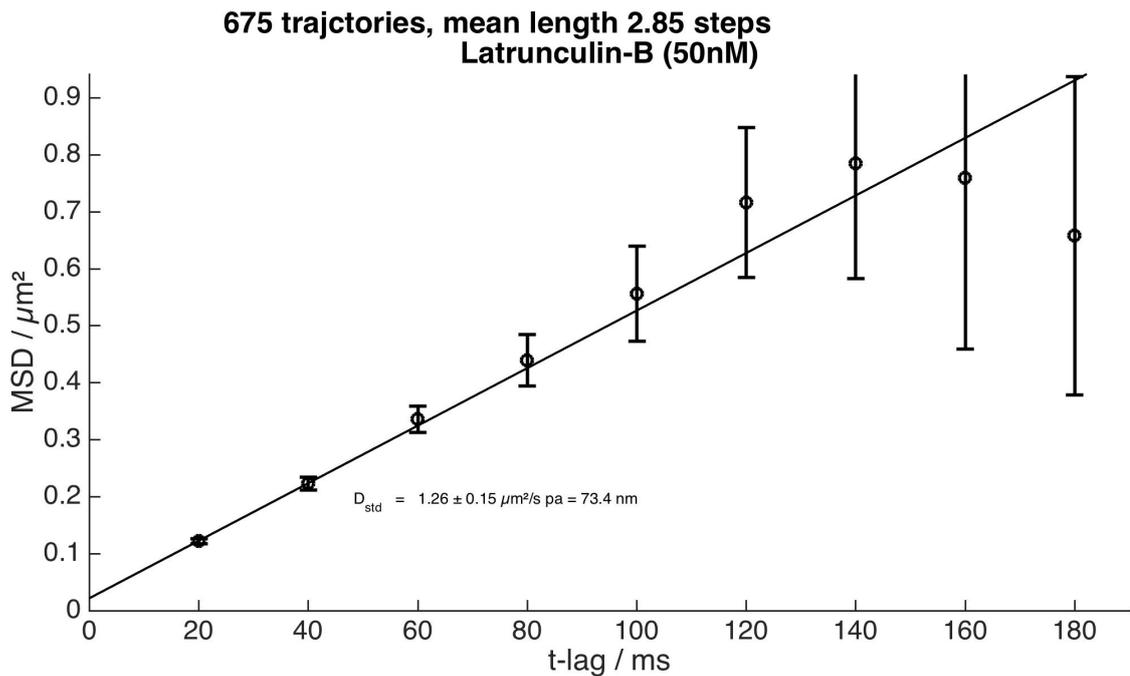


Abbildung 3.1: Am Beispiel von CHO mGFP-GPI + Latrunculin B wird die Berechnung der Diffusionskonstante gezeigt. Durch Variation der Suchradien der einzelnen Moleküle werden mögliche Diffusionsbewegungen detektiert. Ab einem bestimmten Wert kommt es dabei zu einem Plateau der gesuchten Diffusionskonstanten. Die Trajektorien dieses Suchradiuses werden über sämtliche Bildsequenzen analysiert. Die MSD-Werte aller Trajektorien werden berechnet und als Funktion von t_{lag} geplottet (siehe Gleichung 3.4). Aus der Steigung der Geraden kann der Diffusionswert berechnet werden.

3 Materialien & Methoden

4.2 FRET-Messungen

Die aufgenommenen Bilder wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes *ImageJ* analysiert. Bei der Analyse handelt es sich um eine quantitative Berechnung der vorkommenden FRET-Signale. Es wurde die FRET-Effizienz ermittelt. Die einzelnen Aufnahmen unterteilen sich in 6 Bilder, dargestellt in Tabelle 3.4

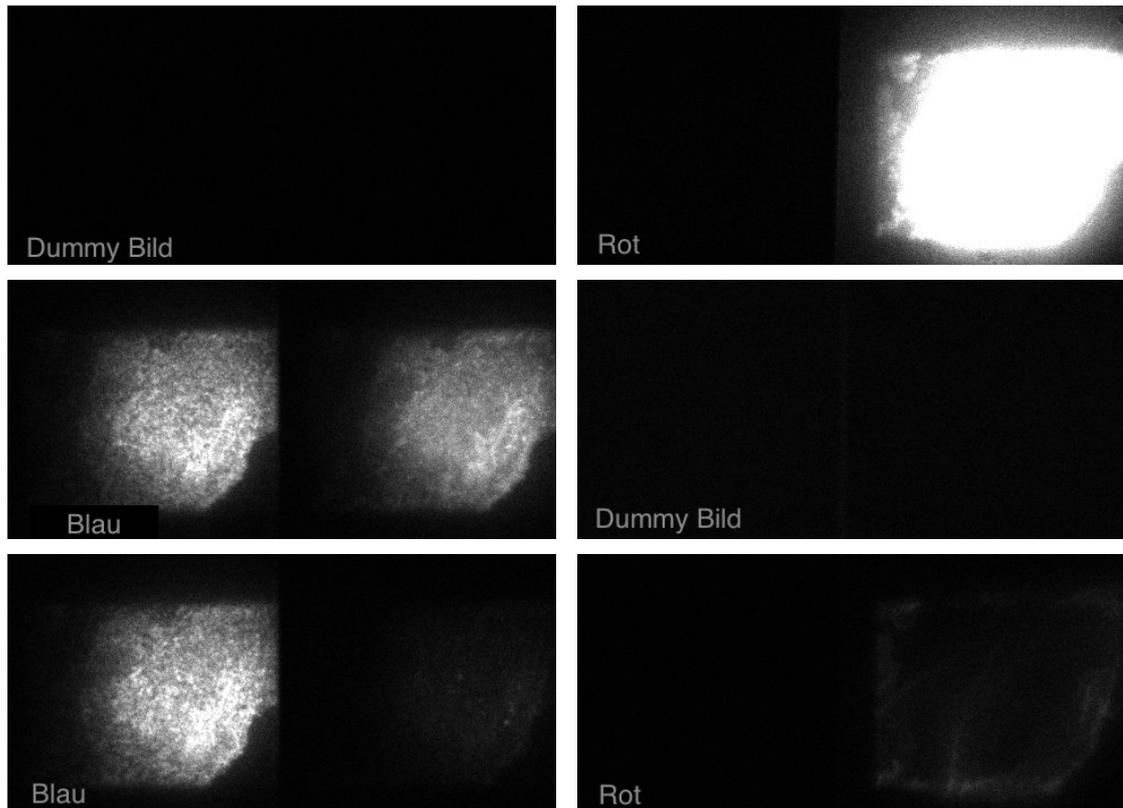


Abbildung 3.2: Zu sehen ist eine Übersicht der FRET-Aufnahmen. Die einzelnen Aufnahmesequenzen sind von links nach rechts zeilenweise geordnet (siehe Tabelle 3.4). Jedes Bild ist in einen grünen Kanal (links) und einen roten Kanal (rechts) unterteilt. Bei Bild 1 und Bild 4 handelt es sich um Dummy Bilder. Im Bild 2 wird nur mit dem roten Laser angeregt. Für die Auswertung ist der grüne Kanal sowohl von Bild 3 als auch Bild 5 entscheidend. In Bild 3 sieht man das FRET-Signal, sowie die Direktanregung des roten Farbstoffes mit dem blauen Laser. In Bild 5 wird wie in Bild 3 mit dem blauen Laser angeregt, wobei durch das selektive Ausbleichen des Akzeptors Signale nur im grünen Kanal zu erkennen sind. Bild 6 dient als Kontrolle, ob alles im roten Kanal weggebleicht wurde.

Für die Auswertung sind das dritte und fünfte Bild einer jeden Aufnahme relevant. Im dritten Bild markiert man einen geeigneten Bereich im grünen Kanal

und berechnet Größe und Mittelwert der Intensität I_{bb} des ROI. Denselben ROI verwendet man im fünften Bild ebenfalls im grünen Kanal, um auch dort die Größe und den Mittelwert der Intensität I_{ab} zu erhalten. Bei einer der Aufnahmen ermittelt man außerhalb der Zelle den Hintergrund. Dieser Wert wird von den erhobenen Intensitäten, I_{bb} und I_{ab} , abgezogen. Um den Bleicheffekt zu berücksichtigen, wird ein Korrekturfaktor BF eingeführt, wobei N die Anzahl der ausgewählten Zellen ist.

$$BF = \frac{\sum_{N=1}^N \frac{I_{bbN}}{I_{abN}}}{N} \quad (3.5)$$

Zur Berechnung des FRET-Anteils wird die Intensität vor (I_{bb}) und nach (I_{ab}) dem Bleichimpuls miteinander verglichen. Für den FRET ergibt sich daraus in weiterer Folge.

$$FRET [\%] = \left(1 - \frac{I_{bb}}{I_{ab} \cdot BF}\right) \cdot 100 \quad (3.6)$$

Durch das selektive Ausbleichen des Akzeptors kann aus den Intensitäten vor (I_{bb}) und nach (I_{ab}) dem Bleichen die FRET-Effizienz berechnet werden.

4.3 Ca^{2+} -Messungen

Für die Auswertung der Ca^{2+} -Messungen wurde ein in MATLAB implementiertes, selbstgeschriebenes Programm (Technische Universität Wien, Institut für angewandte Physik, Arbeitsgruppe Biophysik) verwendet. Bei dem verwendeten Algorithmus handelt es sich um den *Canny Edge Detector*. [139] Dabei handelt es sich um einen Algorithmus, der Bilder so bearbeitet, dass als Endergebnis lediglich die Kanten des Ausgangsbildes wahrzunehmen sind. Da er nur auf Graubildern arbeiten kann, müssen farbige Bilder in Graubilder konvertiert werden.

Bei den Ca^{2+} -Messungen wurden abwechselnd Bilder vom 340nm-Kanal und 380nm-Kanal gemacht. Für die weitere Untersuchung wurde die Summe beider Bilder verwendet (siehe Abbildung 3.3).

Um Hintergrundeffekte wie z. B. Rauschen zu minimieren, wird ein Gaußfilter über das gesamte Bild gelegt. Dabei handelt es sich um eine symmetrische 5x5

3 Materialien & Methoden

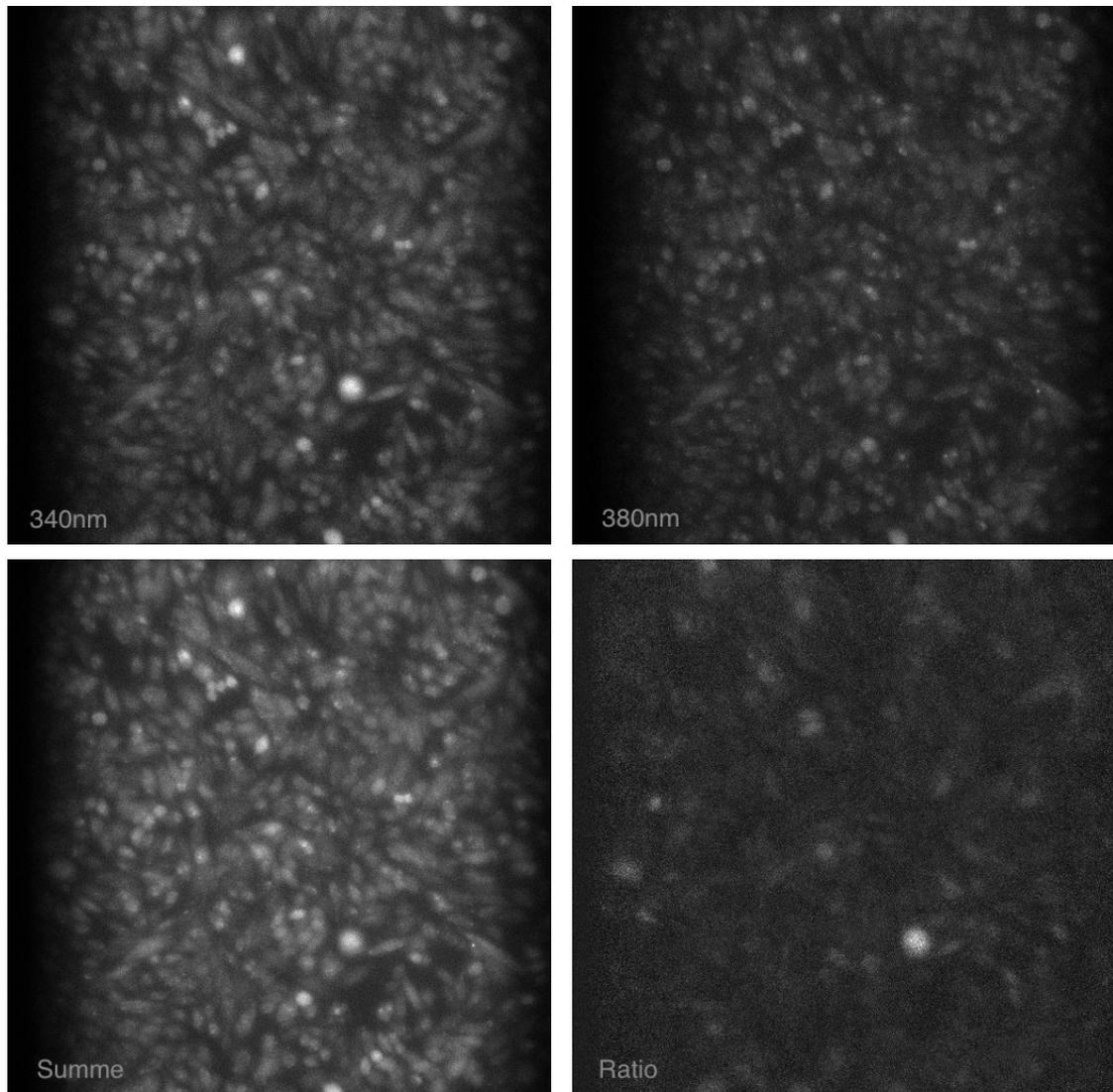


Abbildung 3.3: Zu sehen sind die vier, für die Berechnung der Ca^{2+} -Signale, notwendigen Bilder. Oben links wurden die Zellen mit 340nm angeregt. Dadurch wird das Ca^{2+} -gebundene FURA-2AM sichtbar. Rechts daneben wurden die Zellen mit 380nm angeregt. Dabei wurde freies FURA-2AM sichtbar. In der unteren Reihe ist sowohl die Summe der beiden oberen Bilder als auch deren Verhältnis zu sehen. Die Bilder wurden bei 37°C aufgenommen.

Matrix, die eine Gaußgewichtung beinhaltet. Dieser 5x5 Pixel große Raster glättet schrittweise die gesamte Oberfläche, wobei der Raster immer nur ein Pixel entweder in x- oder y-Richtung verschoben wird. Wählt man den Raster größer, wird nicht nur das Rauschsignal minimiert, sondern es gehen auch feine Kanten verloren.

$$\frac{1}{115} \begin{bmatrix} 2 & 4 & 5 & 4 & 2 \\ 4 & 9 & 12 & 9 & 4 \\ 5 & 12 & 15 & 12 & 5 \\ 4 & 9 & 12 & 9 & 4 \\ 2 & 4 & 5 & 4 & 2 \end{bmatrix} \quad (3.7)$$

In einem nächsten Schritt wird die partielle Ableitung sowohl in x- als auch y-Richtung berechnet. Die Detektion von Kanten erfolgt hierbei nach dem ja / nein Prinzip. Handelt es sich bei dem betrachteten Grauwert um ein Maximum, wird eine Kante in diesem Pixel gesetzt, steigt der Wert jedoch weiter an, wird keine Kante gesetzt. Dadurch entstehen zwei Bilder, die sowohl alle vertikalen und alle horizontalen Linien erkennbar machen.

Nun wird der Mittelwert (MW) inklusive der Standardabweichung (Std) aller potenzieller Kanten errechnet. Ein Grenzwert T_1 ($MW + 1 \times Std$) und T_2 ($MW + 2 \times Std$) wird festgelegt. Alle Kanten unterhalb T_1 werden sofort verworfen. Die Pixel im Intervall T_1-T_2 werden untersucht, ob sie an ein Pixel im Intervall $\geq T_2$ angrenzen. Wenn ja, werden die beiden Kanten miteinander verbunden. Kreuzpunkte sind damit schwer darstellbar. Mit Hilfe einer zusätzlichen Funktion kann dieses Problem teilweise behoben werden. Bei kritischen Kreuzpunkten kann bis zu ein Pixel ergänzt werden. Nach diesem Schritt erscheinen einige Objekte als geschlossene Oberflächen (siehe Abbildung 3.4). Diese können nach Größe und Exzentrizität selektiert werden.

Als Nächstes wird von der Summe der Bilder auf das Verhältnis der Bilder (Ratio) gewechselt (siehe Abbildung 3.3). Für jede detektierte Zelle wird eine Trajektorie berechnet (siehe Abbildung 3.4). Sämtliche Trajektorien werden über die Zeit geplottet. In einem letzten Schritt wird der Mittelwert mit dazugehörigen Standardabweichungen aus allen Trajektorien zu jedem Zeitpunkt berechnet.

3 Materialien & Methoden

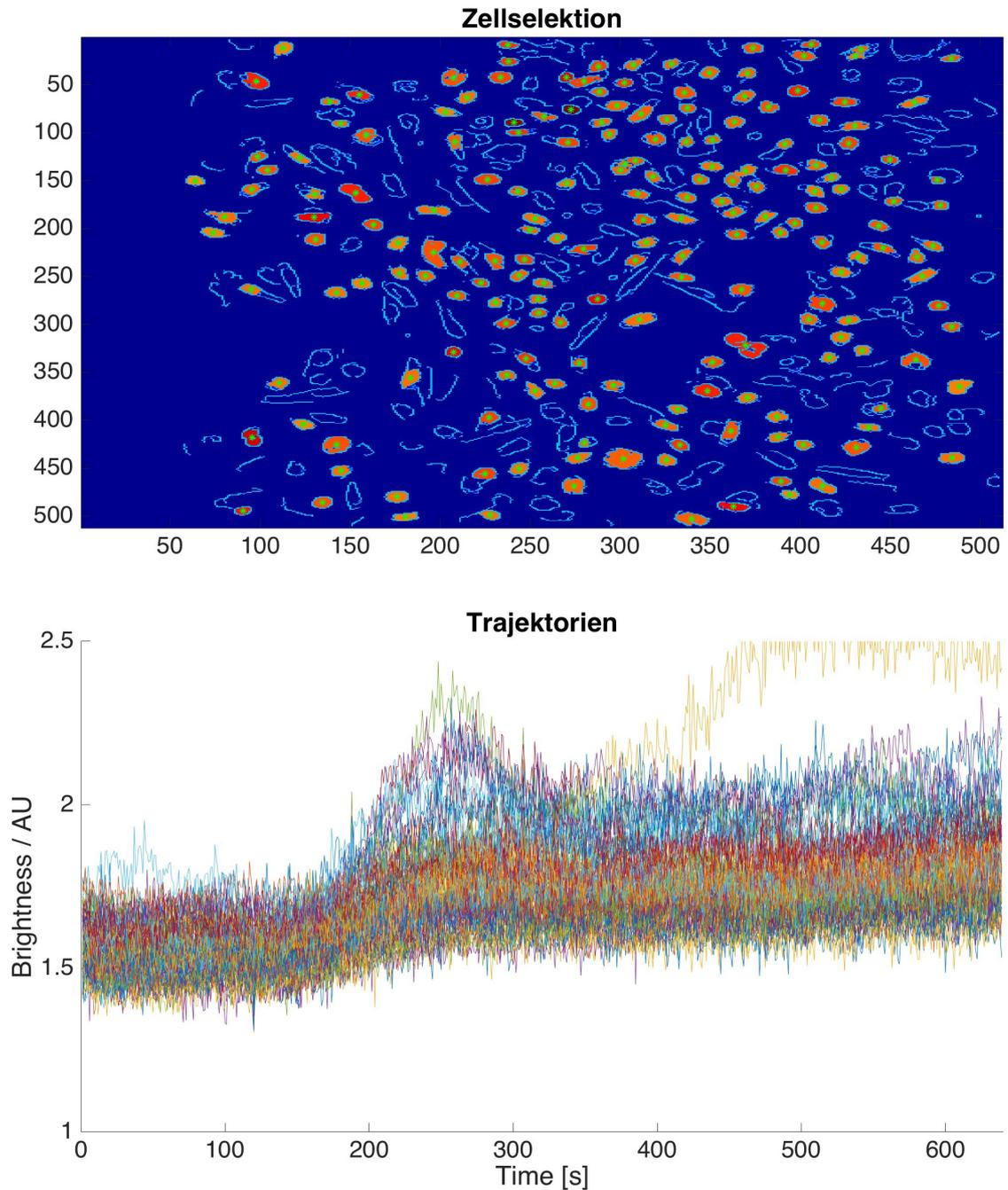


Abbildung 3.4: Ca^{2+} -Detektion (Canny Edge Detection): Die Zellen, deren Oberfläche vollständig geschlossen werden kann, werden in unterschiedlichen Farben auf blauem Hintergrund angezeigt. Je intensiver der Farbton, desto intensiver ist die emittierte Strahlung. Mit Hilfe von Filtern kann die Zellgröße und Zellform selektiert werden. Dadurch können für bestimmte Zellen die Trajektorien berechnet werden. Die Trajektorien zeigen das Ca^{2+} -Signal jeder einzelnen, selektierten Zelle und werden über die Zeit geplottet.

4 Resultate

1 Auswirkungen eines Heat-Shocks auf Nanostrukturen der Plasmamembran von CHO-Zellen

Zur Untersuchung der Nanostrukturen von Plasmamembranen wurden CHO-Zellen verwendet, die eine stabile Expression von mGFP-GPI aufweisen (siehe S. 61). Durch die stabile Expression von mGFP an der Plasmamembran konnten mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie Auswirkungen von leichten Heat-Shocks analysiert werden. Das mGFP ist durch einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden. Aus vorausgehenden Experimenten [47, 45] konnte festgestellt werden, dass mGFP-GPI auf der Plasmamembran Nanoplattformen bildet. Dies galt es zu Beginn zu reproduzieren. Mit Hilfe von TOCCSL (siehe Abbildung 1.13) konnte dies realisiert werden. Sämtliche TOCCSL Messungen wurden am SDT1 (siehe S. 67) durchgeführt.

Bei den einzelnen Messungen konnten hauptsächlich Monomere und Dimere entdeckt werden. Eine höhere Oligomerisation trat in sehr seltenen Fällen auf und konnte vernachlässigt werden ($< 1\%$). Da es bei den einzelnen Messungen zu tagesabhängigen Schwankungen (z. B. Qualität der Zellen, Adaption des Setups) kommen kann, werden in weiterer Folge nur Messungen miteinander verglichen, die am selben Tag unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden.

Für das erste Experiment wurde die Inkubationsbox und der Puffer im Wasserbad auf 37°C erhitzt. Anschließend wurde das Medium gegen den erwärmten Puffer ausgetauscht und die Messung gestartet. In Abbildung 4.1 ist ein Beispiel einer 37°C Messung dargestellt. Zu sehen ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunk-

4 Resultate

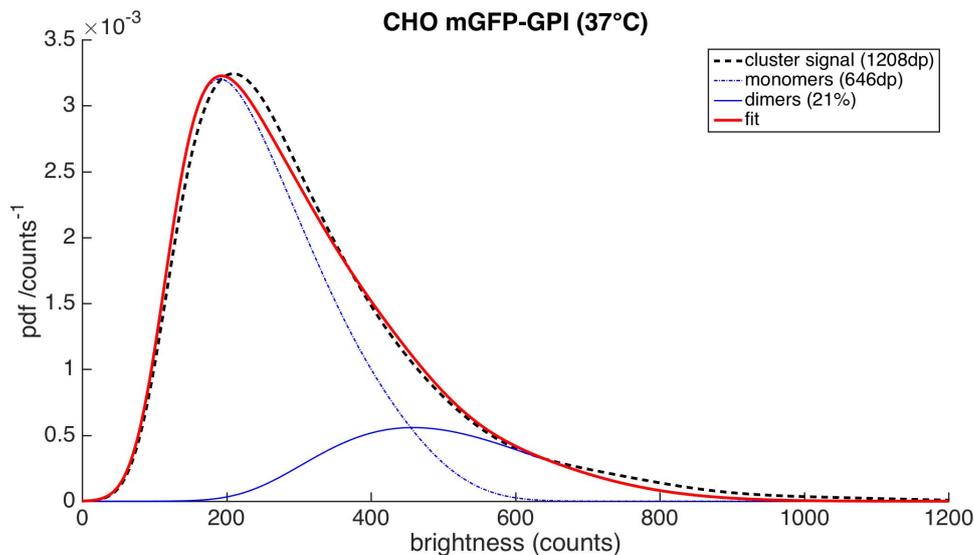


Abbildung 4.1: CHO mGFP-GPI (Dimer-Anteil bei 37°C): Zu sehen ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion. Die einzelnen Datenpunkte (schwarz) wurden mit Hilfe von Gleichung 3.2 gefittet (rot). Die einzelnen Fraktionen sind in blau dargestellt. Bei dem Monomer-Signal handelt es sich um eine gepunktete Kurve, bei dem Dimer-Signal um eine durchgehende Kurve. Der Dimer-Anteil α_2 beläuft sich bei dieser Messung auf $21\% \pm 2,8\%$ ($N = 8$ Zellen).

tion bei 37°C. Der durchschnittliche Dimer-Anteil α_2 bei 37°C bewegte sich bei sämtlichen Messungen im Bereich von 20–30%, was sich mit den publizierten Werten deckt. [47, 45]

Nun ging es daran festzustellen, ob ein milder HS Auswirkungen auf die Formation der Nanoplatfformen hat. Dazu wurden die CHO-Zellen im Anschluss an das vorausgehende Experiment bei 37°C einem HS bei 40°C ausgesetzt. Dafür wurde sowohl die Inkubationsbox als auch der Puffer im Wasserbad auf 40°C aufgeheizt. Anschließend wurde das Medium in den Zellkammern gegen den erwärmten Puffer ausgetauscht. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten. Die Auswirkungen dieses HS sind in Abbildung 4.2 veranschaulicht.

Bereits eine Erhöhung der Temperatur um 3°C reicht aus, um die Formation von Dimeren negativ zu beeinflussen. Der Anteil an Dimeren reduzierte sich bei sämtlichen Messungen auf 5–10%. Die Ergebnisse decken sich ebenfalls mit bereits publizierten Werten. [45] Dies wirft jedoch die Frage auf, ob ein Zerfall der Nanoplatfformen augenblicklich nach Eintritt des HS passiert oder ob dies

1 Auswirkungen eines HS auf NS der PM von CHO-Zellen

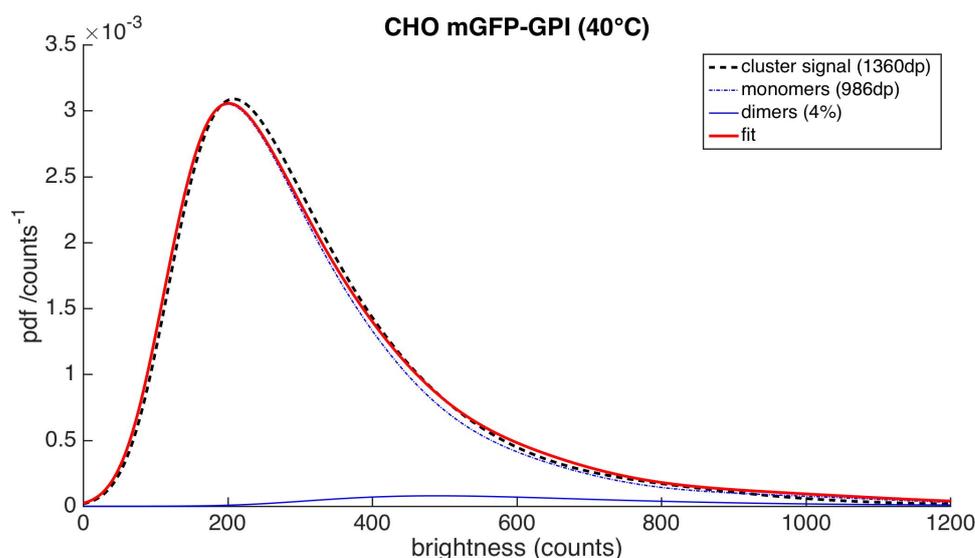


Abbildung 4.2: CHO mGFP-GPI (Dimer-Anteil bei 40°C): Zu sehen ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion. Die Kurven sind identisch zu Abbildung 4.1 gekennzeichnet und wurden ebenso berechnet. Der Dimer-Anteil α_2 reduzierte sich durch den HS von $21\% \pm 2,8\%$ auf $4,4\% \pm 2,7\%$ ($N = 6$ Zellen).

mit einer gewissen Zeitverzögerung geschieht.

Dazu wurden mehrere Aufnahmen von Zellen über einen Zeitraum von 60 Minuten gemacht. Zusätzlich zum zeitlichen Verlauf der Oligomerisation wurde auch der Verlauf der Diffusionsrate und der Oberflächendichte auf der Zellmembran ermittelt. Zu Beginn wurde eine Messung bei 37°C durchgeführt, um Startwerte für die einzelnen Parameter zu haben. Für die Messung bei 41°C fand ich mich vor einem statistischen Problem wieder, da bei TOCCSL-Experimenten Daten nur mit einer gewissen Zeitverzögerung ($\sim 1-2$ min) generiert werden können. Deshalb ist es notwendig, dass man mehrere Lab-Tek Kammern (5 Kammern) nacheinander untersucht, um ausreichend Statistik für den Zeitverlauf des Zerfalls zu erhalten. Pro Kammer wird pro Zeitpunkt nur eine Zelle verwendet. Zur Berechnung des Verlaufs von Dimer-Zerfall, Oberflächendichte und Diffusionskonstante wurden aus allen Kammern alle Zellen in den jeweiligen Zeitintervallen (siehe Abbildung 4.3) zugepoolt und der Mittelwert mit der dazugehörigen Sicherheit des Mittelwertes berechnet. Jede Kammer wurde für 60 Minuten untersucht.

In Abbildung 4.3 ist der zeitliche Verlauf sowohl des Dimer-Anteils, der

4 Resultate

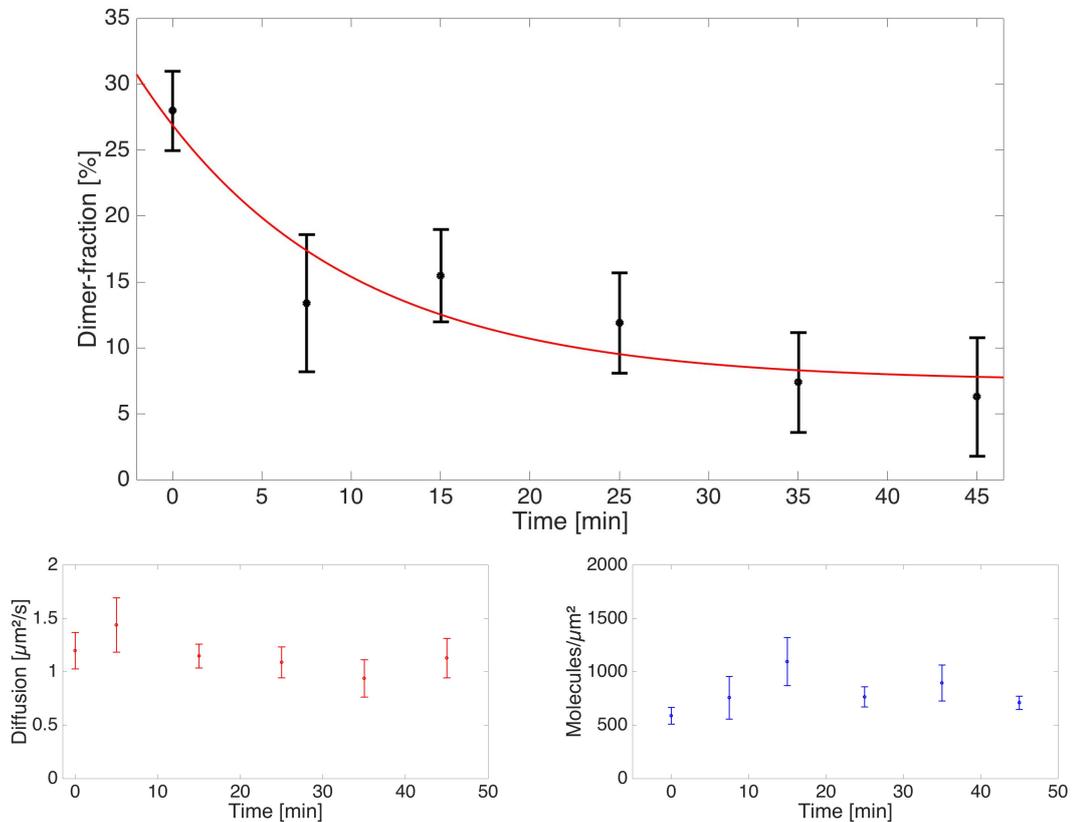


Abbildung 4.3: CHO mGFP-GPI (Dimer-Zerfall bei 41°C): Bei den in unterschiedlichen Farben (schwarz = Dimer-Anteil, rot = Diffusionsrate, blau = Oberflächendichte) eingezeichneten Punkten handelt es sich um den jeweiligen Mittelwert aller gemessenen Zellen in einem bestimmten Zeitintervall (5–10, 10–20, 20–30, 30–40, 40–50 [min]). Die vertikalen Linien geben die Sicherheit des Mittelwertes an. Der Wert bei $t = 0$ repräsentiert den Wert bei 37°C. Der Anteil der Dimere reduziert sich von $28\% \pm 3\%$ nach 45 Minuten auf $6,3\% \pm 4,5\%$, wobei sich die Anzahl der Dimere bereits nach ~ 10 Minuten halbiert hat. Die rote Kurve stellt einen exponentiellen Fit ($e^{-\frac{t}{\tau}}$) des Dimer-Abbaus dar. Für die Lebensdauer τ ergab sich dabei ein Wert von 32,5 [min]. Sowohl die Diffusionsrate als auch die Oberflächendichte bleiben während des gesamten Zeitraums relativ stabil. Die Diffusionskonstante bewegt sich im Bereich von $0,93\text{--}1,4\mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Oberflächendichte beläuft sich auf $600\text{--}1000$ Moleküle / μm^2 .

1 Auswirkungen eines HS auf NS der PM von CHO-Zellen

Diffusionsrate als auch der Oberflächendichte nach einem HS dargestellt. Die Nanoplatattformen lösen sich zu Beginn rasch auf und streben dann gegen einen Grenzwert von $\sim 5\%$. Die Diffusionsrate bewegt sich in einem Bereich von $0,9\text{--}1,4\mu\text{m}^2/\text{s}$, ausgehend von einem Wert von $1,2 \pm 0,17\mu\text{m}^2/\text{s}$. Ähnlich wie die Diffusionsrate bleibt die Oberflächendichte über den gesamten Zeitraum relativ konstant und beträgt $600\text{--}1000$ Moleküle/ μm^2 .

Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Dimer-Zerfall um einen reversiblen oder irreversiblen Prozess handelt, wurden CHO-Zellen für 60 Minuten einem HS von 41°C ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C analysiert. Hier wurden 6 Lab-Tek Kammern benötigt, um ausreichend Statistik zu erhalten. Pro Kammer pro Zeitpunkt wird nur eine Zelle betrachtet. Jede Kammer wird nacheinander für 60 Minuten untersucht.

Dabei konnte festgestellt werden, dass es sich um einen teilweise reversiblen Prozess handelt. Ausgehend von einem Dimer-Anteil von $5,8 \pm 3,7\%$ regenerierte sich der Dimer-Anteil innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Der zeitliche Verlauf des Dimer-Aufbaus wird in Abbildung 4.4 veranschaulicht. Das Erreichen des Ausgangswertes konnte innerhalb des untersuchten Zeitraums nicht beobachtet werden. Die Oberflächendichte ist niedriger als vor dem HS und liegt zwischen $300\text{--}550$ Molekülen/ μm^2 . Während des gesamten Beobachtungszeitraumes war die Diffusionsrate deutlich reduziert und bewegte sich im Bereich von $0,82\text{--}1,03\mu\text{m}^2/\text{s}$. Diese scheinbar verminderte Mobilität im Vergleich zum Dimer-Abbau kann auf einem statistischen Problem beruhen. Um dies zu verifizieren, sind in weiterer Folge Diffusionsexperimente mit dem bleichstabilen GFP-Booster Atto647N geplant, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr angeführt werden. Erste Experimente dazu bestätigten jedoch diesen Verdacht.

Der Dimer-Anteil regeneriert sich also nach einem HS innerhalb des Messzeitraumes nicht komplett. Dies lässt einen zellulären Mechanismus vermuten, der ein erneutes Aneinanderkoppeln der einzelnen Monomere nach einem HS erschwert oder aber auch die intrazelluläre Nachbesetzung an Dimeren behindert.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob durch einen HS zusätzlich ein intrazellulärer Prozess provoziert werden kann. Ca^{2+} ist dabei ein wichtiger, zellulärer Botenstoff und unter anderem für die Expression von HSPs essentiell. Mit Fura-2AM [$10\mu\text{M}$] beladene CHO-Zellen wurden deswegen unterschiedlichen

4 Resultate

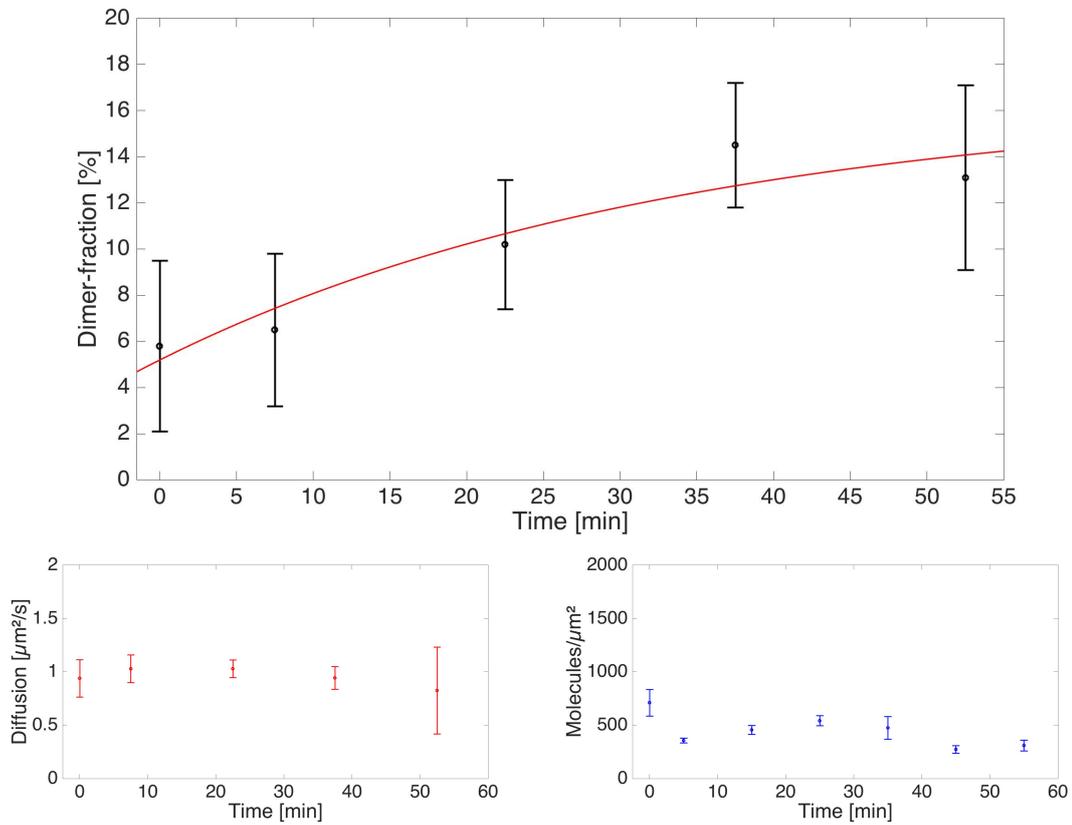


Abbildung 4.4: CHO mGFP-GPI (Dimer-Aufbau nach HS): Bei den in unterschiedlichen Farben (schwarz = Dimer-Anteil, rot = Diffusionsrate, blau = Oberflächendichte) eingezeichneten Punkten handelt es sich um den jeweiligen Mittelwert aller gemessenen Zellen in einem bestimmten Zeitintervall (5–10, 15–30, 30–45, 45–60 [min]). Die vertikalen Linien geben die Sicherheit des Mittelwertes an. Der Wert bei $t = 0$ repräsentiert den Wert bei 41°C nach 60 Minuten. Ausgehend von einer Dimer-Fraktion von $5,8 \pm 3,7\%$ erreichte diese ihren Maximalwert von $14,5 \pm 2,7\%$ nach knapp 40 Minuten. Die rote Kurve symbolisiert den zeitlichen Verlauf des Dimer-Anteils und wurde mit Hilfe der Funktion $1 - e^{-\frac{t}{\tau}}$ gefittet. Für die Lebensdauer τ ergab sich dabei ein Wert von $34,4$ [min]. Sowohl die Diffusionsrate als auch die Oberflächendichte bleiben während des gesamten Zeitraums relativ stabil. Die Diffusionskonstante bewegt sich im Bereich von $0,82\text{--}1,03\mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Oberflächendichte beläuft sich auf $300\text{--}550$ Moleküle / μm^2 .

1 Auswirkungen eines HS auf NS der PM von CHO-Zellen

Heat-Shocks (siehe Kapitel 3.6) ausgesetzt. Dabei wurde der zeitliche Verlauf des Ca^{2+} -Signals gemessen. Mit Hilfe von UV-Licht (340/380nm) wurden die Zellen angeregt. Sämtliche Ca^{2+} -Messungen wurden am SDT3 (siehe S. 68) durchgeführt. Um die gewünschten Temperaturen möglichst konstant und exakt zu realisieren, wurde ein spezielles Heizelement (*BioCellTM*, JPK-Instruments, Berlin, Deutschland) verwendet. In den nachfolgenden Abbildungen wird der Verlauf des Ca^{2+} -Signals über die Zeit gezeigt. Der Wert für das Ca^{2+} -Signal ergibt sich dabei aus dem Verhältnis der Helligkeit der 340/380nm Anregung.

In einem ersten Versuch wurden CHO-Zellen, ausgehend von einer Raumtemperatur von 23°C, nach 200 Sekunden auf 37°C oder 41°C erhitzt. In Abbildung 4.5 sind die daraus resultierenden Ca^{2+} -Signale einander gegenübergestellt. Bei 37°C ist ein leichter Anstieg des Ca^{2+} -Signals zu erkennen. Dies lässt sich damit erklären, dass bei 23°C wahrscheinlich weniger Zellen aktiv sind als bei 37°C.

Bei 41°C hingegen ist nach Erreichen der Maximaltemperatur ein leichter Peak im Ca^{2+} -Signal zu sehen, der jedoch nach ~ 1 Minute wieder abklingt und sich dem Wert von 37°C annähert. Durch einen milden HS konnte demnach ein intrazellulärer Prozess provoziert werden.

Als Nächstes wurden zwei HS-Plateaus simuliert. Ausgehend von einer Temperatur von 37°C erhöhte ich diese für 100 Sekunden auf 41°C. Nach einer Regenerationszeit von 400 Sekunden bei 37°C wurde dieser HS wiederholt. In Abbildung 4.6 ist das mittlere Ca^{2+} -Signal gemeinsam mit dem Temperaturverlauf über die Zeit dargestellt. Nach Erhöhung der Temperatur tritt mit geringer Verzögerung eine deutliche Erhöhung des Ca^{2+} -Signals ein. Dieses ist über den gesamten Zeitraum des HS erhöht. Durch Reduktion der Temperatur nimmt ebenfalls das Ca^{2+} -Signal wieder ab. Beim zweiten HS ist ein identisches Verhalten zu beobachten. Durch einen wiederholten HS nach einer gewissen Zeitverzögerung können mehrere Ca^{2+} -Signale erzeugt werden.

In einem weiteren Experiment sollte nun geklärt werden, ob die Intensität des Ca^{2+} -Signals abhängig von der Stärke des HS ist. Dazu wurden wieder zwei HS-Plateaus erzeugt, wobei die Temperatur des zweiten HS auf 45°C erhöht wurde. In Abbildung 4.7 sind das mittlere Ca^{2+} -Signal und der Temperaturverlauf einander gegenübergestellt. Analog zum vorausgehenden Versuch tritt bereits kurz nach dem HS ein Anstieg des Ca^{2+} -Signals ein und bleibt während des

4 Resultate

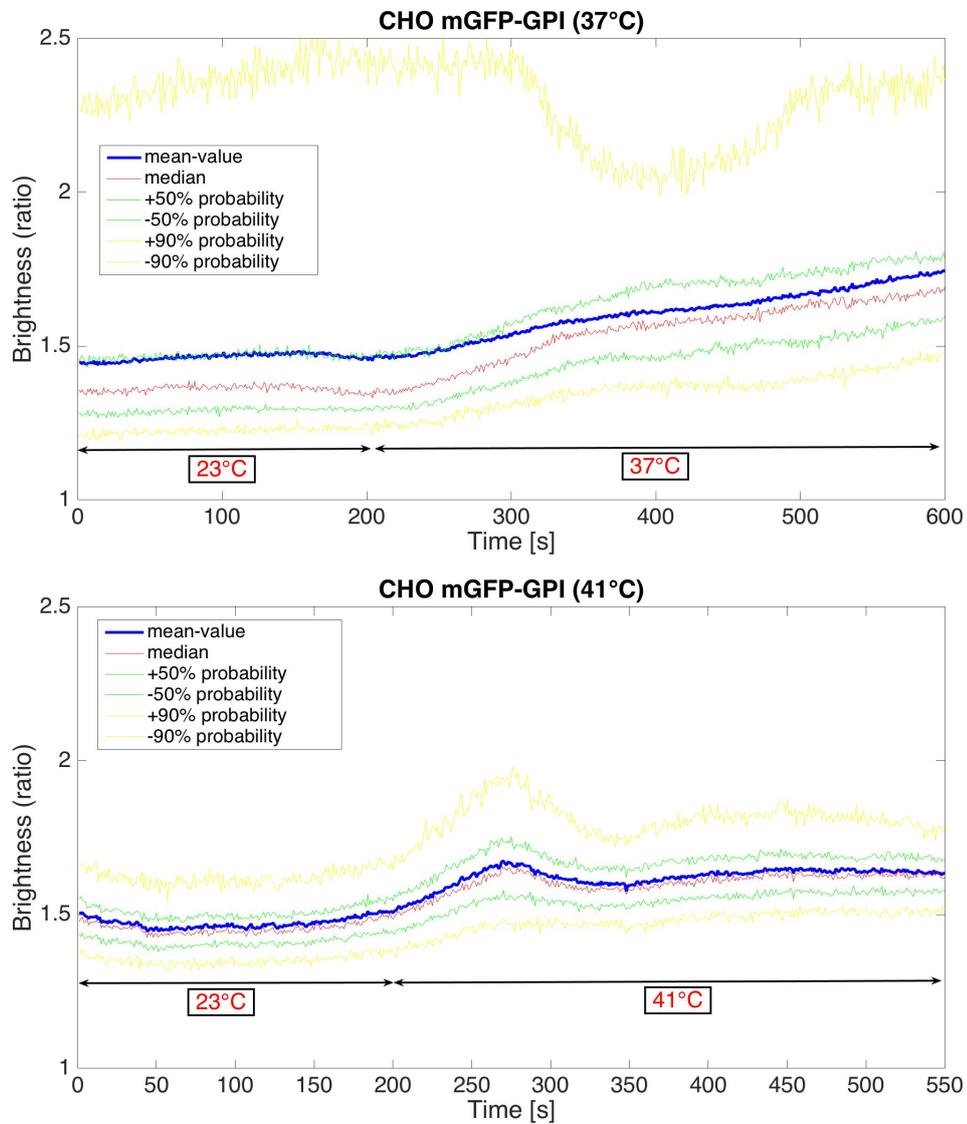


Abbildung 4.5: CHO mGFP-GPI: HS (37°C , 41°C): Die beiden oberen Graphiken zeigen den mittleren Verlauf des Ca^{2+} -Signals über den Versuchszeitraum. Der Wert für das Ca^{2+} -Signal ergibt sich dabei aus dem Verhältnis der Helligkeit der 340/380nm Anregung. Die blaue Kurve lässt sich aus dem Mittelwert der Trajektorien aller untersuchten Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt berechnen. Die einzelnen Trajektorien wurden nicht synchronisiert. Die unterschiedlichen Temperaturen sind mit Hilfe der schwarzen Pfeile gekennzeichnet.

1 Auswirkungen eines HS auf NS der PM von CHO-Zellen

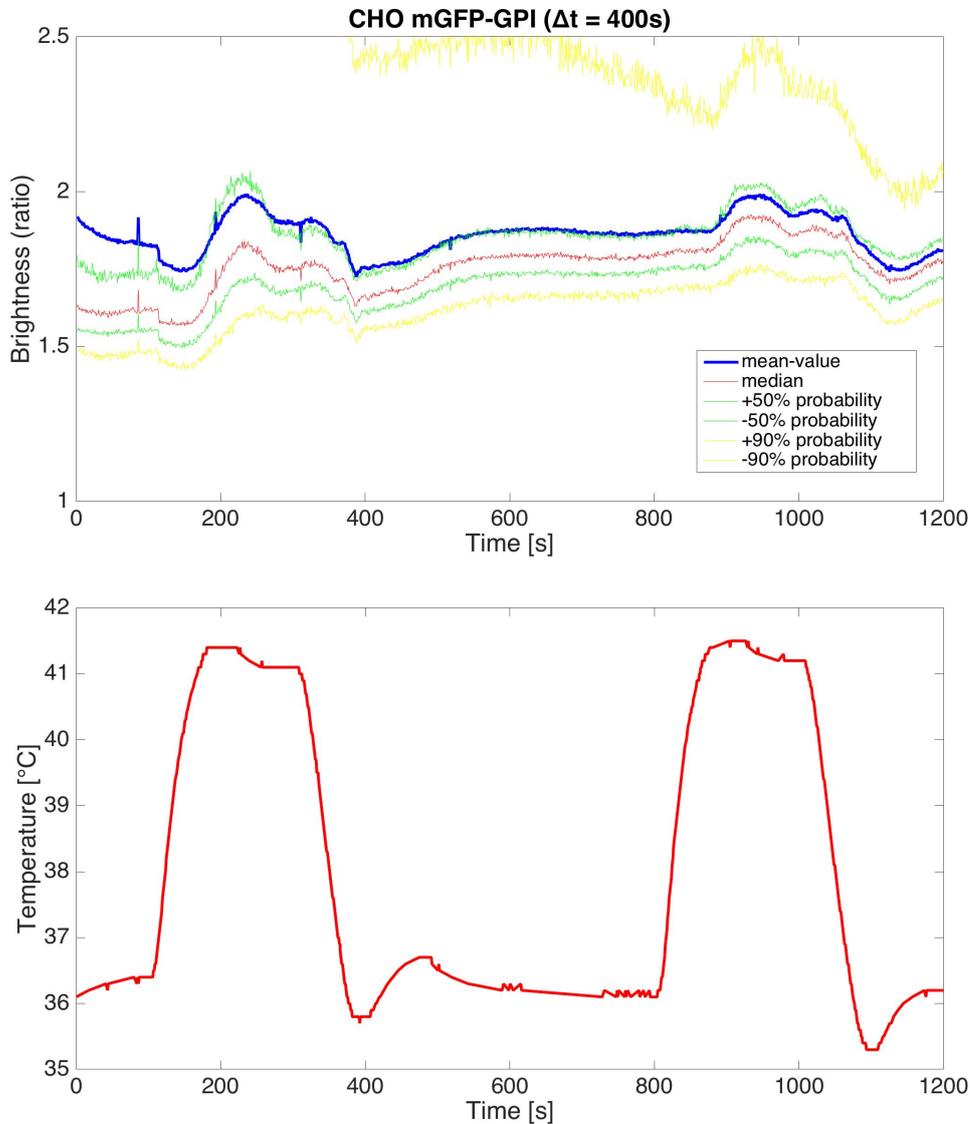


Abbildung 4.6: CHO mGFP-GPI (41°C– 41°C): Dargestellt ist eine HS-Rampe, wobei die einzelnen Heat-Shocks zeitlich verzögert sind ($\Delta t = 400s$). Die Berechnung und Beschriftung des Ca^{2+} -Signals ist analog zu Abbildung 4.5. Der Temperaturverlauf (rot) ist in der Graphik darunter illustriert. Bei beiden Heat-Shocks ist ein Anstieg des Ca^{2+} -Signals zu erkennen. Das Signal erreicht ähnlich dem Temperaturverlauf ein Plateau. Erniedrigt man die Temperatur nach dem HS, reduziert sich parallel dazu das Ca^{2+} -Signal, bleibt jedoch leicht erhöht, verglichen mit dem Ausgangswert.

4 Resultate

gesamten HS erhöht. Durch einen zweiten, stärkeren HS nimmt das Ca^{2+} -Signal nicht zu und hat einen ähnlichen Verlauf wie bei 41°C. Durch unterschiedliche HS-Plateaus können bei einer zeitlichen Verzögerung der einzelnen Heat-Shocks mehrere Ca^{2+} -Signale erzeugt werden. Die Höhe der Temperatur ist dabei nicht ausschlaggebend für das mittlere Ca^{2+} -Signal.

1 Auswirkungen eines HS auf NS der PM von CHO-Zellen

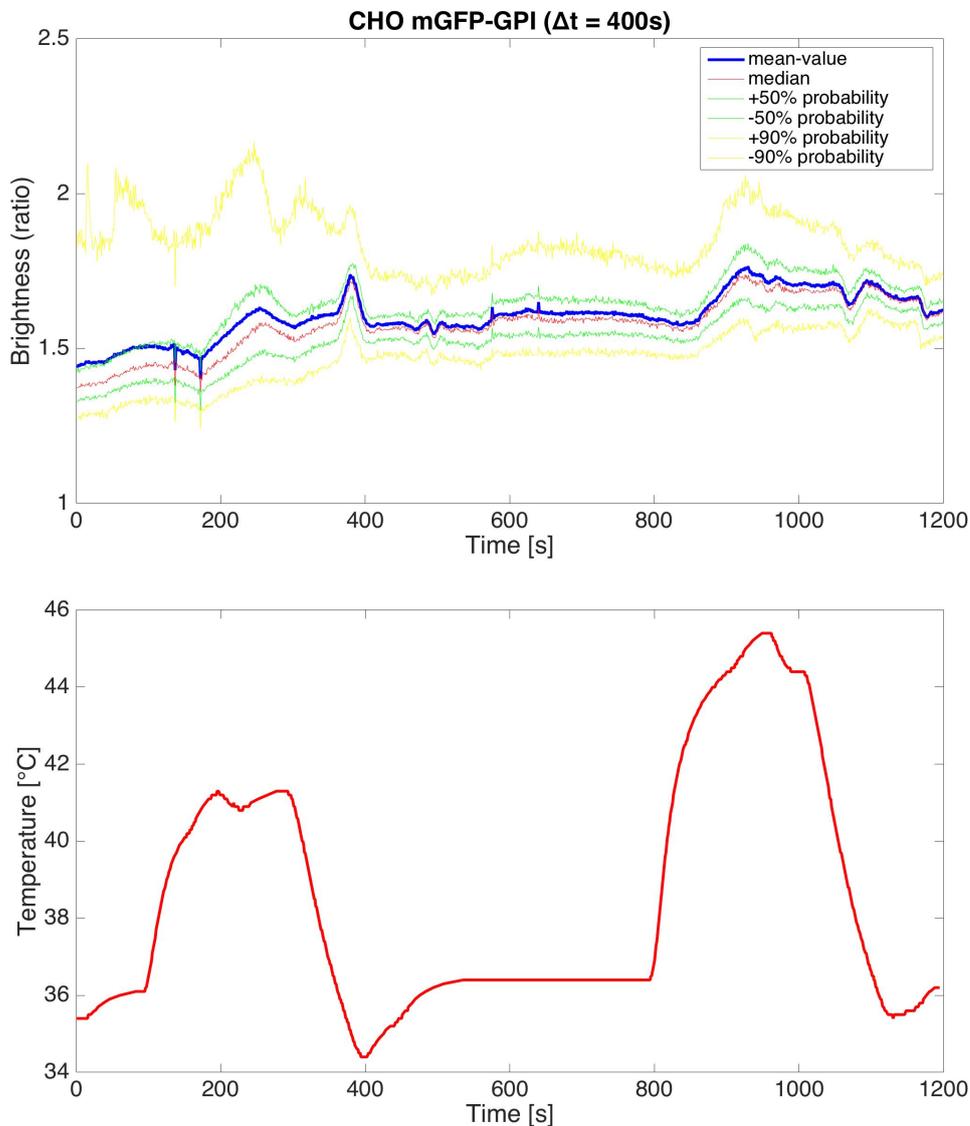


Abbildung 4.7: CHO mGFP-GPI (41°C–45°C): Dargestellt ist eine HS-Rampe, wobei sich die einzelnen Heat-Shocks voneinander unterscheiden und zeitlich verzögert sind ($\Delta t = 400s$). Die Berechnung und Beschriftung des Ca^{2+} -Signals ist analog zu Abbildung 4.5. Der Temperaturverlauf (rot) ist in der Graphik darunter illustriert. Bei beiden Heat-Shocks ist ein vergleichbarer Anstieg des Ca^{2+} -Signals zu erkennen. Das Signal erreicht ähnlich dem Temperaturverlauf ein Plateau. Erniedrigt man die Temperatur nach dem HS, reduziert sich parallel dazu das Ca^{2+} -Signal, bleibt jedoch leicht erhöht, verglichen mit dem Ausgangswert.

2 Auswirkungen von aSMase und Endozytose auf Nanostrukturen der Plasmamembran

In weiterer Folge wurde die Abhängigkeit der äußeren Zellmembran vom sauren Sphingomyelinase (aSMase)-Pfad, der Clathrin-abhängigen-Endozytose (CAE) und der Clathrin-unabhängigen-Endozytose (CUE) bei 37°C und bei 40°C untersucht. Wie in den vorausgehenden Kapiteln erwähnt, kann sowohl der aSMase-Pfad als auch die Endozytose eine mögliche Erklärung für die Stabilität von Nanoplatattformen liefern. In einer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die durch oxidierte Phospholipide induzierte Destabilisierung der Nanoplatattformen durch Blockierung der aSMase verhindert werden kann.[47] Darüber hinaus könnte auch über endozytotische Prozesse eine Umstrukturierung der Plasmamembran eintreten.[108, 109]

In einem ersten Versuch ging es daran, zu ermitteln, wie die Dichte der GFP-GPI-Moleküle der Zelle für die unterschiedlichen Szenarien (siehe Abbildung 4.9) über einen Zeitraum von 60 Minuten sowohl bei 37°C als auch bei 40°C aussieht und ob bereits hier signifikante Unterschiede erkennbar sind. Ohne TIRF sind nicht nur GFP-GPI-Moleküle auf der äußeren Plasmamembran sondern auch ein Teil der intrazellulären GFP-GPI-Moleküle sichtbar. Ein Überblick zum Experiment wird in Abbildung 4.8 gezeigt.

Um die aSMase zu unterdrücken, wurde der aSMase-Inhibitor, Nb19, verwendet. Das Toxin, Pitstop2, wurde zur Unterdrückung der CAE und CUE verwendet. Pro Szenario und Temperatur wurden 3 Lab-Tek Kammern verwendet. Für die Messungen wurde die Inkubationsbox bei SDT1 zuvor auf die gewünschten Temperaturen vorgeheizt und der Puffer im Wasserbad adäquat dazu erwärmt. Anschließend wurde die Probenoberfläche schrittweise abgefahren und die einzelnen Aufnahmen den jeweiligen Zeitintervallen zugeordnet. Die in Abbildung 4.9 angeführten Zeitpunkte (0,30,60 [min]) enthalten Aufnahmen im Intervall ± 5 min zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Probenpräparationen auf die Dichte der GFP-GPI-Moleküle wurde in Abbildung 4.9 sowohl bei 37°C als auch bei 40°C dargestellt.

2 Auswirkungen von aSMase und Endozytose auf Nanoplatattformen der PM

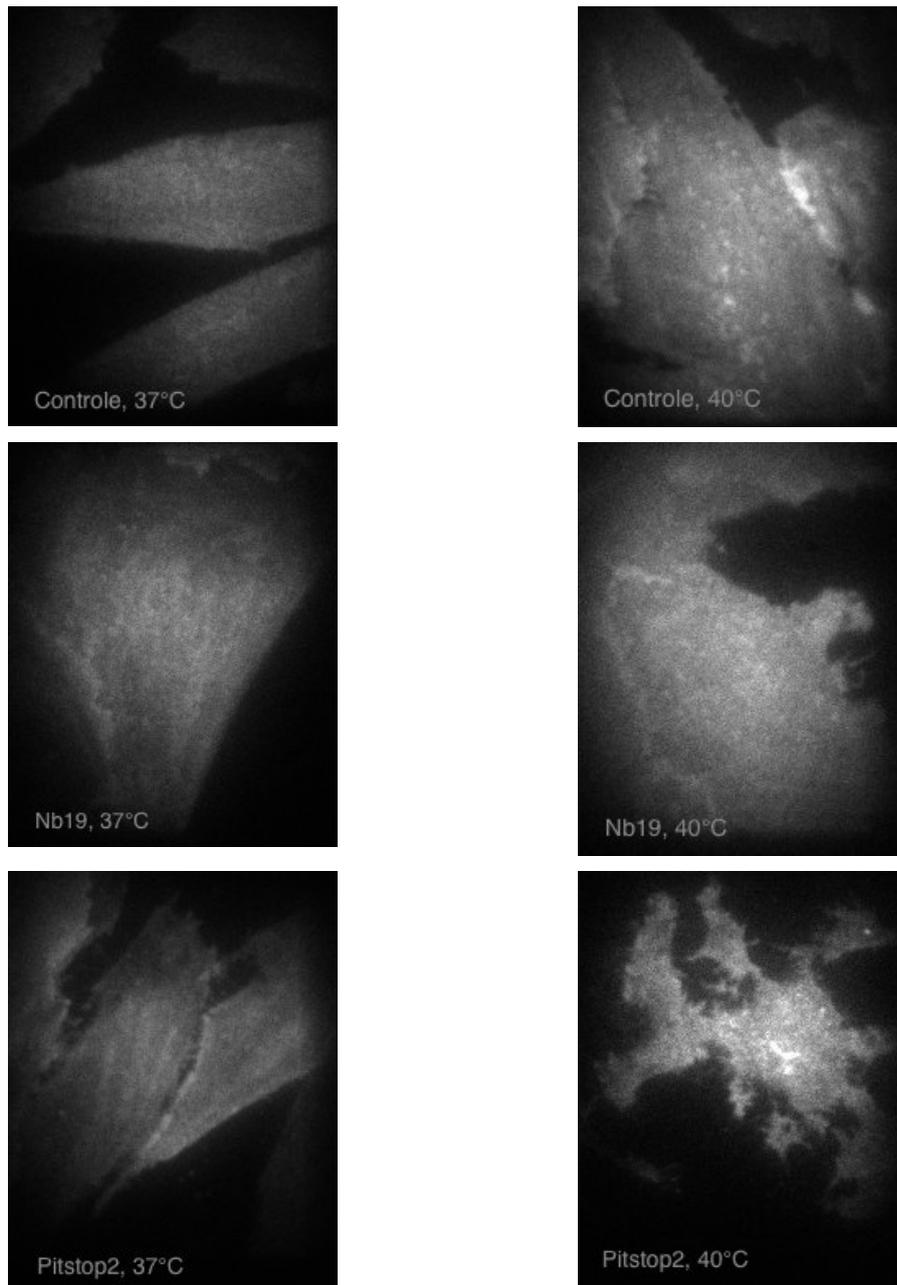


Abbildung 4.8: CHO mGFP-GPI + Nb19 / Pitstop2: Zu sehen sind Aufnahmen einzelner Zellen für die unterschiedlichen Szenarien (Kontrolle, Nb19, Pitstop2). Die Bilder wurden 30 Minuten nach Start des Experiments aufgenommen. Auf der linken Seite sind die CHO-Zellen bei 37°C dargestellt. Rechts werden die Zellen bei 40°C gezeigt. Sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Blockierung der aSMase sind bei 40°C optisch keine Unterschiede zur 37°C Messung zu erkennen. Durch Inhibierung der CAE und der CUE ist bei 40°C eine deutliche Veränderung der Zellform zu sehen. Die Zellen beginnen sich abzulösen und Zelltod tritt ein.

4 Resultate

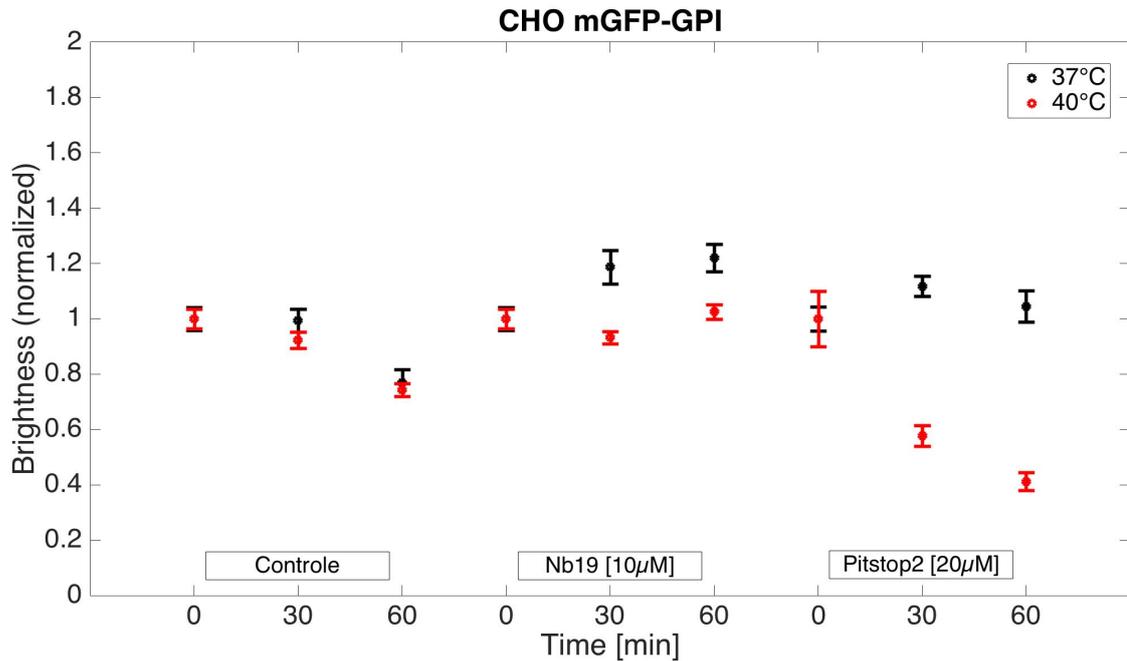


Abbildung 4.9: CHO mGFP-GPI + Nb19 / Pitstop2: Für alle drei Szenarien wurde auf den Startwert ($t = 0$) der Dichte normalisiert. Gezeigt wird die relative Änderung der Dichte an GFP-GPI-Molekülen bei 37°C und bei 40°C über einen Zeitraum von 60 Minuten (0–30–60 [min]). Die einzelnen Punkte geben den Mittelwert, die vertikalen Linien die Sicherheit des Mittelwertes an. Sowohl bei 37°C als auch bei 40°C nimmt die Dichte bei der Kontrolle mit der Zeit leicht ab. Durch Blockierung der aSMase erzielt man sowohl bei 37°C als auch bei 40°C einen stabilen Verlauf der Dichte, wobei bei 37°C der Wert sogar nach 30 Minuten leicht zunimmt. Mittels Blockierung der CAE und der CUE ist bei 37°C ein der Kontrolle ähnlicher Verlauf zu erkennen, bei 40°C tritt bei den Zellen jedoch der Zelltod ein und die Dichte reduziert sich rapide.

Sowohl bei 37°C als auch bei 40°C ist bei den unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen ein leichter Abfall der Dichte der GFP-GPI-Moleküle zu beobachten. Die Blockierung der aSMase wirkte sich dabei weder bei 37°C noch bei 40°C negativ auf die Dichte aus und wies über einen Zeitraum von 60 Minuten einen stabilen Wert auf. Bei 37°C ist sogar nach 30 Minuten ein leichter Anstieg der Dichte zu beobachten. Die Inhibierung der CAE und CUE zeigte bei 37°C einen stabilen Wert über den gesamten Messzeitraum. Bei 40°C reduzierte sich die Dichte jedoch rapide und bei den Zellen war ein Zelltod zu beobachten. Dies wird auch in Abbildung 4.8 veranschaulicht. Pistop2 sorgte demnach für ein beschleunigtes Zellsterben bei einem milden HS und ist deshalb für weitere HS-Experimente

2 Auswirkungen von aSMase und Endozytose auf Nanoplattformen der PM

nicht verwendbar.

Für die weiteren Untersuchungen konzentrierte ich mich auf die Bedeutung des aSMase-Pfades auf die Zelle. Als Erkenntnis konnte ich aus dem letzten Experiment mitnehmen, dass eine Blockierung der aSMase-Aktivität die Dichte der GFP-GPI-Moleküle sowohl bei 37°C als auch bei 40°C relativ stabil hält. Nun stellt sich aber die Frage, ob auch die Oberflächendichte der GFP-GPI-Moleküle an der extrazellulären Seite der Plasmamembran stabil bleibt oder es durch einen milden HS zu einer Änderung kommt. Dazu wurden die CHO-Zellen mit einem GFP-Booster (siehe S. 63) versehen.

Zu Beginn wurden zur Kontrolle CHO mGFP-GPI Zellen bei 37°C und bei 40°C in TIRF über einen Zeitraum von 45 Minuten analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression von GFP-GPI-Molekülen auf der äußeren Zellmembran bei 37°C innerhalb des gemessenen Zeitraumes einen stabilen Wert aufweist. Setzt man die CHO-Zellen einem milden HS aus, kommt es zu einem Abfall der GFP-GPI-Dichte. Nach 45 Minuten hat sich die Anfangsdichte um $27\% \pm 5,6\%$ reduziert.

Durch Blockierung des Sphingomyelin-Abbaus kam es bereits bei 37°C zu einem Abfall der Oberflächendichte. Nach 45 Minuten reduzierte sich der Startwert um $30,5\% \pm 6,3\%$. Bei 40°C hingegen blieb die Anzahl an GFP-GPI-Molekülen stabil. In Abbildung 4.10 ist der zeitliche Verlauf beider Szenarien dargestellt. Da nun unterschiedliche Ergebnisse für die beiden Szenarien bei 37°C und 40°C ermittelt wurden, könnte angenommen werden, dass es auch beim Grad und Anteil an Oligomeren an der äußeren Plasmamembran zu einem Unterschied kommen kann.

4 Resultate

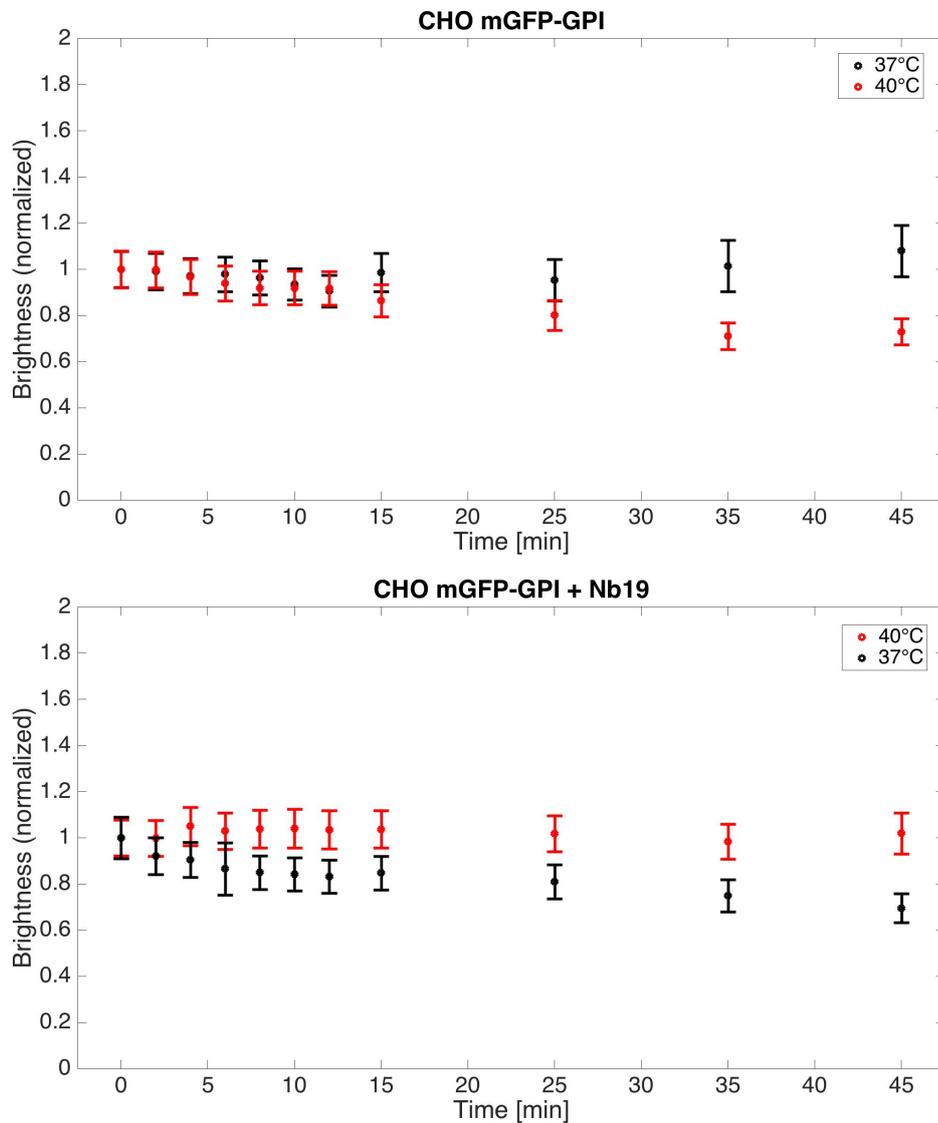


Abbildung 4.10: CHO mGFP-GPI \pm Nb19: Für beide Szenarien wurde auf den Startwert ($t = 0$) der Oberflächendichte normalisiert. Gezeigt wird die relative Änderung der Oberflächendichte der GFP-GPI-Moleküle bei 37°C und bei 40°C über einen Zeitraum von 45 Minuten. Die einzelnen Punkte geben den Mittelwert, die vertikalen Linien die Sicherheit des Mittelwertes an. Bei CHO mGFP-GPI konnte bei 37°C ein stabiler Wert der Oberflächendichte beobachtet werden. Durch einen milden HS reduzierte sich der anfängliche Wert nach 45 Minuten um $27\% \pm 5,6\%$. Durch Blockierung der aSMase reduzierte sich der Wert bei 37°C nach 45 Minuten um $30,5\% \pm 6,3\%$. Bei 40°C zeigte sich jedoch ein stabiler Wert für den gesamten Messzeitraum.

2 Auswirkungen von aSMase und Endozytose auf Nanoplatattformen der PM

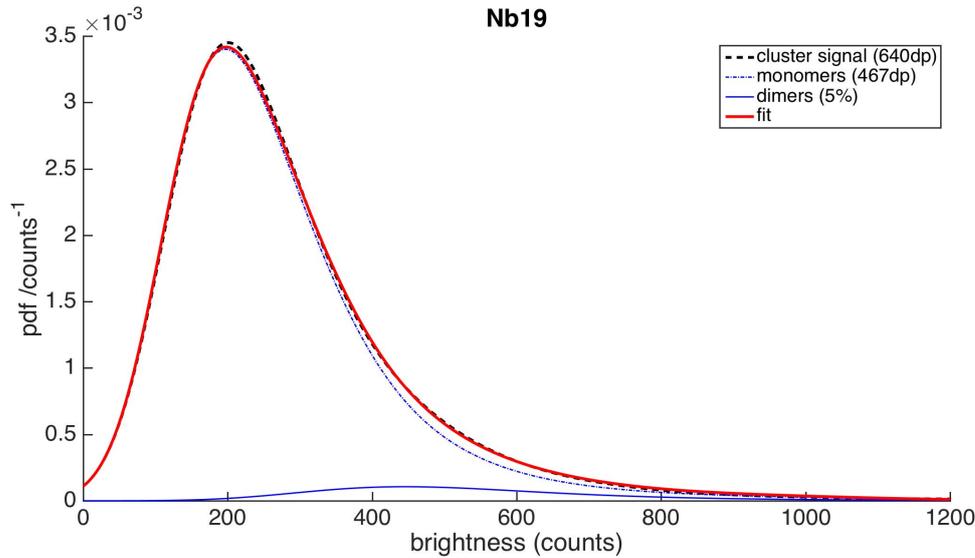


Abbildung 4.11: CHO mGFP-GPI + Nb19 (Dimer-Anteil bei 40°C): Zu sehen ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion. Die Kurven sind identisch zu Abbildung 4.1 gekennzeichnet und wurden ebenso berechnet. CHO mGFP-GPI Zellen wurden mit dem aSMase-Inhibitor Nb19 [10 μ M] behandelt und für 30 Minuten im Inkubator bei 37°C gelagert. Der Dimer-Anteil α_2 reduzierte sich durch den HS von 30% \pm 3% [47] auf 5,2% \pm 2,3%. Die Stabilität der Nanoplatattformen konnte durch Blockierung des aSMase-Pfades nicht beeinflusst werden. Die Abnahme des Dimer-Anteils α_2 ist ähnlich dem in Abbildung 4.2.

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde in einem nächsten Schritt die Stabilität der Nanoplatattformen auf der extrazellulären Seite der Zellmembran analysiert, wobei ich nun den SM-Abbau unterdrücke. Dazu wurde den CHO mGFP-GPI Zellen Nb19 [10 μ M] vorinkubiert, um die aSMase Aktivität zu unterdrücken. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde bei 40°C der Zerfall des Dimer-Anteils untersucht. In Abbildung 4.11 ist die Abnahme des Dimer-Anteils α_2 zu sehen. Durch einen HS reduziert sich die Dimer-Fraktion von 30% \pm 3% [47] auf 5,2% \pm 2,3%.

Durch Hinzugabe des aSMase-Inhibitors Nb19 konnte der Prozess des Dimer-Zerfalls durch einen HS nicht unterbunden werden. Das Endresultat des Zerfalls ähnelt dem von unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen. Die saure Sphingomyelinase spielt demnach keine tragende Rolle bei der Erhaltung der Stabilität der Nanoplatattformen auf der äußeren Seite der Plasmamembran bei einem HS.

4 Resultate

Setzt man die CHO-Zellen oxidierten Phospholipiden (1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) [$20\mu M$]) aus, kann man einen ähnlichen Zerfall der Dimere beobachten. Grund dafür ist, dass die Zellen durch Hinzugabe von POVPC in Apoptose übergehen. Dabei hat POVPC keinen direkten Effekt auf die Integrität der Nanoplatzformen, sondern auf den SM-Abbau, welche sich indirekt auf die Plasmamembran auswirkt. Dieser Prozess kann durch die Blockierung der aSMase unterdrückt werden.[47]

Als Nächstes betrachtete ich den Effekt der aSMase Aktivität auf das Ca^{2+} -Signal, wobei die CHO-Zellen verschiedenen Bedingungen ausgesetzt wurden. Durch Hinzugabe von Fura-2AM [$10\mu M$] konnten Ca^{2+} -Signale detektiert werden. Der Ablauf der einzelnen Experimente ist in Kapitel 3.6 dargestellt.

In einem ersten Versuch wurde das Ca^{2+} -Signal, ausgehend von einer Raumtemperatur, bei $37^{\circ}C$ und bei $41^{\circ}C$ analysiert. Zuvor wurde jedoch mit Hilfe von Nb19 [$10\mu M$] die aSMase Aktivität der zu untersuchenden CHO-Zellen unterdrückt (siehe S. 63). Nach 200 Sekunden wurde bei beiden Versuchen die Temperatur erhöht. Sowohl bei $37^{\circ}C$ als auch bei $41^{\circ}C$ ist ein leichter Anstieg des Ca^{2+} -Signals zu erkennen, wobei bei $41^{\circ}C$ ein Peak direkt nach dem HS zu beobachten ist. Die Intensität des Ca^{2+} -Signals ist beim HS höher als bei $37^{\circ}C$ (siehe Abbildung 4.13). Durch die Blockierung des aSMase-Pfades kann demnach die Generation eines Ca^{2+} -Signals nicht unterdrückt werden. Es ist ein ähnlicher Verlauf des mittleren Ca^{2+} -Signals zu beobachten wie ohne den aSMase-Inhibitor.

Mit Hilfe von POVPC [$20\mu M$] konnte ein signifikantes Ca^{2+} -Signal im Vergleich zu unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen erzeugt werden (siehe Abbildung 4.13 Mitte). Da durch Blockierung der aSMase der durch POVPC verursachte Zerfall der Nanoplatzformen an der Plasmamembran unterbunden werden kann, galt es nun den intrazellulären Effekt einer aSMase Deaktivierung auf POVPC zu untersuchen. Dabei kann jedoch keine direkte Korrelation zwischen dem Zerfall der Nanoplatzformen und einem Ca^{2+} -Signal hergestellt werden. Durch die Addition von Nb19 [$10\mu M$] konnte das durch POVPC provozierte Ca^{2+} -Signal inhibiert werden. Mittels einer verminderten Ceramide-Produktion konnte demnach der apoptotische Effekt von POVPC unterdrückt werden. Der Verlauf des mittleren Ca^{2+} -Signals ähnelt dabei dem von unbehandelten CHO

2 Auswirkungen von aSMase und Endozytose auf Nanoplatfformen der PM

mGFP-GPI Zellen. In Abbildung 4.13 sind die mittleren Ca^{2+} -Signale der einzelnen Messungen veranschaulicht.

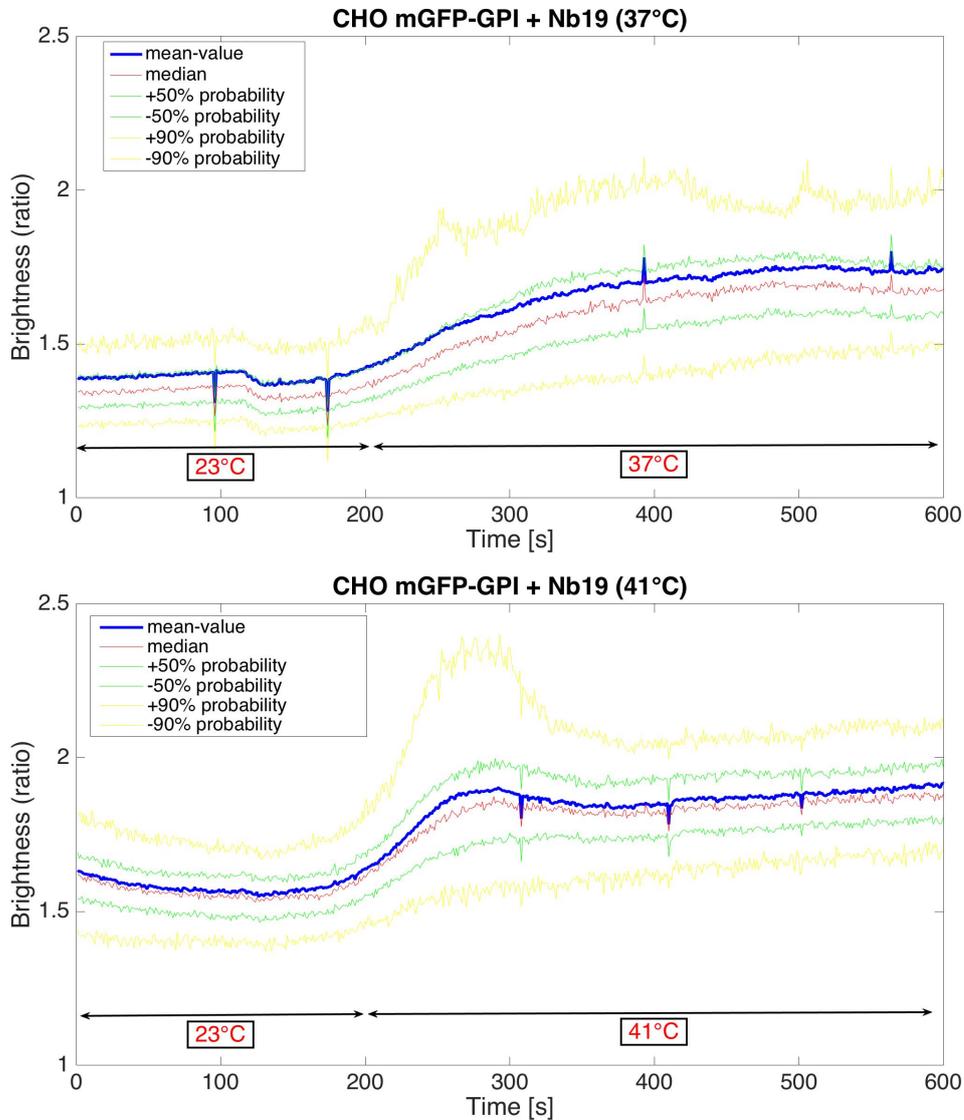


Abbildung 4.12: CHO mGFP-GPI (37°C , 41°C): Beide Graphiken zeigen den mittleren Verlauf des Ca^{2+} -Signals über den Versuchszeitraum. Sowohl bei 37°C als auch bei 41°C ist ein leichter Anstieg des Ca^{2+} -Signals zu erkennen. Der Anstieg fällt bei 41°C höher aus und es ist ein leichter Peak kurz nach Erhöhung der Temperatur zu sehen. Die unterschiedlichen Temperaturen sind mit Hilfe der schwarzen Pfeile gekennzeichnet. Die Bestimmung der einzelnen Kurven erfolgt analog zu Abbildung 4.5.

4 Resultate

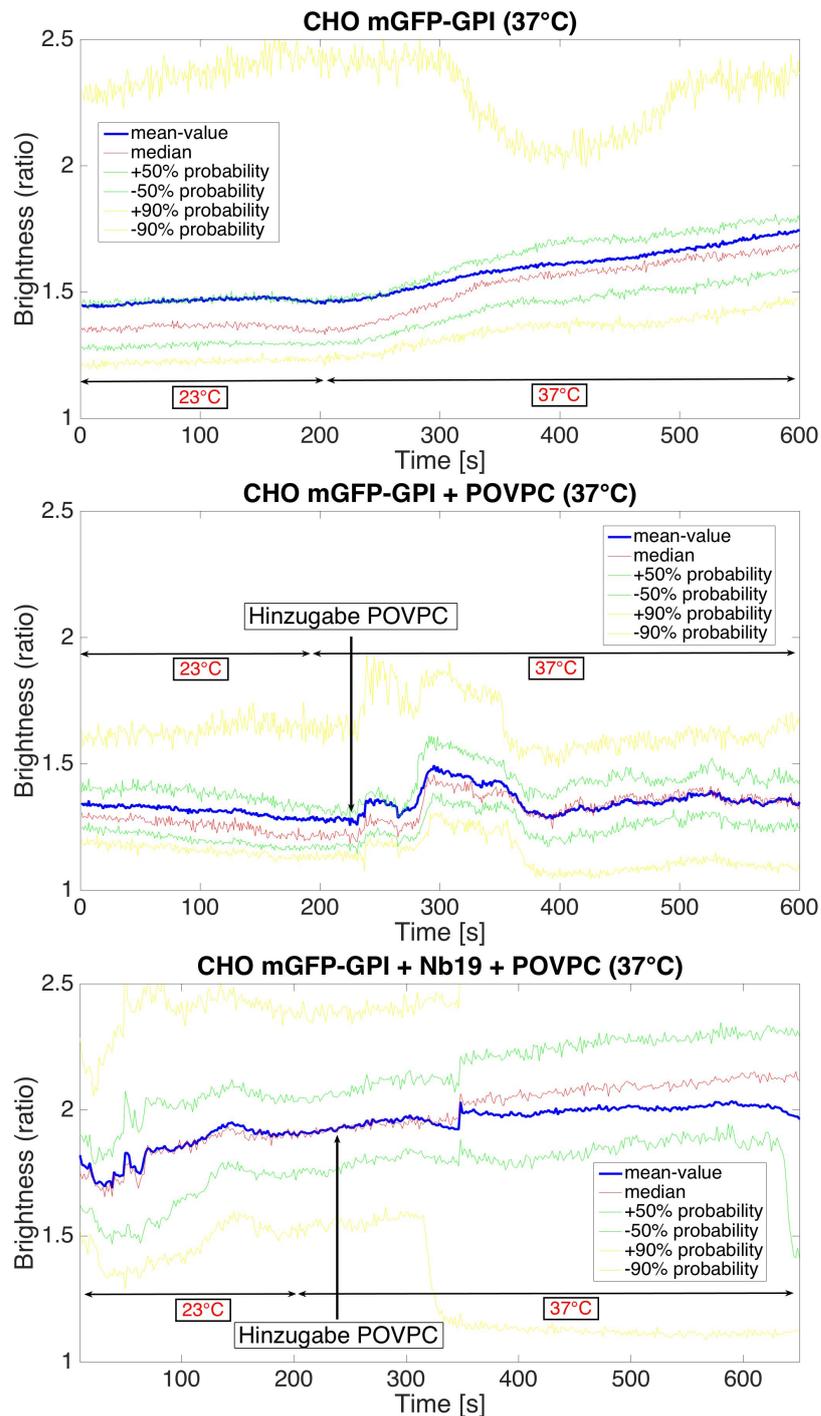


Abbildung 4.13: CHO mGFP-GPI + Nb19 + POVPC (37°C): Die Graphiken zeigen den mittleren Verlauf des Ca^{2+} -Signals über den Versuchszeitraum. Mittels oxidierten Phospholipiden (POVPC) kann ein signifikantes Ca^{2+} -Signal generiert werden. Ca^{2+} strömt bereits kurz nach Hinzugabe von POVPC in die Zelle ein. Durch Blockierung der aSMase kann dieser Effekt unterdrückt werden. Die unterschiedlichen Temperaturen sind mit Hilfe der schwarzen Pfeile gekennzeichnet. Die Bestimmung der einzelnen Kurven erfolgt analog zu Abbildung 4.5.

2 Auswirkungen von aSMase und Endozytose auf Nanoplattformen der PM

Aus den vorausgehenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass durch aSMase-Inhibierung zwar die negativen Auswirkungen von oxidierten Phospholipiden auf die Plasmamembran und ein damit verbundenes intrazelluläres Ca^{2+} -Signal unterbunden werden konnten, jedoch hatte eine Unterdrückung der aSMase Aktivität keinen positiven Effekt auf die Erhaltung der Nanoplattformen der Membran während eines HS.

3 Abhängigkeit von Plasmamembran und Zytoskelett

Ausgehend von der Modellvorstellung [23], dass eine Interaktion von Membranproteinen und dem darunterliegenden Zytoskelett die Bildung einzelner Nanodomänen beeinflusst [24, 22], wurde in einem Experiment das Toxin Latrunculin-B verwendet, um die Polymerisation von Aktin zu unterbinden.

Bei 37°C galt es die Auswirkungen von Latrunculin-B [50nM] auf die Stabilität der Nanoplatzformen der Plasmamembran von CHO mGFP-GPI Zellen zu testen. In Abbildung 4.14 ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion dieses Versuchs veranschaulicht. Bereits bei physiologischen Temperaturen ist eine starke Abnahme des Dimer-Anteils zu beobachten. α_2 reduzierte sich auf $6\% \pm 3,7\%$.

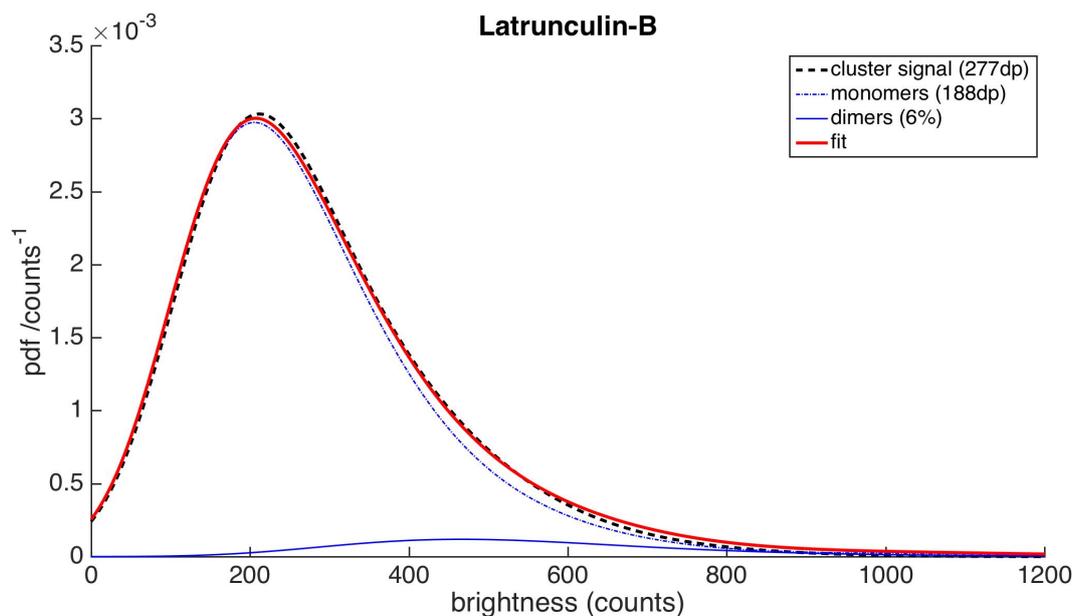


Abbildung 4.14: CHO mGFP-GPI + Lat-B (Dimer-Anteil bei 37°C): Zu sehen ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion. Die Kurven sind identisch zu Abbildung 4.1 gekennzeichnet und wurden ebenso berechnet. CHO mGFP-GPI Zellen wurden mit Latrunculin-B [50nM] versehen und für 15 Minuten im Inkubator bei 37°C gelagert. Der Dimer-Anteil α_2 reduzierte sich bereits bei 37°C auf $6\% \pm 3,7\%$. Die Stabilität der Nanoplatzformen konnte durch Hinzugabe von Latrunculin-B beeinflusst werden. Die Abnahme des Dimer-Anteils α_2 ist ähnlich dem in Abbildung 4.2.

3 Abhängigkeit von PM und Zytoskelett

Die Polymerisation von Aktin zu Mikrofilamenten spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität der Nanoplatzformen auf der Plasmamembran, wobei es sich dabei nicht zwingend um ein direktes Zusammenspiel handeln muss. Durch Inhibierung der Polymerisation von Aktin kann sich zum Beispiel das Sorting ändern, was in weiterer Folge Auswirkungen auf die Nanoplatzformen haben kann. Das Experiment gibt demnach keine Auskunft darüber, ob ein direkter oder indirekter Mechanismus für die Destabilisierung der Nanoplatzformen verantwortlich ist.

4 FRET-Effizienz während eines Heat-Shocks

In den vorausgegangenen Experimenten wurde der Fokus auf die Stabilität von Nanoplatattformen der Plasmamembran und der damit verbundenen intrazellulären Antwort unter verschiedenen Bedingungen gelegt. Nun ging es daran, den Zeitverlauf des FRET-Signals während eines milden HS auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran zu analysieren, um eine etwaige Korrelation mit den vorausgehenden Experimenten festzustellen. Dabei handelt es sich jedoch nicht um eine Einzelmolekülanalyse, sondern um eine Bulkmesung. Durch das selektive Ausbleichen des Akzeptors kann aus den Intensitäten vor (I_{bb}) und nach (I_{ab}) dem Bleichen die FRET-Effizienz über die Regeneration des Donors berechnet werden (siehe Kapitel 4.2).

Dazu wurden modifizierte CHO-GPI Zellen verwendet, an deren GPI-Anker das SNAP Protein verankert wurde (siehe S. 62). Mit Hilfe von SNAP können unterschiedliche Farbstoffe gebunden werden. Hier wurde für den Donor Dy549 [250nM] und für den Akzeptor A647 [200nM] verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaffinität der einzelnen Fluorophore an das SNAP Protein wurden verschiedene Konzentrationen verwendet. Die CHO-Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten einem HS von 41°C ausgesetzt. Dazu wurde die Inkubationsbox auf 41°C aufgeheizt und der Puffer im Wasserbad ebenfalls auf 41°C erwärmt. In Abbildung 4.15 ist der zeitliche Verlauf des FRET-Signals veranschaulicht. Um ausreichend Statistik zu erhalten, wurden mehrere Proben (4 Lab-Tek Kammern) verwendet. Die Zellen wurden mit geeigneten Lasern (siehe S. 71) angeregt. Die Helligkeitswerte im grünen Kanal wurden vor und nach dem Bleichpuls in einem ausgewählten Bereich der Zellmembran analysiert. Unter Berücksichtigung des Hintergrundes und eines Korrekturfaktors ergibt sich aus der Differenz dieser Werte der prozentuelle Anteil des FRET-Signals (siehe S. 78). Die gemessenen Zellen wurden in den Zeitintervallen (0–5, 5–10, 10–15, 15–20, 20–25 und 25–30 [min]) gemittelt. Für jeden daraus errechneten Mittelwert wurden mindesten 5 Zellen verwendet.

4 FRET-Effizienz während eines Heat-Shocks

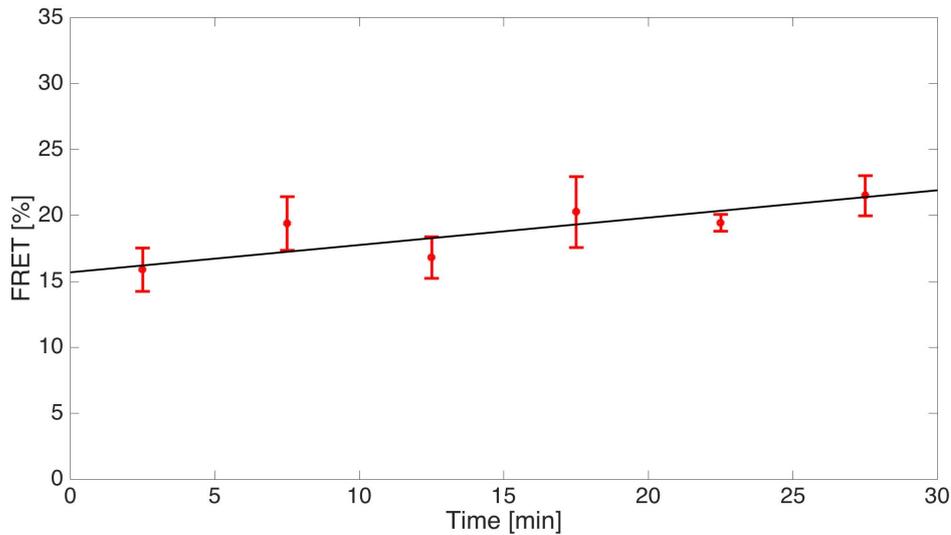


Abbildung 4.15: Zu sehen ist die FRET-Effizienz von CHO-SNAP Zellen bei 41°C. A647 und Dy549 wurden als Farbstoffe verwendet. Die roten Punkte zeigen die mittlere FRET-Effizienz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Pro Datenpunkt wurden mehrere Zellen (≥ 5 Zellen) verwendet, wobei die einzelnen Zellen aus den Zeitintervallen 0–5, 5–10, 10–15, 15–20, 20–25 und 25–30 Minuten stammen. Die roten, vertikalen Linien geben die Sicherheit des Mittelwertes an. Bei der schwarzen Linie handelt es sich um einen linearen Fit. Ausgehend von einer Effizienz von 15,92% erhöht sich das Signal linear mit der Zeit auf 21,52% nach 30 Minuten.

Überraschenderweise weist das FRET-Signal bei einem HS ein umgekehrtes Verhalten als die zuvor bei CHO mGFP-GPI ermittelte Dimer-Fraktion auf. Vergleicht man Abbildung 4.15 mit Abbildung 4.3 erkennt man, dass im Gegensatz zum exponentiellen Abfall des Dimer-Anteils die FRET-Effizienz bei einem HS mit der Zeit zunimmt. Ausgehend von einem Wert von 15,92% erhöht sich dieser nach 30 Minuten auf 21,52%. Um eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis zu bekommen, wurde zu jeder gemessenen Zelle der dazugehörige Wert für die Oberflächendichte ermittelt. In Abbildung 4.16 wurde die FRET-Effizienz über die Oberflächendichte geplottet. Hier ist zu sehen, dass die FRET-Ausbeute in Abhängigkeit zur Oberflächendichte steht. Je höher also die Dichte an Proteinen, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion und in weiterer Folge eines Energietransfers. Der beobachtete Anstieg der FRET-Effizienz kann dadurch nicht in direkten Zusammenhang mit der Destabilisierung von Nanoplattformen auf der Zellmembran gebracht werden. Wahrscheinlicher ist es,

4 Resultate

dass durch die Erhöhung der Temperatur Donor–Akzeptor Komplexe destabilisiert werden. Alleine daraus würde man aber eher vermuten, dass sich das FRET–Signal während des HS reduzieren würde. Doch durch die erhöhte Dichte der Moleküle auf der Plasmamembran ist die Distanz zwischen den einzelnen Molekülen geringer als bei einer niedrigen Dichte. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen Donor und Akzeptor an. Je höher die Dichte an Molekülen, desto wahrscheinlicher ist deshalb, dass ein FRET–Signal entsteht. Bei den gemessenen FRET–Signalen handelt es sich demnach um zufälligen FRET.

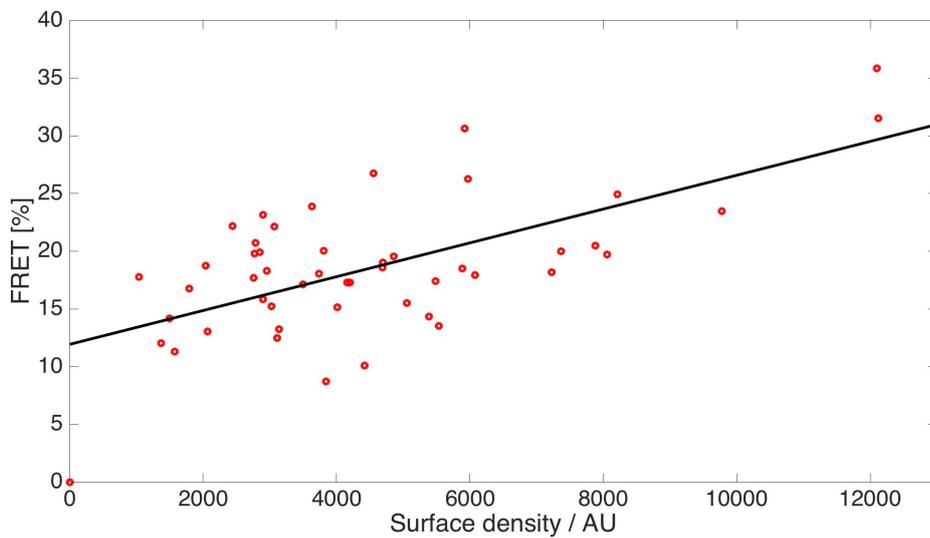


Abbildung 4.16: Hier wurde die FRET–Effizienz von CHO–SNAP Zellen, markiert mit den Fluorophoren A647 und Dy549, in Abhängigkeit zur Oberflächendichte gesetzt. Die roten Punkte stehen hierbei für die einzelnen, gemessenen Zellen. Die schwarze Linie stellt einen Korrelationsfit dar. Der Korrelationskoeffizient beträgt dabei 0,636. Durch Zunahme der Oberflächendichte nimmt auch das FRET–Signal zu.

5 Zusammenfassung

Setzt man Zellen einem Heat-Shock aus, kann man bereits bei einer Erhöhung von $\sim 3^\circ\text{C}$ über normalen, physiologischen Temperaturen sowohl einen deutlichen Effekt auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran als auch einen intrazellulären Effekt beobachten. Den genauen Grund dafür bzw. ein detailliertes Modellsystem, das diese Vorgänge veranschaulicht und miteinander in Verbindung bringt, sucht man bis jetzt noch vergeblich.

Im Laufe dieser Arbeit wurde auf unterschiedliche Fragestellungen zu diesem Thema eingegangen, wobei jedoch nur Fragmente dieses komplexen Themas abgehandelt werden konnten. Vergleicht man nun abschließend alle ermittelten Ergebnisse der einzelnen Messungen der Dimer-Fractionen von CHO mGFP-GPI Zellen, ergeben sich bei den verschiedenen Experimenten folgende Werte für den Dimer-Anteil und die Diffusionsrate (siehe Abbildung 5.1).

Bei unbehandelten CHO mGFP-GPI Zellen beträgt der durchschnittliche Dimer-Anteil bei 37°C $28\% \pm 3\%$. Setzt man die Zellen einem HS von 40°C aus, reduziert sich dieser Anteil auf $5\% \pm 1,9\%$. Der dazugehörige Zeitverlauf des Dimer-Zerfalls und -Aufbaus wird in Abbildung 4.3 und 4.4 veranschaulicht. Die Diffusionsrate beläuft sich bei 37°C auf $1,2 \pm 0,17 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und reduziert sich bei 40°C auf $1,16 \pm 0,17 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Beweglichkeit der einzelnen Moleküle bleibt demnach selbst bei einem HS relativ stabil.

Durch Hinzugabe von Latrunculin-B wird die Integrität der Nanoplatattformen auf der äußeren Seite der Zellmembran gestört und die Dimer-Fraktion minimiert sich bereits bei 37°C auf $6\% \pm 3,7\%$. Die Diffusionsrate beträgt hierbei $1,26 \pm 0,15 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Unterdrückung der Aktinpolymerisation spielt demnach eine Rolle beim Abbau der Nanoplatattformen.

Bei mit dem aSMase-Inhibitor, Nb19, behandelten CHO-Zellen konnte weder bei 37°C noch bei 40°C ein von unbehandelten Zellen abweichendes Verhalten

5 Zusammenfassung

der Dimer-Fraktion beobachtet werden. Bei 37°C belief sich α_2 auf $30\% \pm 3\%$. [47] Dieser Anteil reduzierte sich durch einen HS auf $5\% \pm 2,4\%$. Eine Unterdrückung des Sphingomyelin-Abbaus hat demnach keinen positiven Effekt auf die Stabilität der Nanoplatattformen auf der äußeren Seite der Zellmembran. Die Diffusionsrate ist jedoch bei 40°C im Vergleich zu den anderen Messungen leicht erhöht und beläuft sich auf $1,39 \pm 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Sowohl bei CHO mGFP-GPI als auch bei CHO mGFP-GPI + Nb19 (Blockierung aSMase) konnte auch eine teilweise Veränderung der Expression von GFP-GPI-Molekülen und ihrem Vorkommen auf der äußeren Plasmamembran bei 37°C und 40°C beobachtet werden (siehe Abbildungen 4.9 & 4.10). Zusätzlich zu diesen Auswirkungen konnte bei einem HS eine intrazelluläre Reaktion in Form eines Ca^{2+} -Signals beobachtet werden. Daraus lassen sich nun folgende Schlüsse ziehen.

Nanoplatattformen zerfallen durch einen Heat-Shock. Innerhalb des untersuchten Zeitraumes zerfallen die Nanoplatattformen kontinuierlich, wobei sich der Anteil an Dimeren bereits nach wenigen Minuten halbiert und dann gegen einen Grenzwert strebt (siehe Abbildung 4.3). Innerhalb des angeführten Zeitfensters regeneriert sich der Anteil an Nanoplatattformen nur bedingt und nimmt nicht den Startwert ein (siehe Abbildung 4.4).

Die Expression von GFP-GPI-Molekülen ist sowohl bei 37°C als auch bei 40°C identisch und nimmt nach 60 Minuten leicht ab. Hingegen weist die Oberflächendichte der GFP-GPI-Moleküle auf der äußeren Zellmembran bei 37°C einen stabilen Wert auf und nimmt durch einen HS ab (siehe Abbildungen 4.9 & 4.10). Da in beiden Fällen die Expression von GFP-GPI-Molekülen beinahe identisch ist, ist hier kein Hinweis für den Zerfall der Nanoplatattformen durch einen HS zu sehen. Durch einen verminderten Transport von GFP-GPI-Molekülen zur extrazellulären Seite der Plasmamembran sinkt jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass abgebaute Nanoplatattformen durch neue Nanoplatattformen aus dem Zellinneren nachbesetzt werden. Dies könnte ein Grund für eine Reduktion des Dimer-Anteils α_2 sein.

Durch Unterdrückung des Sphingomyelin-Abbaus kann der Zerfall von Nanoplatattformen durch einen Heat-Shock nicht inhibiert werden. Der Zerfallsprozess läuft demnach nicht über den aSMase-Pfad ab. Vergleicht man die Expression

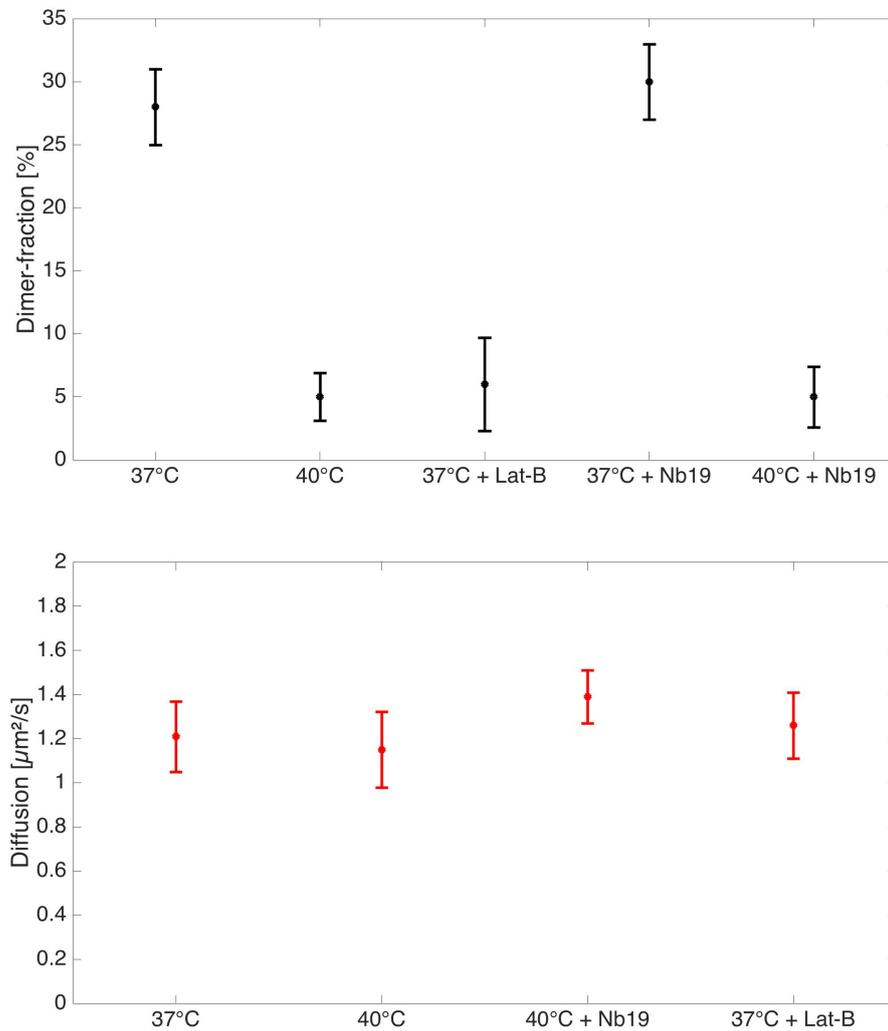


Abbildung 5.1: Veranschaulicht werden die Dimer-Anteile (schwarz) und dazugehörigen Diffusionsraten (rot) sämtlicher Experimente. Dabei wurden bei allen Versuchen CHO mGFP-GPI Zellen verwendet. Sowohl bei der Kontrolle als auch bei mit Nb19 präparierten Zellen wurde das Verhalten der Plasmamembran bei 37°C und bei 40°C analysiert. Bei beiden Proben tritt eine starke Abnahme der Dimer-Fraktion nach einem HS auf (5–10%). Bei 37°C weisen beide einen ähnlichen Anteil an Dimeren auf (20–30%). Die Auswirkungen von Latrunculin-B wurden nur bei 37°C analysiert. Auch hier reduziert sich der Dimer-Anteil stark (6%). Die Diffusionsrate bewegt sich bei allen Messungen im Bereich von 1,15 – 1,4 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Die vertikalen Linien geben die Sicherheit des Mittelwertes an.

5 Zusammenfassung

der GFP–GPI–Moleküle der Zelle, stößt man auf eine erhöhte Dichte bei 37°C. Die Blockierung der aSMase hat demnach einen positiven Effekt auf die Expression von GFP–GPI–Molekülen. Die Oberflächendichte des GFP–GPI nimmt jedoch innerhalb des untersuchten Zeitraumes ab, wobei der Anteil an Nanoplatfformen konstant bleibt. Die Unterdrückung des SM–Abbaus kann hierbei Auswirkungen auf die Sortierung der einzelnen Moleküle haben. Bei 40°C ist die Expression von GFP–GPI–Molekülen über den Messzeitraum hinweg konstant. Ebenfalls weist die Oberflächendichte der GFP–GPI–Moleküle einen stabilen Wert für diese Dauer auf. Die erhöhte Expression von GFP–GPI–Molekülen bleibt bei einem milden HS aus, dafür bleibt die Oberflächendichte des GFP–GPI auf der äußeren Plasmamembran konstant. Eine verminderte Nachbesetzung von GFP–GPI–Molekülen kann im Vergleich zur 37°C–Messung nicht beobachtet werden. Beide Szenarien (CHO mGFP–GPI ± Nb19) sind anhand einer Modellvorstellung in Abbildung 5.2 illustriert. Um dies zu verifizieren, sind Reproduktionen dieser Experimente geplant.

Zu Beginn wurde angenommen, dass durch eine erhöhte Oberflächendichte die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion der einzelnen Monomere höher ist und dadurch die Entstehung von Oligomeren erleichtert wird. Da jedoch unabhängig von der Oberflächendichte der GFP–GPI–Moleküle sich die Nanoplatfformen durch einen Heat–Shock auflösen, liegt die Vermutung nahe, dass sich die Nanoplatfformen intrazellulär bilden und über Transportprozesse als Monomere oder Oligomere an die äußere Zellmembran geliefert werden. Um diesen Verdacht zu bestätigen, sind Experimente zur Messung des Grades und des Anteils von Oligomeren im Zellinneren (z. B. Endoplasmatisches Reticulum) geplant.

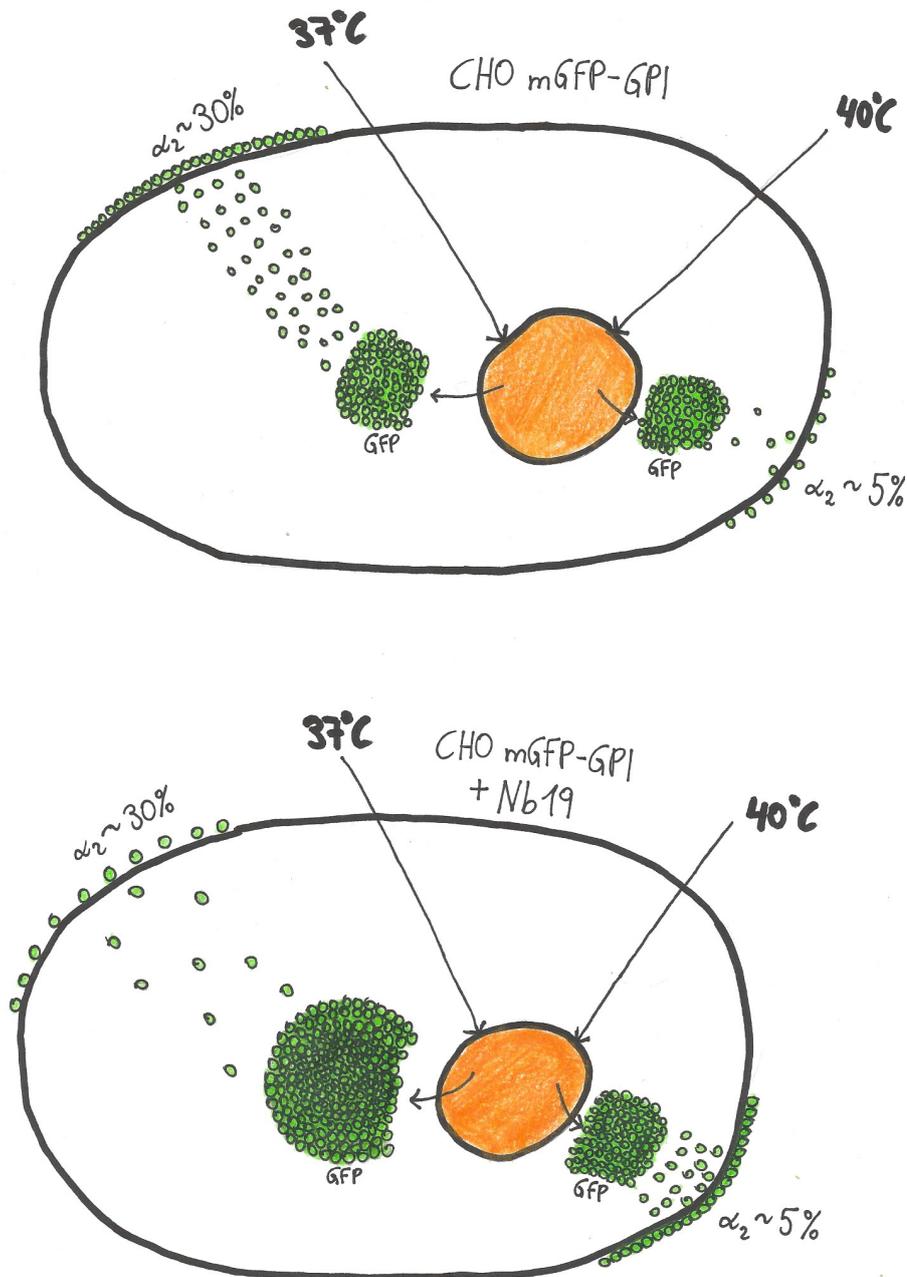


Abbildung 5.2: Zu sehen sind die beiden unterschiedlichen Szenarien für die Verteilung des intrazellulären und extrazellulären GFP-GPI-Moleküls. Bei unbehandelten CHO-Zellen ist die Expression der GFP-GPI-Moleküle sowohl für 37°C als auch 40°C fast identisch. Die Oberflächendichte der GFP-GPI-Moleküle und auch die Dimer-Fraktion sind hingegen bei 37°C höher als bei 40°C. Durch Blockierung des SM-Abbaus steigt bei 37°C die Expression des GFP-GPI-Moleküls, andererseits nimmt die Oberflächendichte des GFP-GPI, nicht jedoch der Dimer-Anteil, ab. Durch den milden HS bleibt sowohl die Expression als auch die Oberflächendichte stabil. Die Nanoplattförmigen lösen sich dennoch auf.

5 Zusammenfassung

Darüber hinaus wurde eine Abnahme der Nanoplatfformen auf der äußeren Seite der Zellmembran durch Unterdrückung der Polymerisation von Aktin ermittelt. Um eine genauere Korrelation der Nanoplatfformen mit dem darunterliegenden Zytoskelett zu erhalten, sind TOCCSL-Experimente zur Oligomerisation des kortikalen Aktins bei physiologischen und HS-Temperaturen geplant. Sollte der Grad und Anteil an Oligomeren des Aktins mit denen der Nanoplatfformen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran korrelieren, könnte man darin eine Erklärung für die Stabilität der Nanoplatfformen finden.

Neben einer Umstrukturierung der Plasmamembran durch einen HS ist auch eine intrazelluläre Reaktion zu beobachten. Durch einen HS wird ein Ca^{2+} -Signal verursacht. Die einzelnen Signale zeigen Oszillationen. Durch mehrere, aufeinanderfolgende, zeitlich getrennte Heat-Shocks können mehrere Ca^{2+} -Signale generiert werden. Durch Blockierung der aSMase kann ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal durch einen HS nicht verhindert werden. Die Hinzugabe von oxidierten Phospholipiden (POVPC) provoziert bereits bei 37°C ein deutliches Ca^{2+} -Signal. Dies kann durch eine Unterdrückung des SM-Abbaus verhindert werden. Bei oxidierten Phospholipiden wird ein Anstieg des Ca^{2+} -Signals über den aSMase-Pfad induziert.

Welcher genaue intrazelluläre Prozess durch einen HS aktiviert wird und ob Ca^{2+} direkt oder indirekt für den Zerfall der Nanoplatfformen verantwortlich ist, ist anhand der durchgeführten Experimente bis jetzt noch unklar. Durch die Bedeutung des Ca^{2+} als zellulärer Botenstoff kann ein Anstieg des Ca^{2+} innerhalb der Zelle einen Prozess auslösen, der sowohl den Zerfall von Oligomeren fördert als auch Auswirkungen auf Transportprozesse der Zelle hat.

Auch wenn im Laufe dieser Arbeit etwas Licht in dieses komplexe Thema gebracht werden konnte, bleiben dennoch zwei entscheidende Fragen offen. Über welchen zellulären Pfad bewirkt ein Heat-Shock den Zerfall von Nanoplatfformen auf der äußeren Zellmembran? Wo und wie bilden sich die Nanoplatfformen? Die bereits vorgeschlagenen Experimente könnten, mit etwas Glück, zu einer Lösung dieser Fragen führen.

Abkürzungsverzeichnis

ADP Adenosindiphosphat

AOM Akustooptischer Modulator

AS Aminosäure

aSMase saure Sphingomyelinase

ASS Aminosäuresequenz

ATP Adenosintriphosphat

Ca^{2+} Kalzium

CAE Clathrin-abhängige-Endozytose

CaM Calmodulin

CaMK2 Calmodulin Proteinkinase 2

CUE Clathrin-unabhängige-Endozytose

CH Kohlenwasserstoff

CHO Chinese Hamster Ovary

CK2 Casein Kinase 2

COase Cholesteroxidase

Da Dalton

DAG Diacylglycerol

5 Zusammenfassung

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNS Desoxyribonukleinsäure

DNP 2,4-Dinitrophenol

EGF Epidermal Growth Factor

EM Elektronen-Multiplier

ER Endoplasmatisches Reticulum

ERK1/2 Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2

F-Aktin filamentöses Aktin

FCS Fetal Calf Serum

FRAP Fluorescence Recovery after Photobleaching

FRET Förster-Resonanzenergietransfer

G-Aktin globuläres Aktin

GDP Guanosindiphosphat

GPI Glycosylphosphatidylinositol

GTP Guanosintriphosphat

HBSS Hanks' Balanced Salt Solution

HS Heat-Shock

HSBP-1 Heat-Shock-bindendes Protein-1

HSFs Heat-Shock-Transkriptionsfaktoren

HSF-1 Heat-Shock-Transkriptionsfaktor-1

HSP Heat-Shock-Protein

HSPs Heat-Shock-Proteine

HSR Heat-Shock-Response

IP3 Inositoltriphosphat

MAPK Mitogenaktivierte Proteinkinasen

mGFP monomerisches Grün fluorizierendes Protein

MSD mittlere quadratische Verschiebung

MW Mittelwert

NA numerische Apertur

NEF Nukleotid Austauschfaktor

NS Nanostrukturen

OH Hydroxy

PALM photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PC Phosphatidylcholine

pdf Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion

PE Phosphatidylethanolamine

PI Phosphatidylinositol

PIP2 Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat

PKC Proteinkinase C

PLA₂ Phospholipase A₂

PLC Phospholipase C

PM Plasmamembran

POVPC 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

5 Zusammenfassung

PS Phosphatidylserine

RNS Ribonukleinsäure

ROI Region of Interest

SBD Substrat bindende Domäne

SDT 1 Setup 1

SDT 3 Setup 3

sHSP kleine Heat-Shock-Proteine

SM Sphingomyelin

SPT Single Particle Tracking

Std Standardabweichung

STED Stimulated Emission Depletion

STORM Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

TF Transkriptionsfaktor

TIRF Interne Totalreflexionsfluoreszenz

TOCCSL Thinning Out Clusters while Conserving Stochiometry of Labeling

TRP transient receptor potential

ZSA zelluläre Stress-Antwort

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Zelle-Überblick	2
1.2	Phospholipide	6
1.3	Membrantransport	12
1.4	Rezeptorklassen auf der Plasmamembran	13
1.5	zelluläre Stress-Antwort (ZSA)	18
1.6	Heat-Shock-Response (HSR)	21
1.7	Die Entdeckung der Heat-Shock-Proteine	23
1.8	Heat-Shock-Protein 90	26
1.9	Heat-Shock-Protein 40	29
1.10	Heat-Shock-Protein 70	31
1.11	Heat-Shock-Protein 60	32
1.12	Förster-Resonanzenergietransfer	47
1.13	TOCCSL	50
3.1	Berechnung der Diffusionskonstante	77
3.2	FRET-Aufnahme: Übersicht	78
3.3	Ca^{2+} -Messung: Übersicht	80
3.4	Ca^{2+} -Detektion (Canny Edge Detection)	82
4.1	CHO mGFP-GPI: Dimer-Anteil bei 37°C	84
4.2	CHO mGFP-GPI: Dimer-Anteil bei 40°C	85
4.3	CHO mGFP-GPI: Dimer-Zerfall bei 41°C	86
4.4	CHO mGFP-GPI: Dimer-Aufbau nach HS (41°C)	88
4.5	CHO mGFP-GPI: HS (37°C , 41°C)	90
4.6	CHO mGFP-GPI: HS-Rampe (41°C- 41°C)	91
4.7	CHO mGFP-GPI: HS-Rampe (41°C- 45°C)	93
4.8	CHO mGFP-GPI + Nb19 / Pitstop2: Übersicht	95

Abbildungsverzeichnis

4.9	CHO mGFP-GPI + Nb19 / Pitstop2: Dichte GFP-GPI (Zeitverlauf)	96
4.10	Oberflächendichte: CHO mGFP-GPI ± Nb19	98
4.11	CHO mGFP-GPI + Nb19: Dimer-Anteil bei 40°C	99
4.12	CHO mGFP-GPI + Nb19: HS (37°C, 41°C)	101
4.13	CHO mGFP-GPI + Nb19 + POVPC: 37°C	102
4.14	CHO mGFP-GPI + Lat-B: Dimer-Anteil bei 37°C	104
4.15	CHO-SNAP + A647 / Dy549: FRET-Effizienz bei 41°C	107
4.16	CHO-SNAP + A647 / Dy549: FRET-Effizienz in Abhängigkeit der Oberflächendichte	108
5.1	CHO mGFP-GPI: Dimer-Anteil und Diffusionsrate sämtlicher Experimente	111
5.2	zelluläre Verteilung des GFP-GPI-Moleküls	113

Tabellenverzeichnis

1.1	ZSA-Reaktionsmechanismen	18
3.1	Messprotokoll CHO mGFP-GPI	69
3.2	Messprotokoll GFP-GPI-Dichte	70
3.3	Messprotokoll GFP-GPI-Oberflächendichte	70
3.4	Aufnahme FRET: CHO SNAP + AF647 / D549	72
3.5	Messprotokoll FRET: CHO SNAP + AF647 / D549	72
3.6	Messprotokoll Ca^{2+} -Messungen	73
3.7	Heat-Shock bei Ca^{2+} -Messungen	74

Literaturverzeichnis

- [1] E. Bianconia , A. Piovesana , F. Facchina , A. Beraudib , R. Casadeic , F. Frabettia , L. Vitalea , M. C. Pelleria , S. Tassanid , F. Pivae , S. Perez-Amodiof , P. Strippoli , S. Canaidera. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40(6):463–471, 2013.
- [2] R. Bakthisaran , R. Tangirala , Ch. M. Rao. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(4):291–319, 2014.
- [3] D. Sharma , D. C. Masison. Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein & Peptide Letters*, 16(6):571–581, 2009.
- [4] P. Mandrekar , D. Catalano , V. Jeliaskova , K. Kodys. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for *tnf-alpha* regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(5):1335–1345, 2008.
- [5] Y. Cao , N. Ohwatari , T. Matsumoto , M. Kosaka , A. Ohtsuru , S. Yamashita. Tgf-beta1 mediates 70-kda heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts. *European Journal of Physiology*, 438(3):239–244, 1999.
- [6] R.K. Leak. Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. *Journal of Cell Communication and Signalling*, 8(4):293–310, 2014.
- [7] G.D. Lianos , G.A. Alexiou , A. Mangano , A. Mangano , S. Rausei , L. Boni , G. Dionigi , D.H. Roukos. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters*, 360(2):114–118, 2015.
- [8] B. Alberts , A. Johnson , J. Lewis , D. Morgan , M. Raff , K. Roberts , P. Walter. *Molecular Biology of THE CELL*, volume 5. Garland Science , Taylor & Francis Group, 2007.
- [9] G.M. Cooper. *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2 edition, 2000.

Literaturverzeichnis

- [10] D. M. Engelman. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438:578–580, 2005.
- [11] J. Koolman , K.-H. Röhm. *Taschenatlas Biochemie des Menschen*, volume 4. Georg Thieme Verlag, 2009.
- [12] P. S. Niemelä , M. T. Hyvönen , I. Vattulainen. Influence of chain length and unsaturation on sphingomyelin bilayers. *Biophysical Journal*, 90(3):851–863, 2006.
- [13] F. Yarrow. An afm study of solid-phase bilayers of unsaturated pc lipids and the lateral distribution of the transmembrane model peptide walp23 in these bilayers. *European Biophysics Journal*, 40(7):825–833, 2011.
- [14] F. Yarrow , T.J.H. Vlugt , J.P.J.M. van der Eerden , M.M.E. Snel. Melting of a dppc lipid bilayer observed with atomic force microscopy and computer simulation. *Journal of Crystal Growth*, 275:1417–1421, 2005.
- [15] S. Komura , H. Shirotori , P. D. Olmsted , D. Andelman. Lateral phase separation in mixtures of lipids and cholesterol. *Europhysics Letters*, 67(2), 2004.
- [16] C. Reich , M. R. Horton , B. Krause , A. P. Gast , J. O. Rädler , B. Nickel. Asymmetric structural features in single supported lipid bilayers containing cholesterol and gm1 resolved with synchrotron x-ray reflectivity. *Biophysical Journal*, 95(2):657–668, 2008.
- [17] M. Brameshuber. Toccs1 – eine neue methode zur detektion von nanoskopischen molekülclustern. Master’s thesis, Institut für Biophysik, Johannes Kepler Universität Linz, 2004.
- [18] I. Levental , M. Grzybek , K. Simons. Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry*, 49(30):6305–6316, 2010.
- [19] E. Sevcsik , G. J. Schütz. With or without rafts? alternative views on cell membranes. *BioEssays*, 38(2):129–139, 2016.
- [20] L. J. Pike. Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47, 2006.
- [21] S. Munro. Lipid rafts elusive or illusive? *Cell*, 115(4):377–388, 2003.

- [22] D. Goswami , K. Gowrishankar , S. Bilgrami , S. Ghosh , R. Raghupathy , R. Chadda , R. Vishwakarma , M. Rao , S. Mayor. Nanoclusters of gpi-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell*, 135(6):1085–1097, 2008.
- [23] K. Gowrishankar , S. Ghosh , C.R. Saha , S. Mayor , M. Rao. Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules. *Cell*, 149(6):1353–1367, 2012.
- [24] M. Rao , S. Mayor. Active organization of membrane constituents in living cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 29:126–132, 2014.
- [25] S. Nonaka , H. Naoki , S. Ishii. A multiphysical model of cell migration integrating reaction–diffusion, membrane and cytoskeleton. *Neural Networks*, 24:979–989, 2011.
- [26] R. Raghupathy , A. A. Anilkumar , A. Polley , P. P. Singh , M. Yadav , C. Johnson , S. Suryawanshi , V. Saikam , S. D. Sawant , A. Panda , Z. Guo , R. A. Vishwakarma , M. Rao , S. Mayor. Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins. *Cell*, 161(3):581–594, 2015.
- [27] S. Saha , I.H. Lee , A. Polley , J.T. Groves , M. Rao , S. Mayor. Diffusion of gpi-anchored proteins is influenced by the activity of dynamic cortical actin. *Molecular Biology of the Cell*, 26(22):4033–4045, 2015.
- [28] N. Prasain , T. Stevens. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular Research*, 77(1):53–63, 2009.
- [29] W. Demtröder. *Experimentalphysik 1: Mechanik und Wärme*. Springer, 5 edition, 2008.
- [30] P. G. Saffman , M. Delbrück. Brownian motion in biological membranes. *PNAS*, 72(8):3111–3113, 1975.
- [31] V. Mueller , C. Ringemann , A. Honigmann , G. Schwarzmann , R. Medda , M. Leutenegger , S. Polyakova , V.N. Belov , S.W. Hell , C. Eggeling. Sted nanoscopy reveals molecular details of cholesterol- and cytoskeleton-modulated lipid interactions in living cells. *Biophysical Journal*, 101(7):1651–1660, 2011.
- [32] S. Wieser , G.J. Schütz. Tracking single molecules in the live cell plasma membrane—do’s and don’t’s. *Methods*, 46:131–140, 2008.

Literaturverzeichnis

- [33] J. M. Sanderson. Resolving the kinetics of lipid, protein and peptide diffusion in membranes. *Molecular Membrane Biology*, 29(5):118–143, 2012.
- [34] B. Fadeel , D. Xue. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(5):264–277, 2009.
- [35] E. Gouaux , R. Mackinnon. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*, 310:1461–1465, 2005.
- [36] J. J. Clare. Targeting ion channels for drug discovery. *Discovery Medicine*, 9(46):253–260, 2010.
- [37] D. Thomas , L. D. Plant , C. M. Wilkens , Z. A. McCrossan , S. A. N. Goldstein. Alternative translation initiation in rat brain yields $k_2p2.1$ potassium channels permeable to sodium. *Neuron*, 58(6):859–870, 2008.
- [38] W. Wu , M.C. Sanguinetti. Molecular basis of cardiac delayed rectifier potassium channel function and pharmacology. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 8(2):275–284, 2016.
- [39] D. Purves , G. J. Augustine , D. Fitzpatrick , W. C. Hall , A. S. Lamantia , L. E. White, editor. *Neuroscience*, volume 5. Macmillan Education, 2012.
- [40] K. Simons , D. Toomre. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1):31–39, 2000.
- [41] E. Sevcsik , M. Brameshuber , M. Fölser , J. Weghuber , A. Honigmann , G. J. Schütz. Gpi-anchored proteins do not reside in ordered domains in the live cell plasma membrane. *Nature Communications*, 6(6969), 2015.
- [42] R. Schroeder , E. London , D. Brown. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (gpi)-anchored proteins: Gpi-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *PNAS*, 91(25):12130–12134, 1994.
- [43] D.A. Brown , J.K. Rose. Sorting of gpi-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3):533–544, 1992.
- [44] K. Simons , E. Ikonen. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387:569–572, 1997.

- [45] M. Brameshuber , J. Weghuber , V. Ruprecht , I. Gombos , I. Horváth , L. Vigh , P. Eckerstorfer , E. Kiss , H. Stockinger , G. J. Schütz. Imaging of mobile long-lived nanoplatforms in the live cell plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(53):41765–41771, 2010.
- [46] I. Ziomkiewicz , J. Sporring , T.G. Pomorski , A. Schulz. Novel approach to measure the size of plasma-membrane nanodomains in single molecule localization microscopy. *Cytometry Part A*, 87(9):868–877, 2015.
- [47] M. Brameshuber , E. Sevcsik , B. K. Rossboth , C. Manner , H.-P. Deigner , B. Peksel , M. P eter , Z. Török , A. Hermetter , G. J. Schütz. Oxidized phospholipids inhibit the formation of cholesterol-dependent plasma membrane nanoplatforms. *Biophysical Journal*, 110:205–213, 2016.
- [48] K.G.N. Suzuki , T.K. Fujiwara , F. Sanematsu , R. Iion , M. Edidin , A. Kusumi. Gpi-anchored receptor clusters transiently recruit lyn and g_α for temporary cluster immobilization and lyn activation: single-molecule tracking study 1. *Journal of Cell Biology*, 2007.
- [49] K.G.N. Suzuki , T.K. Fujiwara , M. Edidin , A. Kusumi. Dynamic recruitment of phospholipase c_γ at transiently immobilized gpi-anchored receptor clusters induces ip_3 - ca^{2+} signaling: single-molecule tracking study 2. *Journal of Cell Biology*, 2007.
- [50] A.M. Lipp , K. Juhasz , C. Paar , C. Ogris , P. Eckerstorfer , R. Thuenauer , J. Hesse , B. Nimmervoll , H. Stockinger , G.J. Schütz , U. Bodenhofer , Z. Balogi , A. Sonnleitner. Lck mediates signal transmission from cd59 to the tcr/ cd3 pathway in jurkat t cells. *PLOS*, 9(1), 2014.
- [51] M. Brameshuber , G. J. Schütz. Detection and quantification of biomolecular association in living cells using single-molecule microscopy. *Methods in Enzymology*, 505:160–186, 2012.
- [52] H.-T. He , D. Marguet. Detecting nanodomains in living cell membrane by fluorescence correlation spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, 62:417–436, 2011.
- [53] D. Lingwood , K. Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(46), 2010.
- [54] V. Kiessling , J. M. Crane , L. K. Tamm. Transbilayer effects of raft-like lipid domains in asymmetric planar bilayers measured by single molecule tracking. *Biophysical Journal*, 91(9):3313–3326, 2006.

Literaturverzeichnis

- [55] O.L. Kantidze , A.K. Velichko , A.V. Luzhin , S.V. Razin. Heat stress-induced dna damage. *ActaNaturae*, 8(2):75–78, 2016.
- [56] I. Milisav. *Cellular Stress Responses*. 2011.
- [57] S. Fulda , A. M. Gorman , O. Hori , A. Samali. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010.
- [58] S. O. Simmons , C.-Y. Fan , R. Ramabhadran. Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicological Sciences*, 111(2):202–225, 2009.
- [59] J. D. Hasday , I. S. Singh. Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell Stress & Chaperones*, 5(5):471–480, 2000.
- [60] Y. Saidi , M. Peter , A. Finka , C. Cicekli , L. Vigh , P. Goloubnioff. Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates ca^{2+} -dependent heat shock response. *Plant Signaling & Behavior*, 5(12):1530–1533, 2010.
- [61] G. Balogh , M. Pèter , A. Glatz , I. Gombos , Z. Török , I. Horvath , J. L. Harwood , L. Vigh. Key role of lipids in heat stress management. *FEBS Letters*, 587(13):1970–1980, 2013.
- [62] M. Akerfelt , R.I. Morimoto , L. Sistonen. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(8):545–555, 2010.
- [63] R. I. Morimoto , P. E. Kroeger , J. J. Cotto. The transcriptional regulation of heat shock genes: A plethora of heat shock factors and regulatory. *Stress-Inducible Cellular Responses*, 77:139–163, 1996.
- [64] M. Jäätelä. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of Medicine*, 31:261–271, 1999.
- [65] L. Vigh , I. Horvath , B. Maresca , J. L. Harwood. Can the stress protein response be controlled by ‘membrane-lipid therapy’? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(8):357–363, 2007.
- [66] A. De Maio , M. G. Santoro , R. M. Tanguay , L. E. Hightower. Ferruccio ritossa ’s scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress & Chaperones*, 17(2):139–143, 2012.

- [67] F. Ritossa. New puffs induced by temperature shock, dnp and salicilate in salivary chromosomes of *d. melanogaster*. *Drosiphilia Information Service*, 37:122–123, 1963.
- [68] F. Ritossa. A new puffing pattern induced by temperature shock and dnp in *drosophila*. *Experientia*, 18:571–573, 1962.
- [69] F. Ritossa. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *drosophila*. *Experimental Cell Research*, 35:601–607, 1964.
- [70] S. Lindquist , E. A. Craig. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22:631–677, 1988.
- [71] P. Srivastava. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annual Review of Immunology*, 20:395–425, 2002.
- [72] S. Lindquist. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55:1151–1191, 1986.
- [73] B. Javid , P. A. MacAry , P. J. Lehner. Structure and function: Heat shock proteins and adaptive immunity. *The Journal of Immunology*, 179:2035–2040, 2007.
- [74] L. Pirkkala , L. Sistonen. Heat shock proteins (hsps): Structure, function and genetics. *Encyclopedia of Life Sciences*, 10, 2006.
- [75] T. Nemoto , N. Sato. Oligomeric forms of the 90-kda heat shock protein. *Biochemical Journal*, 330:989–995, 1998.
- [76] L. H. Pearl , C. Prodromou. Structure and in vivo function of hsp90. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(1):46–51, 2000.
- [77] P. Meyer , C. Prodromou , B. Hu , C. Vaughan , S.M. Roe , B. Panaretou , P.W. Piper , L.H. Pearl. Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for atp hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Molecular Cell*, 11(3):647–658, 2003.
- [78] Y. Minami , Y. Kimura , H. Kawasaki , K. Suzuki , I. Yahara. The carboxy-terminal region of mammalian hsp90 is required for its dimerization and function in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 14(2):1459–1464, 1994.
- [79] C. Prodromou , B. Panaretoou , S. Chohan , G. Siligardi , R. O'Brien , J. E. Ladbury , S. M. Roe , P. W. Piper , L. H. Pearl. The atpase cycle of hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the n-terminal domains. *The EMBO Journal*, 19(16):4383–4392, 2000.

Literaturverzeichnis

- [80] D. E. Dollins , J. J. Warren , R. M. Immormino , D. T. Gewirth. Structures of grp94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Molecular Cell*, 28(1):41–56, 2007.
- [81] M. P. Mayer. Gymnastics of molecular chaperones. *Molecular Cell*, 39:321–331, 2010.
- [82] K.M. Flaherty , C. DeLuca-Flaherty , D.B. McKay. Three-dimensional structure of the atpase fragment of a 70k heat-shock cognate protein. *Nature*, 346:623–628, 1990.
- [83] X. Zhu , X. Zhao , W.F. Burkholder , A. Gragerov , C.M. Ogata , M.E. Gottesman , W.A. Hendrickson. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone dnak. *Science*, 272:1606–1614, 1996.
- [84] K. Braig , Z. Otwinowski , R. Hegde , D.C. Boisvert , A. Joachimiak , A.L. Horwich , P.B. Sigler. The crystal structure of the bacterial chaperonin groel at 2.8 a. *Nature*, 37:578–586, 1994.
- [85] J. C. Ranford , A. R.M. Coates , B. Henderson. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2:1–17, 2000.
- [86] J. Hu , Y. Wu , J. Li , X. Qian , Z. Fu , B. Sha. The crystal structure of the putative peptide-binding fragment from the human hsp40 protein hdj1. *BMC Structural Biology*, 8(3), 2008.
- [87] A. Szabo , R. Korszun , F. U. Hartl , J. Flanagan. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone dnaj is involved in binding to denatured protein substrates. *The EMBO Journal*, 15(2):408–417, 1996.
- [88] J. Li , X. Qian , B. Sha. The crystal structure of the yeast hsp40 ydj1 complexed with its peptide substrate. *Structure*, 11:1475–1483, 2003.
- [89] N. B. Gusev , N. V. Bogatcheva , S. B. Marston. Structure and properties of small heat shock proteins (shsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 67(5):511–519, 2002.
- [90] J. R. Thériault , H. Lambert , A. T. Chávez-Zobel , G. Charest , P. Lavigne , J. Landry. Essential role of the nh2-terminal wd/epf motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian hsp27. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(22):23463–23471, 2004.

- [91] J. Imai , M. Maruya , H. Yashiroda , I. Yahara , K. Tanaka. The molecular chaperone hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26s proteasome. *The EMBO Journal*, 22(14):3557–3567, 2003.
- [92] P. Wittung-Stafshede , J. Guidry , B.E. Horne , S.J. Landry. The j-domain of hsp40 couples atp hydrolysis to substrate capture in hsp70. *Biochemistry*, 42(17):4937–4944, 2003.
- [93] M. Gehrman , J. Radons , M. Molls , G. Multhoff. The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (hsp70) expression by tumor cells. *Cell Stress & Chaperones*, 13(1):1–10, 2008.
- [94] H. Koll , B. Guiard , J. Rassow , J. Ostermann , A. L. Horwich , W. Neupert , F.-U. Hartl. Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell*, 68(6):1163–1175, 1992.
- [95] L. Brocchieri , S. Karlin. Conservation among hsp60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Science*, 9(3):476–486, 2000.
- [96] J. J. Hansen , P. Bross , M. Westergaard , M. Nielsen , H. Eiberg , A. D. Borglum , J. Mogensen , K. Kristiansen , L. Bolund , N. Gregersen. Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: Hsp60 and hsp10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Human Genetics*, 112(1):71–77, 2003.
- [97] A. Buchberger , A. Valencia , R. McMacken , C. Sander , B. Bukau. The chaperone function of dnaK requires the coupling of atpase activity with substrate binding through residue. *The EMBO Journal*, 13:1687–1695, 1994.
- [98] E. V. Mymrikov , A. S. Seit-Nebi , N. B. Gusev. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiological Reviews*, 91(4):1123–1159, 2011.
- [99] A. M. Patwardhan , A. N. Akopian , N. B. Ruparel , A. Diogenes , S. T. Weintraub , C. Uhlson , R. C. Murphy , K. M. Hargreaves. Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate trpv1 and produce pain in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(5):1617–1626, 2010.
- [100] T. Voets , G. Droogmans , U. Wissenbach , A. Janssens , V. Flockerzi , B. Nilius. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive trp channels. *Nature*, 430:748–754, 2004.
- [101] L. Vigh , P. V. Escribà , A. Sonnleitner , M. Sonnleitner , S. Piotto , B. Maresca , I. Horvath , J. L. Harwood. The significance of lipid composition

- for membrane activity: New concepts and ways of assessing function. *Progress in Lipid Research*, 44(5):303–344, 2005.
- [102] Z. Török , T. Crul , B. Maresca , G. J. Schütz , F. Viana , L. Dindia , S. Piotto , M. Brameshuber , G. Balogh , M. Pèter , A. Porta , A. Trapani , I. Gombos , A. Glatz , B. Gungor , B. Peksel , L. Vigh Jr. , B. Csoboz , I. Horvàtha , M. M. Vijayan , P. L. Hooper , J. L. Harwoodh , L. Vigh. Plasma membranes as heat stress sensors: From lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838:1594–1618, 2014.
- [103] A. Loidl , E. Sevcsik , G. Riesenhuber , H.-P. Deigner , A. Hermetter. Oxidized phospholipids in minimally modified low density lipoprotein induce apoptotic signaling via activation of acid sphingomyelinase in arterial smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35):32921–32928, 2003.
- [104] U. Stemmer , Z. A. Dunai , D. Koller , G. Pürstinger , E. Zenzmaier , H. P. Deigner , E. Aflaki , D. Kratky , A. Hermetter. Toxicity of oxidized phospholipids in cultured macrophages. *Lipids in Health and Disease*, 11(110):1–13, 2012.
- [105] C. Morenilla-Palao , M. Pertusa , V. Meseguer , H. Cabedo , F. Viana. Lipid raft segregation modulates trpm8 channel activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(14):9215–9224, 2009.
- [106] N. Damann , T. Voets , B. Nilius. Trps in our senses. *Current Biology*, 18(18):880–889, 2008.
- [107] V.L. Vega , W. Charles , A. De Maio. A new feature of the stress response: increase in endocytosis mediated by hsp70. *Cell Stress & Chaperones*, 15(5):517–527, 2010.
- [108] C. M. Smith , V. Haucke , A. Mc Cluskey , P. J. Robinson , M. Chircop. Spindle assembly checkpoint and induces cell death in dividing hela cancer cells. *Molecular Cancer*, 12(4):1–15, 2013.
- [109] D. Dutta , C. D. Williamson , N. B. Cole , J. G. Donaldson. Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. *PLOS*, 7(9):1–9, 2012.
- [110] N. R. Hofmann. The plasma membrane as first responder to heat stress. *Plant Cell*, 21(9), 2009.
- [111] S. Lambert , D. Vind-Kezunovic , S. Karvinen , R. Gniadecki. Ligand-independent activation of the egfr by lipid raft disruption. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(5):954–962, 2006.

- [112] J. Zheng. Molecular mechanism of trp channel. *Comprehensive Physiology*, 3(1):221–242, 2013.
- [113] T. P. Lockwich , X. Liu , B. B. Singh , J. Jadlovec , S. Weiland , I. S. Ambudkar. Assembly of trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(16):11934–11942, 2000.
- [114] L. Carratù , S. Franceschelli , C. L. Pardini , G. S. Kobayashi , I. Horvath , L. Vigh , B. Maresca. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *PNAS*, 93(9):3870–3875, 1996.
- [115] G. Balogh , M. Pèter , G. Liebisch , I. Horvath , Z. Török , E. Nagy , A. Maslyanko , S. Benkò , G. Schmitz , J. L. Harwood , L. Vigh. Lipidomics reveals membrane lipid remodelling and release of potential lipid mediators during early stress responses in a murine melanoma cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(9):1036–1047, 2010.
- [116] J. Verghese , J. Abrams , Y. Wang , K. A. Morano. Biology of the heat shock response and protein chaperones: Budding yeast (*saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 76(2):115–158, 2012.
- [117] L. Dindia , E. Faught , Z. Leonenko , R. Thomas , M.M. Vijayan. Rapid cortisol signaling in response to acute stress involves changes in plasma membrane order in rainbow trout liver. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 304(11):1157–1166, 2013.
- [118] A. N. Boone , M. M. Vijayan. Glucocorticoid-mediated attenuation of the hsp70 response in trout hepatocytes involves the proteasome. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(3):680–687, 2002.
- [119] R. Sathiyaa , T. Campbell , M. M. Vijayan. Cortisol modulates hsp90 mrna expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 129:679–685, 2001.
- [120] X. Wang , M.D. Abdul Khaleque , M.J. Zhao , R. Zhong , M. Gaestel , S.K. Calderwood. Phosphorylation of hsf1 by mapk-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes hsp90 binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:782–791, 2006.

Literaturverzeichnis

- [121] F. Lottspeich , J. W. Engels. *Bioanalytik*, volume 3. Springer Spektrum, 2012.
- [122] D. Gerlach. *Das Lichtmikroskop: Eine Einführung in Funktion und Anwendung in Biologie und Medizin*. 2. Georg Thieme Verlag, 1985.
- [123] W. Demtröder. *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*. 5. Springer, 2009.
- [124] E. Betzig , G.H. Patterson , R. Sougrat , O. Wolf Lindwasser , S. Olenych , J.S. Bonifacino , M.W. Davidson , J. Linpincott-Schwartz , H.F. Hess. 0 0 report imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [125] M.J. Rust , M. Bates , X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nature Methods*, 3:793–796, 2006.
- [126] J. Wichmann , S.W. Hell. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19(11):780–782, 1994.
- [127] T.A. Klar , S.W. Hell. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 24(14):954–956, 1999.
- [128] M.J. Saxton. Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26:373–399, 1997.
- [129] W.E. Moerner , D.P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 74, 2003.
- [130] D. Axelrod , T. P. Burghardt , N. L. Thompson. Total internal reflection fluorescence. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 13:247–268, 1984.
- [131] N. L. Thompson , T. P. Burghardt , D. Axelrod. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 33(3):435–454, 1981.
- [132] R. M. Clegg. Förster resonance energy transfer—fret what is it, why do it, and how it’s done. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 33:1–57, 2009.
- [133] A. P. Demchenko. *Introduction to Fluorescence Sensing*. Springer, 2009.

- [134] M. Brameshuber , G. J. Schütz. Detection and quantification of biomolecular association in living cells using single-molecule microscopy. *Methods in Enzymology*, 505:159–186, 2012.
- [135] V. Ruprecht , M. Brameshuber , G.J. Schütz. Two-color single molecule tracking combined with photobleaching for the detection of rare molecular interactions in fluid biomembranes. *Soft Matter*, 6:568–581, 2010.
- [136] U. Loizides-Mangold , F.P.A. David , V.J. Nesatyy , T. Kinoshita , H. Riezman. Glycosylphosphatidylinositol anchors regulate glycosphingolipid levels. *Zurich Open Repository and Archive*, 2012.
- [137] M.G. Paulick , C.R. Bertozzi. The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*, 47(27):6991–7000, 2008.
- [138] S. Wieser , M. Moertelmaier , E. Fuertbauer , H. Stockinger , G.J. Schütz. (un)confined diffusion of cd59 in the plasma membrane determined by high-resolution single molecule microscopy. *Biophysical Journal*, 92(10):3719–3728, 2007.
- [139] J. Canny. A computational approach to edge detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 8(6):679–698, 1986.