

Aus dem Bereich Strukturbioogie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Strukturelle und funktionelle Analyse des Flower- ähnlichen Proteins aus der Maus**

**Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der  
Naturwissenschaften der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von Katja Larissa Urbansky  
geboren am 07.01.1992 in Fürth



Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden am Lehrstuhl für Strukturbioogie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Wissenschaftlicher Betreuer: Prof. Dr. C. Roy D. Lancaster





## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Materialien und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen:

- 1) Dr. Yvonne Carius: Durchführung und Auswertung der SAXS-Messungen und Röntgendiffraktionsexperimente
- 2) Dr. M. Gregor Madej: Durchführung der SSM-Experimente, Vorbereitung der Cryo-EM-Proben und Aufnahme der Datensätze, Erstellung des Homologie-Modells
- 3) Lifei Fu: Prozessierung der Cryo-EM-Datensätze

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)



## Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis .....	viii
II Abbildungsverzeichnis.....	xi
III Tabellenverzeichnis.....	xv
Kapitel 1 Zusammenfassung.....	1
Kapitel 2 Abstract .....	3
Kapitel 3 Einleitung.....	5
3.1 Synaptische Signalweiterleitung.....	5
3.2 Calcium-abhängige Exozytose .....	6
3.3 Rückgewinnung synaptischer Vesikel über Endozytose .....	7
3.3.1 Clathrin-abhängige Endozytose .....	8
3.3.2 Bulk-Endozytose .....	10
3.3.3 Kiss-and-Run-Endozytose .....	11
3.3.4 Die ultraschnelle Endozytose.....	11
3.4 Kopplung von Exo- und Endozytose.....	11
3.5 Calmodulin.....	12
3.6 TRPV-Kanäle.....	13
3.7 Das Flower-Protein in <i>D. melanogaster</i> .....	14
3.7.1 Das Flower-Protein als Calciumkanal in <i>D. melanogaster</i> .....	14
3.7.2 Flower und PIP <sub>2</sub> .....	16
3.7.3 Zellkompetition .....	18
3.7.3.1 Zellkompetition und der „Flower-Code“ in <i>D. melanogaster</i> .....	18
3.7.3.2 Die Rolle von Flower bei der Neurodegeneration in <i>D. melanogaster</i> .....	20
3.8 Das Flower-Protein in <i>Mus musculus</i> , <i>mouse Flower-like</i> .....	21
3.8.1 <i>Mouse Flower-like</i> und Zellkompetition in <i>Mus musculus</i> .....	21
3.8.2 <i>Mouse Flower-like</i> und Endozytose in <i>Mus musculus</i> .....	22
3.9 Das humane Flower-Protein .....	24
3.9.1 Humanes Flower und Zellkompetition im Menschen .....	24
3.9.2 Humanes Flower und Endozytose im Menschen.....	26
3.10 Zielsetzung der Arbeit.....	27
Kapitel 4 Material.....	29
4.1 Mikroorganismen .....	29
4.2 Oligonukleotide .....	29
4.3 Plasmide zur Expression in <i>E. coli</i> .....	30
4.4 Ausgewählte Proteinsequenzen .....	30
4.5 Chemikalien und Detergenzien.....	31
4.6 Standards, Enzyme, Proteasen und Kits .....	33
4.7 Antikörper .....	34
4.8 Säulenmaterialien .....	34
4.9 Nährmedien .....	34

4.9.1 Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	34
4.10 Puffer und Lösungen .....	35
4.10.1 Lösungen für molekularbiologische Methoden .....	35
4.10.2 Puffer zur Proteinreinigung .....	37
4.11 Kristallisationsscreens .....	39
4.12 Geräte .....	39
4.13 Verbrauchsmaterialien .....	40
4.14 Computer-Programme .....	41
4.15 Beamlines .....	42
Kapitel 5 Methoden .....	43
5.1 Computergestützte Methoden .....	43
5.1.1 Sequenzvergleich .....	43
5.1.2 Vorhersage von Transmembranhelices .....	43
5.1.3 Sekundär- und Tertiärstrukturvorhersage .....	43
5.2 Molekularbiologische Methoden .....	44
5.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	44
5.2.2 Bestimmung der optischen Dichte .....	44
5.2.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	44
5.2.4 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock .....	44
5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	44
5.2.5.1 Zielgerichtete Mutagenese .....	45
5.2.5.2 Omega-PCR .....	45
5.2.5.3 Kolonie-PCR .....	46
5.2.6 Plasmid-Isolierung .....	47
5.2.7 Agarosegelelektrophorese .....	47
5.2.8 Bestimmung der DNS-Konzentration .....	47
5.2.9 DNS-Sequenzierung .....	47
5.3 Proteinbiochemische Methoden .....	48
5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	48
5.3.2 Native PAGE .....	48
5.3.3 Coomassie-Blau-Färbung .....	49
5.3.4 Silber-Färbung .....	49
5.3.5 Western-Blot-Analyse .....	49
5.3.5.1 Wet-Blot .....	49
5.3.5.2 Immundetektion .....	49
5.2.5.3 Dot-Blot .....	50
5.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	50
5.3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Nanodrop .....	50
5.3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay .....	50
5.3.7 Methanol-Chloroform-Extraktion .....	51
5.4 Proteinproduktion in <i>E. coli</i> .....	51

5.4.1 Proteinproduktion im analytischen Maßstab .....	51
5.4.2 Proteinproduktion im präparativen Maßstab .....	51
5.4.2.1 IPTG-basierte Induktion .....	52
5.4.2.2 Autoinduktion .....	52
5.4.3 Zellernte .....	53
5.5 Zellyse und Solubilisierung .....	53
5.5.1 Zellyse .....	53
5.5.2 Solubilisierung .....	53
5.6 Rekonstitution .....	54
5.6.1 Rekonstitution von mFI in PMAL-C8 .....	54
5.6.2 Rekonstitution von mFI in DIBMA .....	54
5.6.3 Rekonstitution von mFI in Proteoliposomen .....	54
5.6.4 Rekonstitution von mFI in Nanodiscs .....	55
5.7 Chromatographische Reinigung .....	55
5.7.1 Immobilisierte-Metallkationen-Affinitätschromatographie .....	55
5.7.2 StreptII-Tactin-Affinitäts-Chromatographie .....	56
5.7.3 Ulp1-Verdau zur Abspaltung des 6xHis-SUMO-Anhängsels .....	56
5.8 Proteincharakterisierung .....	57
5.8.1 Molekulargewichtsbestimmung mittels statischer Lichtstreuung .....	57
5.8.2 Kleinwinkelröntgenstreuung an Biomakromolekülen .....	58
5.8.2.1 Theoretischer Hintergrund .....	58
5.8.2.2 HPLC-SAXS-Messungen .....	62
5.8.3 Interaktionsstudien mittels Pulldown-Assay .....	62
5.8.4 Crosslinking-Experimente mit DSS .....	63
5.9 SSM-basierte Elektrophysiologie .....	63
5.9.1 Alkylierung mit MTSET .....	65
5.10 Proteinkristallisation .....	65
5.10.1 Theoretischer Hintergrund .....	65
5.10.2 Dampfdiffusions-Kristallisation von Membranproteinen <i>in surfo</i> .....	66
5.10.3 Das Konzept der kleinen Amphiphile .....	68
5.10.4 Limitierte Proteolyse zur Abspaltung flexibler Bereiche .....	68
5.10.5 Dampfdiffusions-Kristallisation von Membranproteinen <i>in meso</i> .....	68
5.10.6 <i>High Lipid Detergent</i> (HiLiDe) Kristallisation .....	68
5.10.7 Kokristallisation von Calmodulin-mFI-Peptid-Komplexen .....	69
5.10.8 Kokristallisation von mFI-StreptII und Calmodulin .....	70
5.10.9 Nanobodies als Kristallisationschaperone .....	70
5.10.10 Kristallisation von Nanobody-mFI-Peptid-Komplexen .....	70
5.10.11 Ernte von Kristallen .....	70
5.10.12 Röntgenbeugung und Datensammlung .....	71
5.10.12.1 Aufbau von Proteinkristallen .....	71

5.10.12.2 Diffraktion an Proteinkristallen .....	71
5.10.12.3 Datensammlung .....	73
5.10.13 Datenprozessierung .....	73
5.10.14 Beurteilung der Datenqualität .....	74
5.11 Kryo-Elektronenmikroskopie .....	75
5.11.1 Negative Kontrastierung .....	75
5.11.2 Kryo-Grid-Vorbereitung .....	75
5.11.3 Datenprozessierung .....	76
5.12 Produktion und Reinigung von Calmodulin .....	76
5.12.1 Produktion von Calmodulin .....	76
5.12.2 Reinigung von Calmodulin .....	76
5.12.3 Produktion von GST-Calmodulin .....	77
5.12.4 Reinigung von GST-Calmodulin .....	77
5.13 Produktion und Reinigung von Nanobodies .....	77
5.13.1 Produktion der Nanobodies .....	77
5.13.2 Reinigung der Nanobodies .....	78
5.14 Produktion und Reinigung der SUMO-Protease .....	78
5.14.1 Produktion der katalytischen Domäne der SUMO-Protease Ulp1p .....	78
5.14.2 Reinigung der SUMO Protease Ulp1p .....	78
Kapitel 6 Ergebnisse .....	79
6.1 Bioinformatische Analysen .....	79
6.2 6xHis-SUMO-mFI-StrepII und mFI-StrepII .....	81
6.2.1 Produktion von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII in <i>E. coli</i> .....	81
6.2.2 Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII und mFI-StrepII in LDAO und Fos12 .....	81
6.2.3 Rekonstitution von mFI-StrepII in PMAL-C8 .....	85
6.2.4 Molekulargewichtsbestimmung von mFI .....	86
6.2.4.1 Molekulargewichtsbestimmung von mFI in Fos12 .....	86
6.2.4.2 Molekulargewichtsbestimmung von mFI-StrepII in PMAL-C8 .....	88
6.2.5 Bestimmung eines Oberflächenmodells von mFI-StrepII .....	90
6.2.5.1 HPLC-SAXS von mFI-StrepII in Fos12 .....	90
6.2.5.2 HPLC-SAXS-Messungen von mFI-StrepII in verschiedenen Fos12-Konzentrationen .....	98
6.2.6 Kristallisation von mFI-StrepII .....	101
6.2.7 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StrepII .....	104
6.2.7.1 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StrepII in PMAL-C8 .....	104
6.2.7.2 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StrepII in Fos12 mit Barium .....	104
6.2.7.3 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StrepII in DDM/CHS .....	105
6.2.8 SSM-Elektrophysiologie .....	105
6.2.9 Erstellung eines Homologie-Modells .....	117
6.3 Herstellung verschiedener mFI-StrepII-Varianten .....	118
6.3.1 mFI(G812L)-StrepII .....	119

6.3.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von mFI(G812L)-StreptII .....	119
6.3.1.2 Molekulargewichtsbestimmung von mFI(G812L)-StreptII in PMAL-C8.....	120
6.3.1.3 Abbau von mFI(G812L)-StreptII .....	120
6.3.1.4 Kristallisation von mFI(G812L)-StreptII .....	121
6.4 Interaktion von mFI-StreptII und Calmodulin .....	121
6.4.1 Identifikation einer möglichen Calmodulin-Bindestelle.....	122
6.4.2 Interaktion von Calmodulin mit mFI-Peptiden .....	122
6.4.3 Kristallisation und Aufnahme von Datensätzen von Calmodulin mit mFI-Peptiden .....	123
6.4.4 Prozessierung der Datensätze und Verfeinerung der Strukturen .....	124
6.4.5 Die Interaktion von mFI-StreptII und Calmodulin ist Calcium-abhängig.....	125
6.4.6 Kokristallisation von mFI-StreptII und Calmodulin .....	126
6.5 Nanobodies für mFI-StreptII.....	127
6.5.1 Herstellung der Nanobodies .....	127
6.5.2 Auswahl, Expression und Reinigung der Nanobodies .....	127
6.5.3 Interaktion von mFI-StreptII mit ausgewählten Nanobodies .....	128
6.5.4 Kristallisation von NB14 mit dem Flower-Peptid P4.....	129
6.5.5 Strukturanalyse des NB14-P4 Komplexes.....	131
6.5.6 HPLC-SAXS von mFI-StreptII in PMAL-C8 und NB14.....	133
6.5.7 Kokristallisation von NB14 und mFI-StreptII .....	135
6.5.8 Kryo-Elektronenmikroskopie eines mFI-StreptII-NB14-Komplexes in Nanodiscs. 136	
6.5.8.1 Rekonstitution von mFI-StreptII in Nanodiscs .....	136
6.5.8.2 Kryo-EM von mFI mit NB14 in Nanodiscs .....	137
Kapitel 7 Diskussion .....	138
7.1 Bioinformatische Analysen .....	138
7.2 Produktion und Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StreptII und mFI-StreptII.....	140
7.2.1 Produktion von 6xHis-SUMO-mFI-StreptII in <i>E. coli</i> .....	140
7.2.2 Reinigung und Rekonstitution von 6xHis-SUMO-mFI-StreptII und mFI-StreptII ....	141
7.3 Oligomerisierungsverhalten von mFI-StreptII .....	144
7.3.1 Molekulargewichtsbestimmung von mFI in Fos12 .....	145
7.3.2 Rekonstitution und Molekulargewichtsbestimmung von mFI-StreptII in PMAL-C8148	
7.3.3 HPLC-SAXS-Messung von mFI-StreptII .....	150
7.3.3.1 Strukturelle Parameter .....	150
7.3.3.2 Oberflächen- und Strukturmodelle von mFI .....	152
7.3.3.3 Einfluss der Detergenzkonzentration und des pH-Wertes .....	160
7.4 Strukturelle Analyse von mFI-StreptII .....	161
7.4.1 Kristallisation von mFI-StreptII .....	161
7.4.2 Kryo-EM von mFI-StreptII .....	162
7.4.2.1 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StreptII in PMAL-C8 .....	162
7.4.2.2 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StreptII in Fos12 mit Barium.....	163
7.4.2.3 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StreptII in DDM/CHS .....	163

7.5 Herstellung von mFI-StrepII-Varianten für eine verbesserte Kristallisierbarkeit .....	163
7.5.1 mFI(G812L)-StrepII .....	163
7.5.2 Herstellung verkürzter mFI-StrepII-Konstrukte.....	165
7.6 Interaktion von mFI-StrepII und Calmodulin .....	166
7.6.1 Identifikation der Calmodulin-Bindestelle.....	166
7.6.2 Interaktion von Calmodulin und Flower-Peptiden .....	167
7.6.3 Kristallisation, Datensätze und Struktur von CaM mit mFI-Peptiden .....	167
7.6.4 Die Interaktion von mFI und CaM ist Calcium-abhängig .....	171
7.6.5 Kokristallisation von mFI und CaM.....	172
7.7 Nanobodies für mFI-StrepII.....	173
7.7.1 Auswahl geeigneter Nanobodies .....	173
7.7.2 Kokristallisation von NB14 mit mFI-Peptid P4.....	173
7.7.3 Analyse des mFI-NB14-Komplexes .....	176
7.7.4 Kokristallisation von mFI und NB14 .....	179
7.7.5 Kryo-EM-Modell von mFI im Komplex mit NB14 nach Rekonstitution in Nanodiscs .....	179
7.8 Funktionelle Charakterisierung von mFI-StrepII .....	180
7.8.1 Nachweis von Calcium-Strömen.....	180
7.8.2 Untersuchung der Calcium-Spezifität von mFI.....	183
7.8.3 Inhibierung von mFI durch dreiwertige Kationen.....	191
7.8.4 Untersuchung der pH-Abhängigkeit von mFI .....	192
7.8.5 Substrat-geschützte Alkylierung mit MTSET .....	194
7.8.6 Die Y104A-Variante zeigt eine veränderte Kanalaktivität .....	196
7.9 Homologie-Modell von mFI.....	200
7.10 Fazit.....	202
Kapitel 8 Literaturverzeichnis .....	203
Kapitel 9 Publikationen.....	232
Kapitel 10 Danksagung .....	233
Kapitel 11 Lebenslauf.....	234
Kapitel 12 Anhang.....	235
12.1 Sequenzalinierung ausgewählter Flower-Isoformen.....	235
12.2 Western-Blots von mFI-StrepII.....	236
12.3 Reinigung 6xHis-SUMO-mFI-StrepII .....	236
12.4 SEC von mFI in PMAL-C8 .....	237
12.5 Rekonstitution von mFI-StrepII in DIBMA .....	237
12.6 Native und SDS-PAGE nach Zugabe von Additiven.....	238
12.7 Crosslinking-Versuch mit DSS.....	239
12.8 Reinigung von mFI-StrepII in LMNG .....	239
12.9 Auswertung der HPLC-SAXS Messungen.....	240
12.10 SSM-Experimente.....	247
12.11 SEC von mFI-StrepII mit Lanthan .....	249



12.12 Klonierung, Produktion, Reinigung und Charakterisierung von mFI(Y104A)-StrepII .....	249
12.13 Klonierung, Produktion, Reinigung und Charakterisierung von mFIdC-StrepII ...	250
12.14 Klonierung, Produktion, Reinigung und Kristallisation von SUMOdNmFIdC-StrepII .....	251
12.15 Reinigung von Calmodulin .....	251
12.16 Reinigung von GST-Calmodulin .....	252
12.17 SEC von mFI und CaM .....	252
12.18 Kristallisation von mFI, mFI-Varianten und Kokristallisation .....	252
12.19 mFI-Oligomere in Fos12 sind dynamisch.....	253
12.20 mFwe aus CTLs bildet Oligomere.....	254
12.21 Molekulargewichtbestimmung von NB14 .....	254
12.22 Kryo-EM Proben .....	255
12.23 Bioinformatische Analysen.....	258
12.24 Reinigung der katalytisch aktiven Domäne Ulp1(403-621) der SUMO-Protease	263

## I Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Å	Ångström
ADBE	<i>Activity dependent bulk endocytosis</i>
AC	Affinitätschromatographie
AG	Arbeitsgruppe
AF	AlphaFold
AK	Antikörper
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
AP2	Adapter Protein 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AU	Absorptionseinheit ( <i>absorption unit</i> ) / willkürliche Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	Brom-Chlor-Indolyl-Phosphat-Toluidinsalz
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BsxCuBE	<i>Biosaxs customized beamline environment</i>
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmodulin
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CIMP	<i>Controlled in meso phase</i>
CIPMM	<i>Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine</i>
CG	zytotoxische Granula
CMC	<i>Critical micelle concentration</i>
CME	<i>Clathrin mediated endocytosis</i>
CaMKK	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
CRAC	<i>Calcium release-activated channel</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> (zytotoxische T-Lymphozyten)
CWP	Calmodulin Waschpuffer
C-Terminus	Carboxy-terminales Ende eines Proteins
d	Tag
dA/dC	Absorptionsänderung über Konzentration
Da	Dalton
dd.	Doppelt destilliert
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
dFwe	Flower aus <i>D. melanogaster</i>
DIBMA	<i>Diisobutylene-maleic acid</i>
DAM	<i>Dummy atom model</i>
DF	Durchfluss
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
D <sub>max</sub>	Maximale Ausdehnung
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn/dc	Brechungsindex-Inkrement
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DRM	<i>dummy residue model</i>
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	1,4-Dithiotreitol
E	Elution
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-N,N,N,N-Tetraessigsäure
EF	Elutionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis-Tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop(ie)

EP	Elutionspuffer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESRF	<i>European synchrotron radiation facility</i>
Fos12	Fos-Cholin-12
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GF	Gelfiltration
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GST	Glutathion S-Transferase
GSH	Glutathion
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
HiLiDe	<i>High Lipid Detergent</i>
6xHis	Hexahistidin
hFWE, hFwe	humanes Homolog von Flower
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICP	<i>Iterative closest point</i>
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilisierte Metallkationen-Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
ISPyB	<i>Information System for protein Crystallography Beamlines</i>
kDa	Kilodalton
keV	Kilo Elektronenvolt
Kryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
L	Liter
LB	<i>lysogenic broth</i>
LCP	<i>Lipidic cubic phase</i>
LDAO	n-Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-Oxid
LMNG	Lauryl Maltose Neopentyl Glycol
LPR	<i>Lipid to protein ratio</i>
m	milli
M	Molar
2-ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
min	Minute
mFl, mFwe	murines Homolog von Flower, mouse Flower-like
mFldC	C-Terminal verkürzte mFl-Variante
mFwe	murines Homolog von Flower, mouse Flower-like
MD	<i>Molecular dynamics</i>
MS	Massenspektrometrie
MSP	<i>Membrane scaffold protein</i>
MTS(ET)	[2-(Trimethylammonium)ethyl] Methanthiolsulfonat Bromid
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
Mw	berechnetes Massemittel der Molmasse
Mn	Molmasse
n	nano
Nb	Nanobody
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMG	N-Methyl-D-glucamin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NSD	<i>Normalized special discrepancy</i>
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
N-Terminus	Amino-terminales Ende eines Proteins
o	<i>oblate</i> , abgeflacht
p	<i>prolate</i> , länglich
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

## I Abkürzungsverzeichnis

PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMAL-C8	<i>Poly (Maleic Anhydride-alt-1-Decene) substituted with 3-(Dimethylamino) Propylamine</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P(r)	Paarverteilung ( <i>pair-distribution</i> )
PSS	<i>Pre-steady state</i>
PP	Periplasma
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	Radius
R <sub>g</sub>	Gyrations-Radius
RALS	<i>Right angle light scattering</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung ( <i>Small angle x-ray scattering</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SS	<i>Steady state</i>
SSM	<i>Solid supported membrane</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin like modifier</i>
STAC	StreptII-Tactin-Affinitätschromatographie
TB	<i>terrific broth</i>
TCEP	<i>Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin</i>
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TES	Tris EGTA Sucrose
TM	Transmembrandomäne
TRIS	<i>Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin</i>
TRPM	<i>Transient receptor potential melastanin</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
u	unbekannt
U	Unit
UdS	Universität des Saarlandes
µL	Mikroliter
Ulp1	Ubl-spezifische Protease 1, SUMO-Protease
UV	Ultraviolett
V	Volumen, Volt
VHH	<i>antigen-binding variable domain of heavy-chain antibodies</i>
V <sub>P</sub>	Porod-Volumen
VGCC	Spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle ( <i>voltage gated calcium channel</i> )
VK	Vorkultur
VP	Verdünnungspuffer
W	Waschschrift
WP	Waschpuffer
ZChL	Zentrales Chemikalien Lager, UdS

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Zusammenfassung des Zyklus der synaptischen Vesikel.....	6
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des SNARE/Munc18-Zyklus.....	7
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel.....	8
Abbildung 3.4: Kristallstrukturen von Calmodulin in verschiedenen Konformationen.....	13
Abbildung 3.5: Struktur des TRPV5-CaM-Komplexes (PDB: 6O20).....	14
Abbildung 3.6: Immunhistochemische Färbungen der präsynaptischen Endknöpfchen.....	15
Abbildung 3.7: Alinierung der Sequenzen verschiedener CG6151-Orthologe.....	16
Abbildung 3.8: Positive Feedback-Schleife zwischen Flower und PIP <sub>2</sub> .....	18
Abbildung 3.9: Modell Flower-abhängiger Zellkompetition in <i>D. melanogaster</i> .....	19
Abbildung 3.10: Genstruktur von mFwe.....	21
Abbildung 3.11: Modell zur Funktion von mFwe bei der Endozytose zytotoxischer Granula.....	23
Abbildung 3.12: Alternatives Modell zur Funktion von mFwe bei der Endozytose zytotoxischer Granula.....	24
Abbildung 3.13: Humane Flower-Isoformen.....	25
Abbildung 5.1: Prinzip der Deletions-Omega-PCR.....	45
Abbildung 5.2: Proteinmarker.....	48
Abbildung 5.3: schematische Darstellung eines SAXS-Experiments.....	58
Abbildung 5.4: Schema zur Analyse von SAXS-Daten.....	62
Abbildung 5.5: Liposomen, die einen Kationenkanal enthalten, werden an der SSM adsorbiert.....	64
Abbildung 5.6: Phasendiagramm zur Proteinkristallisation.....	66
Abbildung 5.7: "Typ II"-Kristalle.....	67
Abbildung 5.8: "Typ I"-Kristalle.....	69
Abbildung 5.9: Schematische Darstellung des Bragg'schen Gesetzes.....	72
Abbildung 6.1: Sequenzalinierung der Flower-Isoformen mFweA, hFwe4 und dFweUbi.....	79
Abbildung 6.2: Strukturvorhersage für mFI von AlphaFold (AF-Q8BG21-F1).....	80
Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der Reinigungsstrategie für 6xHis-SUMO-mFI-StrepII in LDAO und Fos12 nach einem von Dr. Michael Lafontaine etablierten Reinigungsprotokoll.....	81
Abbildung 6.4: 12 %-iges SDS-Gel der Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII nach Coomassie-Blau-Färbung.....	83
Abbildung 6.5: Größenausschluss-Chromatographie von mFI in Fos12.....	84
Abbildung 6.6: SEC von mFI rekonstituiert in PMAL-C8.....	85
Abbildung 6.7: Analytische SEC von mFI (Superdex 200, 5/150 pg).....	86
Abbildung 6.8: Molekulargewichtsbestimmung von mFI in Fos12 in Anwesenheit von Calcium durch SEC mit RI- und RALS-Messung.....	87
Abbildung 6.9: Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese von mFI in Fos12.....	88
Abbildung 6.10: Molekulargewichtsbestimmung von mFI in PMAL-C8 durch SEC mit RI- und RALS-Messung.....	89
Abbildung 6.11: Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese von mFI in PMAL-C8.....	90
Abbildung 6.12: Auswertung der HPLC-SAXS-Messung von mFI in Fos12 mit dem Programm CHROMXIS der Atsas-Suite.....	91
Abbildung 6.13: Streukurven, P(r)-Funktion, Guinier- und Kratky-Plot der HPLC-SAXS-Daten von mFI in Fos12 der Frames 1200-1250 (oben), 1250-1300 (mitte) und 1300-1350 (unten).....	92
Abbildung 6.14: Ab-initio Oberflächenmodell von mFI ohne Symmetrie für Frame 1200-1250.....	94
Abbildung 6.15: Oberflächenmodell von mFI mit P32-Symmetrie in länglicher Form.....	95
Abbildung 6.16: Oberflächen- und Strukturmodell von mFI für Frame 1200-1250.....	96
Abbildung 6.17: Experimentell bestimmte und mit CRY SOL und dem FoXS-Server berechnete theoretische Streukurve des SREFLEX-Modells.....	97
Abbildung 6.18: Oberflächenmodell von mFI in P42-Symmetrie für Frame 1250-1300.....	97
Abbildung 6.19: Mit DAMMIN verfeinerte Modelle von mFI in P1 für Frame 1300-1350.....	98
Abbildung 6.20: HPLC-SAXS-Messung von mFI in 0,1 und 0,25 % Fos12.....	99
Abbildung 6.21: Streukurven, P(r)-Funktion, Guinier- und Kratky-Plot der HPLC-SAXS-Läufe von mFI in 0,1 % und 0,25 % Fos12.....	99
Abbildung 6.22: Bewertung der Kristallisationsansätze von mFI in Fos12.....	102
Abbildung 6.23: Western-Blot und Diffraktionsbild eines mFI-Kristalls.....	103
Abbildung 6.24: Limitierte Proteolyse von mFI und Diffraktionsbild.....	103

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 6.25: SEC und native PAGE von mFI nach Zugabe von PIP <sub>2</sub> und Barium. ....	104
Abbildung 6.26: Western-Blot von Proteoliposomen mit mFI. ....	106
Abbildung 6.27: Durch 1200 $\mu$ M Calcium ausgelöster Übergangsstrom auf einem 3 mm (links) und 1 mm Sensor (rechts) bei einem LPR von 50 an der SSM. ....	106
Abbildung 6.28: Calcium-Ströme bei verschiedenen LPRs gemessen mit 1 mm Sensoren an der SSM. ....	108
Abbildung 6.29: Biexponentielle Abklingzeiten bei verschiedenen Protein- und Calciumkonzentrationen. ....	109
Abbildung 6.30: Durch zweiwertige Kationen induzierte Ströme mit LPR 2000 auf einem 1 mm Sensor an der SSM. ....	111
Abbildung 6.31: Durch zweiwertige Kationen induzierte Ströme mit LPR 2000 bei mFI und mFI(Y104A) auf einem 1 mm Sensor an der SSM. ....	112
Abbildung 6.32: Inhibierung von mFI durch Lanthan. ....	113
Abbildung 6.33: pH-Abhängigkeit der durch 1200 $\mu$ M Calcium induzierten Ströme an der SSM. ....	114
Abbildung 6.34: Durch 300 $\mu$ M Calcium induzierte Ströme an der SSM mit und ohne Substrat-geschützter Alkylierung von mFI durch MTSET. ....	115
Abbildung 6.35: Durch 300 $\mu$ M Calcium ausgelöste Ströme an der SSM bei verschiedenen pH-Werten. ....	116
Abbildung 6.36: Durch verschiedene zweiwertige Ionen mit einer Konzentration von 300 $\mu$ M ausgelöste Ströme nach Alkylierung mit MTSET. ....	117
Abbildung 6.37: Homologie-Modell von mFI. ....	118
Abbildung 6.38: Vorhersage von ungeordneten Bereichen mit XtalPred. ....	118
Abbildung 6.39: Reinigung von mFI(G812L)-StreptII. ....	119
Abbildung 6.40: Molekulargewichtsbestimmung von mFI(G812L)-StreptII in PMAL-C8 durch SEC mit RI- und RALS-Messung. ....	120
Abbildung 6.41: 12 %-iges SDS-Gel zweier mFI(G812L)-StreptII-Proben nach Silberfärbung und limitierte Proteolyse von mFI und mFI(G812L)-StreptII. ....	121
Abbildung 6.42: Sequenzanalyse mit Hilfe der Calmodulin Target Database zur Ermittlung möglicher Calmodulin-Bindestellen in mFI und GST-Pulldown-Assay. ....	122
Abbildung 6.43: Diffraktionsbild von CaM-P2, Kristallbild und Analyse des Datensatzes. ....	123
Abbildung 6.44: Elektronendichtekarte von CaM-P2 bei einem Konturlevel von $\sigma \sim 1,5$ und Ramachandran-Plot. ....	125
Abbildung 6.45: StreptII-Pulldown-Assay mit mFI und CaM. ....	126
Abbildung 6.46: Bewertung von Kristallisationsansätzen nach Kokristallisation von mFI und Calmodulin. ....	127
Abbildung 6.47: 12 %-iges SDS-Gel der Reinigung von NB14 und Chromatogramme der SECs ausgewählter Nanobodies. ....	128
Abbildung 6.48: StreptII-Pulldown-Assay mit mFI und ausgewählten Nanobodies. ....	129
Abbildung 6.49: SEC von einem mFI-NB14-Komplex, NB14 und mFI. ....	129
Abbildung 6.50: Sequenzen der Peptide, die das Epitop (P4) bzw. einen Teil des Epitops (P3) enthalten und analytische SEC von NB14 allein und im Komplex mit P3 oder P4. ....	130
Abbildung 6.51: Bild des Kristalls in der Nylonschleife, zugehöriges Diffraktionsbild und Analyse des Datensatzes. ....	131
Abbildung 6.52: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte (Konturlevel $\sigma \sim 1,5$ ) und Ramachandran-Plot der Kristallstruktur von NB14-P4. ....	132
Abbildung 6.53: HPLC-SAXS-Experimente von mFI in PMAL-C8 und mFI im Komplex mit NB14. ....	133
Abbildung 6.54: Streukurve, Guinier-Plot, P(r)-Funktion und Kratky-Plot der HPLC-SAXS-Daten von mFI im Komplex mit NB14. ....	133
Abbildung 6.55: Oberflächenmodell des mFI-NB14-Komplexes. ....	135
Abbildung 6.56: Bewertung von Kristallisationsansätzen nach Kokristallisation von mFI und NB14. ....	136
Abbildung 6.57: SECs von mFI in Nanodiscs mit NB14 und native PAGE. ....	137
Abbildung 6.58: 2D-Klassifizierung von mFI in Nanodiscs aus E. coli Lipid aus 31700 Partikeln. ....	137
Abbildung 7.1: Übereinanderlagerung von mFI-Strukturmodellen. ....	140
Abbildung 7.2: Streukurven der HPLC-SAXS-Messung in 0,05 % Fos12. ....	151
Abbildung 7.3: Experimentell bestimmte Streukurve und mit dem FoXS-Server berechnete Streukurve des AlphaFold-Modells. ....	152
Abbildung 7.4: Mögliche Symmetrien bei mFI für Frame 1200-1250. ....	153
Abbildung 7.5: Analyse des aus den SEC-SAXS-Daten (Frame 1200-1250) ermittelten Strukturmodells von mFI. ....	155
Abbildung 7.6: Mögliche Symmetrien von mFI für Frame 1250-1300. ....	156
Abbildung 7.7: Oberflächen- und Strukturmodell von einem mFI-Oktamer in P4-Symmetrie. ....	157

Abbildung 7.8: Oberflächenmodelle ohne Symmetrie (P1).....	159
Abbildung 7.9: Homologiemodell von mFI und Markierung des GxxxG-Motivs. ....	165
Abbildung 7.10: Homologie-Modell von mFI mit Markierung der flexiblen Bereiche. ....	166
Abbildung 7.11: Kristallstruktur von CaM-P1 und CaM-P2 bei 2,15 bzw. 1,87 Å Auflösung in Cartoon-Darstellung. ....	168
Abbildung 7.12: FLMM <sub>N</sub> - und FLMM <sub>C</sub> -Tetrade von CaM mit den interagierenden Ankerresten L139 und Y134 des mFI-Peptids. ....	169
Abbildung 7.13: Analyse der CaM-mFI-Peptid-Struktur. ....	170
Abbildung 7.14: Sequenz-Anlagerung im Bereich der CaM-Bindestelle von Flower-Isoformen aus <i>D. melanogaster</i> , <i>M. musculus</i> und <i>H. sapiens</i> . ....	171
Abbildung 7.15: Homologie-Modell von mFI mit angelagerter Ca <sup>2+</sup> -CaM-P2-Kristallstruktur. ....	172
Abbildung 7.16: Struktur des NB14-P4-Komplexes. ....	174
Abbildung 7.17: Sequenzanlagerung ausgewählter Nanobodies und Vergleich der CDR3. ....	175
Abbildung 7.18: Analyse der NB14-mFI-Peptid-Struktur. ....	176
Abbildung 7.19: Oberflächen- und Strukturmodell des mFI-NB14-Komplexes in P32-Symmetrie. ....	178
Abbildung 7.20: Vergleich ausgewählter Kristallisationsergebnisse von mFI, mFI mit CaM und mFI mit NB14. ...	179
Abbildung 7.21: Initiales Modell aus der 3D-Klassifizierung von mFI in ND aus <i>E. coli</i> PC. ....	180
Abbildung 7.22: Durch 300, 600 und 900 µM induzierte Ionenströme an der SSM. ....	184
Abbildung 7.23: Markierung möglicher Ionen-Bindestellen im Homologie-Modell von mFI. ....	190
Abbildung 7.24: Darstellung der durch 600 µM Calcium induzierten Ströme nach Inhibierung von mFI in versetzter Ansicht. ....	191
Abbildung 7.25: Markierung basischer und saurer Aminosäuren und Abhängigkeit der Ladung vom pH-Wert. ...	193
Abbildung 7.26: Vergleich der biexponentiellen Abklingzeiten von mFI-WT und der Y104A-Variante. ....	198
Abbildung 7.27: Anlagerung der Sequenzen und Strukturmodelle von mFweA und seiner Isoformen. ....	201
Abbildung 12.1: Sequenzalinierung ausgewählter Flower-Isoformen mit ClustalW. ....	235
Abbildung 12.2: Western-Blots von mFI-StrepII mit verschiedenen Antikörpern. ....	236
Abbildung 12.3: Reinigung und SEC von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII. ....	236
Abbildung 12.4: Größenausschluss-Chromatographie von mFI-StrepII in PMAL-C8. ....	237
Abbildung 12.5: Western-Blot nach Rekonstitution von mFI-StrepII in DIBMA. ....	237
Abbildung 12.6: Einfluss von Calcium auf das Oligomerisierungsverhalten von mFI-StrepII. ....	238
Abbildung 12.7: Zugabe verschiedener Salze, Reduktionsmittel, Additive und Detergenzkonzentrationen zu mFI-StrepII-Proben und anschließende Analyse mittels SDS-PAGE. ....	238
Abbildung 12.8: Crosslinking von mFI-StrepII mit DSS. ....	239
Abbildung 12.9: Reinigung und SEC von mFI-StrepII in LMNG. ....	239
Abbildung 12.10: HPLC-SAXS-Experimente mit mFI-StrepII in 0,001 % LMNG und 5 % LMNG. ....	240
Abbildung 12.11: Oberflächenmodell von mFI für Frame 1250-1300 in vierfacher Symmetrie. ....	242
Abbildung 12.12: Analyse des Strukturmodells von mFI in P4-Symmetrie von Frame 1250-1300. ....	246
Abbildung 12.13: Oberflächenmodell des mFI-NB14-Komplexes in vierfacher Symmetrie. ....	246
Abbildung 12.14: Ladungstransfer und Vergleich von Calcium-Ein- und Ausstrom auf 1 mm Sensoren. ....	247
Abbildung 12.15: Durch Calcium induzierte, normalisierte Ströme bei verschiedenen LPRs. ....	247
Abbildung 12.16: Durch Calcium induzierte Ströme auf 3 mm Sensoren an der SSM und Berechnung der Abklingzeit für mFI(Y104A)-StrepII. ....	247
Abbildung 12.17: Durch 300, 600 und 900 µM induzierte Ionenströme an der SSM von mFI mit LPR2000. ....	248
Abbildung 12.18: Ladungstransfer und Ströme nach Testen verschiedener Ionen. ....	248
Abbildung 12.19: Abklingzeiten nach Ersetzen von Calcium im aktivierenden Puffer durch andere zweiwertige Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen. ....	249
Abbildung 12.20: SEC von mFI in Anwesenheit von Lanthan. ....	249
Abbildung 12.21: Vorhersage von Transmembrandomänen für mFI und mFI(Y104A) nach Sequenzanalyse durch Protter (Omasits et al., 2014). ....	249
Abbildung 12.22: Reinigung und SEC von mFI(Y104A)-StrepII. ....	250
Abbildung 12.23: HPLC-SAXS-Experiment mit mFI(Y104A)-StrepII und native PAGE. ....	250
Abbildung 12.24: Reinigung und SEC von mFIdC-StrepII. ....	250
Abbildung 12.25: HPLC-SAXS-Messung von mFIdC-StrepII. ....	251
Abbildung 12.26: Reinigung und SEC von SUMOdNmFIdC-StrepII. ....	251
Abbildung 12.27: HIC und SEC von Calmodulin. ....	251

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 12.28: 12 %ige SDS-Gele der Reinigung von GST-CaM.....	252
Abbildung 12.29: SEC von mFI und CaM. ....	252
Abbildung 12.30: SECs von mFI-Strepll. ....	253
Abbildung 12.31: Western-Blot nach Native PAGE von Lysat aus stimulierten CTLs mit überexprimierten TFP-mFwe-Varianten.....	254
Abbildung 12.32: Molekulargewichtsbestimmung von NB14 durch SEC mit RI- und RALS-Messung. ....	254
Abbildung 12.33: Elektronenmikroskopie nach negativer Kontrastierung von mFI in PMAL-C8.....	255
Abbildung 12.34: SECs von mFI in PMAL-C8.....	255
Abbildung 12.35: Ausgewählte 2D-Klassen von mFI in PMAL-C8.....	256
Abbildung 12.36: 2D-Klassen aus 275000 Partikeln von mFI in Fos12 mit PIP <sub>2</sub> nach Zugabe von 2 mM BaCl <sub>2</sub> . ....	256
Abbildung 12.37: Kryo-EM Proben.....	257
Abbildung 12.38: Reinigung von mFI in DDM/CHS.....	257
Abbildung 12.39: 2D-Klassen nach Negative Staining von mFI in DDM/CHS aus 284 Bildern. ....	258
Abbildung 12.40: Reinigung der katalytisch aktiven Domäne Ulp1(403-621) der SUMO-Protease. ....	263



### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme sowie ihre Verwendung und Herkunft. ....	29
Tabelle 4.2: Verwendete Oligonukleotide sowie ihre Sequenz und Verwendung. ....	29
Tabelle 4.3: Verwendete Plasmide zur Proteinproduktion in <i>E. coli</i> . ....	30
Tabelle 4.4: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller oder Bezugsquelle. ....	31
Tabelle 4.5: Verwendete Detergenzien, ihre kritische Mizellenbildungskonzentrationen (cmc) und ihre Hersteller. ....	33
Tabelle 4.6: Verwendete Enzyme, Kits und Standards sowie ihre Hersteller. ....	33
Tabelle 4.7: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper zur immunologischen Detektion mittels Western-Blot. ....	34
Tabelle 4.8: Verwendete Säulenmaterialien, die Methode und ihre Hersteller. ....	34
Tabelle 4.9: Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> . ....	35
Tabelle 4.10: Stocklösungen für Medien. ....	35
Tabelle 4.11: Lösungen für Agarose-Gele. ....	35
Tabelle 4.12: Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gele. ....	36
Tabelle 4.13: Pufferlösungen für den Western-Blot. ....	36
Tabelle 4.14: Puffer zur Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StreptII, mFI-StreptII und Varianten. ....	37
Tabelle 4.15: Puffer zur Reinigung der SUMO-Protease. ....	38
Tabelle 4.16: Puffer zur Reinigung von Calmodulin. ....	38
Tabelle 4.17: Puffer zur Reinigung der Nanobodies. ....	38
Tabelle 4.18: Verwendete Sparse-Matrix-Kristallisationsscreens und ihre Hersteller. ....	39
Tabelle 4.19: Verwendete Geräte und ihre Hersteller. ....	39
Tabelle 4.20: Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller. ....	40
Tabelle 4.21: Verwendete Computer-Programme. ....	41
Tabelle 4.22: Verwendete Beamlines. ....	42
Tabelle 5.1: Verwendete Antibiotika, die Konzentrationen der angesetzten Stocklösungen sowie die Konzentrationen im LB-Medium. ....	44
Tabelle 5.2: Pipettierschema für die Omega-PCR-Reaktionen in einem 50 $\mu$ L Ansatz. ....	46
Tabelle 5.3: Verwendetes PCR-Protokoll für die Omega-PCR. ....	46
Tabelle 5.4: Pipettierschema zur Colony-PCR in einem 20 $\mu$ L Ansatz. ....	46
Tabelle 5.5: Protokoll für die Colony-PCR. ....	47
Tabelle 5.6: Mittels ProtParam berechnete Parameter verschiedener Proteine. ....	50
Tabelle 5.7: Expressionsbedingungen für die rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i> . ....	52
Tabelle 5.8: dn/dc- und dA/dc-Werte ausgewählter Proteine. ....	57
Tabelle 5.9: Auflistung der gesammelten Cryo-EM Datensätze. ....	76
Tabelle 6.1: Anwendung verschiedener Algorithmen zur Vorhersage von Transmembrandomänen in mFI. ....	80
Tabelle 6.2: Guinier-Analyse, Paarverteilungs-Analyse und Berechnung des Molekulargewichtes. ....	93
Tabelle 6.3: DAMMIF-Ergebnisse (Atsas 3.1.1). ....	94
Tabelle 6.4: Vergleich von ab-initio Modellen für Frame 1200-1250 mit verschiedenen Symmetrien. ....	95
Tabelle 6.5: Guinier-Analyse, Paarverteilungs-Analyse und Berechnung des Molekulargewichtes. ....	100
Tabelle 6.6: Vergleich von Oberflächenmodellen berechnet nach HPLC-SAXS-Experimenten von mFI in 0,05 % Fos12, 0,1 % Fos12 und 0,25 % Fos12 unter Verwendung geschnittener Streukurven. ....	101
Tabelle 6.7: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für CaM-P1 und CaM-P2. ....	124
Tabelle 6.8: Epitope ausgewählter Nanobodies und ihre Position in mFI. ....	128
Tabelle 6.9: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für NB14-P4. ....	132
Tabelle 6.10: Guinier-Analyse, Paarverteilungs-Analyse und Berechnung des Molekulargewichtes. ....	134
Tabelle 7.1: Permeationsprofile von mFI unter Berücksichtigung der Stromstärke, der Ladung und der Abklingzeit. ....	186
Tabelle 7.2: Zusammenfassung der SSM-Ergebnisse nach Testen verschiedener Ionen. ....	187
Tabelle 7.3: Normalisierte Peakpotentiale bei mFI, alkyltem mFI und Substrat-geschütztem alkyltem mFI, die durch verschiedene zweiwertige Ionen in einer Konzentration von 300 $\mu$ M ausgelöst wurden. ....	196
Tabelle 7.4: Permeationsprofile von mFI(Y104A) unter Berücksichtigung der Stromstärke, der Ladung und der Abklingzeit. ....	199
Tabelle 12.1: Auswertung der ungeschnittenen SAXS-Kurven. ....	240

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 12.2: DAMMIF-Ergebnisse in P1 unter Verwendung der ungeschnittenen Daten ( $q > 2,2$ ).....	240
Tabelle 12.3: DAMMIF-Ergebnisse von Frame 1200-1250.....	241
Tabelle 12.4: Parameter von P1 Modellen verschiedener Formen für Frame 1250-1300 nach Verfeinerung mit DAMMIN (Svergun, 1999).....	241
Tabelle 12.5: DAMMIF-Ergebnisse für Frame 1250-1300. ....	241
Tabelle 12.6: DAMMIF-Ergebnisse (Atsas 3.2.1) für Frame 1300-1350.....	242
Tabelle 12.7: DAMMIF-Ergebnisse für Frame 1300-1350 unter Verwendung der ungeschnittenen Daten ( $q > 2,2$ ) mit Atsas 3.2.1. ....	243
Tabelle 12.8: Auswertung geschnittener HPLC-SAXS-Daten mit PRIMUS. Die Messungen wurden bei verschiedenen Fos12-Konzentrationen durchgeführt. ....	243
Tabelle 12.9: DAMMIF-Ergebnisse für HPLC-SAXS-Messungen in 0,1 und 0,25 % Fos12 von geschnittenen und ungeschnittenen Daten. ....	244
Tabelle 12.10: Auswertung der HPLC-SAXS-Messung von mFI-StrepII und NB14 mit DAMMIF (Atsas 3.2.1)... ..	245
Tabelle 12.11: SASREF- und FoXS-Ergebnisse aus der HPLC-SAXS-Messung von mFI im Komplex mit NB14. ....	245
Tabelle 12.12: getestete Kristallisationsbedingungen und Anzahl gemessener Kristalle. ....	252
Tabelle 12.13: Negative Staining Proben für die Elektronenmikroskopie. ....	255
Tabelle 12.14: Sequenzanalyse von mFI mit ProtScale (Gasteiger et al., 2003).....	258
Tabelle 12.15: Vorhersage von Transmembrandomänen in mFI.....	261

## Kapitel 1 Zusammenfassung

Das evolutionär konservierte Flower-Protein wurde 2009 in *Drosophila melanogaster* entdeckt und spielt als möglicher synaptischer Calcium-Kanal eine Rolle bei der Kopplung von Exozytose und Endozytose. Mutationen in Flower führen zu Phänotypen, die auf eine gestörte Endozytose hindeuten. Das murine Flower-Homolog mouse Flower-like weist eine ähnliche Funktion auf.

Die Expression bestimmter Flower-Isoformen führt zur Selektion Fitness-defizienter Zellen. Eine ähnliche Rolle hat auch mouse Flower-like, was im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs gezeigt werden konnte. Der sogenannte „Flower-Code“ konnte auch bei humanen Flower-Proteinen nachgewiesen werden.

Der genaue Wirkungsmechanismus von mouse Flower-like als Calcium-Kanal und seine Rolle bei der Zellkompetition sind aufgrund fehlender Strukturdaten noch unklar. Ziel der Arbeit war daher die Gewinnung struktureller und funktioneller Informationen über mouse Flower-like.

Ausreichend große Mengen des Proteins wurden mit Hilfe der Autoinduktion in *Escherichia coli* produziert. Das nach Optimierung der Reinigung erhaltene hochreine Protein lag in verschiedenen Oligomierzuständen vor, was durch verschiedene biochemische Methoden gezeigt werden konnte und wodurch die Kristallisation als Voraussetzung für die Strukturanalyse mittels Röntgenkristallographie erschwert wurde. Die Kleinwinkelröntgenstreuung ermöglichte jedoch die Berechnung von Oberflächenmodellen in verschiedenen Oligomierzuständen und lieferte erste strukturelle Informationen.

Verschiedene Konstrukte wurden zur Verringerung der Flexibilität des Proteins und zur Bewahrung eines stabilen Oligomierzustandes entwickelt.

Als alternative Methode zur Röntgenstrukturanalyse wurde die Kryo-Elektronenmikroskopie angewendet, um die hoch aufgelöste Struktur von mouse-Flower like zu bestimmen, aber aufgrund der verschiedenen Oligomierzustände und der Flexibilität des Proteins konnte keine hochauflösende Struktur erhalten werden. Auch diese Methode zeigte das Vorliegen verschiedener Oligomierzustände.

Nachdem eine Interaktion von mouse Flower-like mit Calmodulin nachgewiesen wurde, folgte ihre nähere Untersuchung. Nach erfolgter Kristallisation von Calmodulin mit mouse Flower-like-Peptiden konnte die Struktur zweier Komplexe bis zu einer Auflösung von 2,15 Å bzw. 1,90 Å geklärt werden.

Zusätzlich erfolgte der Einsatz von Nanobodies als klassische Kristallisationschaperone. Die Struktur eines Nanobodies im Komplex mit einem mouse-Flower like-Peptid konnte bis zu einer Auflösung von 1,43 Å gelöst werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit optimierte Reinigung ermöglichte die Durchführung funktioneller Analysen. Dabei konnte mit der für Calcium-Kanäle neu etablierten Methode der *solid*

## Zusammenfassung

*supported membrane*-Elektrophysiologie erstmals die Funktion von mouse Flower-like als Calcium-Kanal gezeigt werden und die Untersuchung der Substrat-geschützten Alkylierung deutete auf einen Selektivitätsfilter hin, der eine Homologie zu TRPV-Kanälen aufweist. Basierend auf den durchgeführten Experimenten wurde ein Modell mit mouse Flower-like als TRPV5-homologen Kanal erstellt.

## Kapitel 2 Abstract

The evolutionarily conserved Flower protein was discovered in *Drosophila melanogaster* in 2009 and plays a role as a putative synaptic calcium channel, facilitating the coupling of exocytosis and endocytosis. Mutations in Flower lead to phenotypes indicative of impaired endocytosis. The murine homolog, mouse Flower-like, exhibits a similar function.

The expression of specific Flower isoforms results in the selection of fitness-deficient cells. A similar role has been demonstrated for mouse Flower-like, which has been implicated in cancer development. The so-called “Flower code” has also been identified in human Flower proteins. The precise mechanism of action of mouse Flower-like as a calcium channel and its role in cell competition remain unclear due to the lack of structural data. This study aimed to obtain structural and functional information about the protein.

Sufficient protein quantities were produced in *Escherichia coli* using autoinduction. Despite obtaining highly pure protein after optimizing the purification, it existed in various oligomeric states, as confirmed through multiple biochemical methods, making crystallization as prerequisite for X-ray crystallographic structural analysis challenging. However, small-angle X-ray scattering enabled the calculation of surface models in different oligomeric states and provided initial structural information.

Various constructs were designed to reduce protein flexibility and maintain a stable oligomeric state.

As an alternative to X-ray structural analysis, cryo-electron microscopy was employed to determine the high-resolution structure of mouse Flower-like. However, due to the protein's diverse oligomeric states and flexibility, a high-resolution structure could not be obtained. This method also highlighted the presence of different oligomeric states.

The interaction between mouse Flower-like and Calmodulin was detected and further investigated. Crystallization of Calmodulin with mouse Flower-like peptides resulted in two structures at 2,15 Å and 1,90 Å resolution, respectively.

Furthermore, nanobodies were utilized as classical crystallization chaperones. The structure of a nanobody in complex with a mouse Flower-like peptide was resolved to a resolution of 1,43 Å.

The purification method optimized in this study allowed for functional analyses. Using solid-supported membrane electrophysiology, newly established for calcium channels, it was demonstrated for the first time that mouse Flower-like functions as a calcium channel. Substrate-protected alkylation studies hinted at the presence of a selectivity filter with homology to TRPV channels. Based on the conducted experiments, a homology model was created, illustrating mouse Flower-like as a homologous channel to TRPV5.



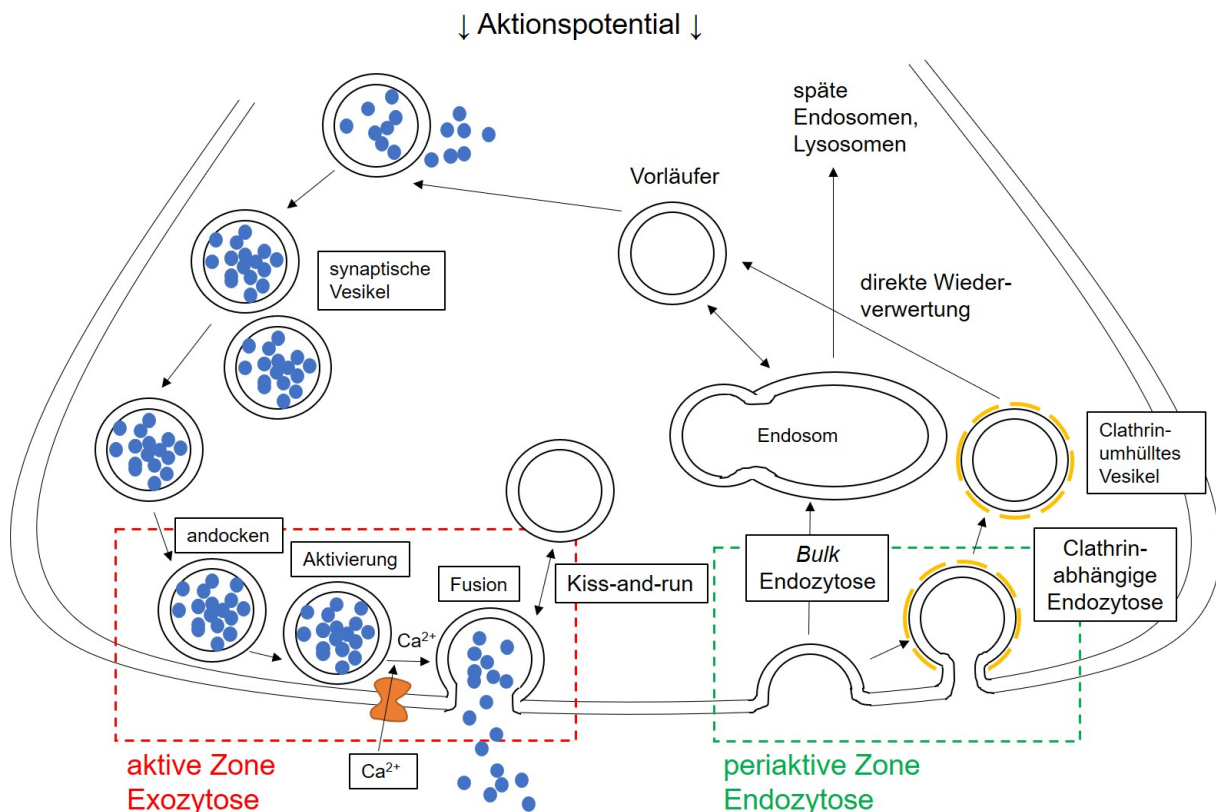
## Kapitel 3 Einleitung

Verschiedene biologische Prozesse wie beispielsweise die Exozytose, die Endozytose, die Tumorgenese und der Zelltod werden durch sekundäre Botenstoffe vermittelt (Patergnani et al., 2020; Zhang et al., 2022). Botenstoffe sind intrazelluläre Substanzen, deren Konzentration als Reaktion auf ein Primärsignal verändert wird. Unter diesen Botenstoffen spielt Calcium eine wichtige Rolle und ist in zahlreiche Signalwege involviert. Calcium wird durch verschiedene Transportsysteme aus dem Zytoplasma geschleust, wodurch die Calciumionenkonzentration im Zytoplasma etwa 100 nM beträgt - mehrere Zehnerpotenzen niedriger als im extrazellulären Medium. Daher kann ein vorübergehender Anstieg der Calcium-Konzentration aufgrund von signalgebenden Ereignissen leicht detektiert werden (Berg et al., 2006). Calcium spielt eine bedeutende Rolle bei der Exo- und Endozytose, die in den folgenden Abschnitten genauer erläutert werden.

### 3.1 Synaptische Signalweiterleitung

An chemischen Synapsen werden Impulse durch die Freisetzung von Neurotransmittern aus dem Axonende der präsynaptischen Zelle in den synaptischen Spalt übertragen. Die chemische synaptische Transmission gilt als hauptsächliche Kommunikationsform zwischen Zellen des Nervensystems (Lin & Scheller, 2000).

Die synaptische Übertragung zwischen prä- und postsynaptischen Neuronen erfolgt, sobald das präsynaptische Neuronenende beim Eintreffen eines Aktionspotentials vorübergehend depolarisiert wird. Daraufhin öffnen sich spannungsgesteuerte Calcium-( $\text{Ca}^{2+}$ )-Kanäle (VGCC, *voltage-gated calcium-channel*), wodurch die zytosolische Calcium-Konzentration lokal ansteigt. Dies treibt wiederum die Exozytose der synaptischen Vesikel voran, wodurch ein elektrisches Signal in ein chemisches umgewandelt wird. Nach ihrer Freisetzung werden die Vesikel endozytiert und wiederverwertet (Südhof, 2004; Brunger et al., 2019). Der Zyklus der synaptischen Vesikel ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt und wird in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.



**Abbildung 3.1: Zusammenfassung des Zyklus der synaptischen Vesikel.** Synaptische Vorläufer-Vesikel werden mit Neurotransmittern (blau) gefüllt und im Zytoplasma gespeichert. In Folge eines Aktionspotentials werden gefüllte Vesikel zur aktiven Zone verlagert, docken an die Plasmamembran an und werden aktiviert. In Folge eines Calcium-Einstroms kommt es zur Fusion. Entweder können die Vesikel schnell durch Schließen der Fusionspore zurückgewonnen werden (*Kiss-and-run*) oder vollständig mit der Plasmamembran verschmelzen. Durch die an der periaktiven Zone stattfindende Endozytose können sie wieder zurückgewonnen werden. Dies kann entweder über die *Bulk*-Endozytose oder die Clathrin-abhängige Endozytose erfolgen. Die Vesikel werden regeneriert und stehen einem neuen Zyklus zur Verfügung (Chanaday & Kavalali, 2017; Jahn & Fasshauer, 2012).

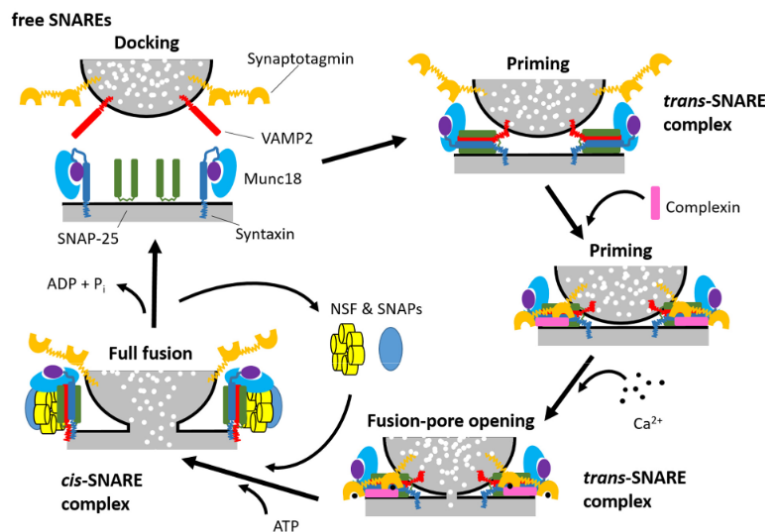
### 3.2 Calcium-abhängige Exozytose

Die Funktion des Gehirns hängt von der Fähigkeit der Neuronen ab, miteinander über Neurotransmitter zu kommunizieren. Präsynaptische Nervenenden setzen sie durch die Calcium-abhängige Exozytose frei. Hierzu docken synaptische Vesikel an die aktive Zone an und werden zur Freisetzung der Neurotransmitter vorbereitet (Rizzoli, 2014).

Dazu durchlaufen die SNARE-(*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) Proteine Synaptobrevin (VAMP2), Syntaxin und SNAP-25 einen Zyklus aus Assemblierung und Disassemblierung (Abbildung 3.2). Zu Beginn des *Docking*-Schritts befindet sich Syntaxin in einem „geschlossenen Zustand“, in dem das SNARE-Motiv blockiert wird und Munc18 bindet (Jahn & Fasshauer, 2012; Szule et al., 2012; Verhage & Sørensen, 2008). Für den Zusammenbau des SNARE-Komplexes muss sich Syntaxin „öffnen“. Es entsteht der *trans*-SNARE-Komplex durch Interaktion des SNARE-Komplexes und Munc18 mit Syntaxin (Ashery et al., 2000; de Wit et al., 2006; Burkhardt et al., 2008; Han et al., 2011; Ma et al., 2011; Gao et al., 2012; Südhof, 2013, 2014; Arnold et al., 2017). Es folgt die Bindung von Complexin, wodurch der Komplex für den Calcium-Auslöser bereit ist (Mohrmann et al., 2015; Zhou et al., 2017). Calcium bindet an Synaptotagmin, was eine Interaktion zwischen Synaptotagmin,



SNAREs und Phospholipiden der Plasmamembran bewirkt (Arnold et al., 2017; Ashery et al., 2000; Gao et al., 2012; Ma et al., 2011; Südhof, 2014). Nach Öffnen der Fusionspore verschmelzen Vesikel- und Plasmamembran, wodurch der *cis*-SNARE-Komplex entsteht (Klenchin & Martin, 2000; Südhof, 2004; Südhof, 2013; Verhage & Sørensen, 2008). Die Bindung von Adenosintriphosphatasen (ATPasen) sorgt für den Abbau des SNARE-Komplexes zu drei freien SNAREs (Mielnicka & Michaluk, 2021). Das Vesikel wird wiederverwertet, kann mit Neurotransmittern gefüllt werden und steht für eine erneute Freisetzung zur Verfügung.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des SNARE/Munc18-Zyklus.** Die SNARE-Proteine durchlaufen einen Zyklus aus Assemblierung und Disassemblierung (Mielnicka & Michaluk, 2021).

Bekannt sind drei verschiedene Exozytose-Arten mit unterschiedlichen Funktionen (Wu et al., 2014): die vollständige Fusion (Zhang et al., 2009), der *Kiss-and-Run-Mechanismus* (siehe 3.3.3) und die *Compound-Exozytose*, bei der mehrere miteinander verschmolzene Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren (Pickett & Edwardson, 2006).

### 3.3 Rückgewinnung synaptischer Vesikel über Endozytose

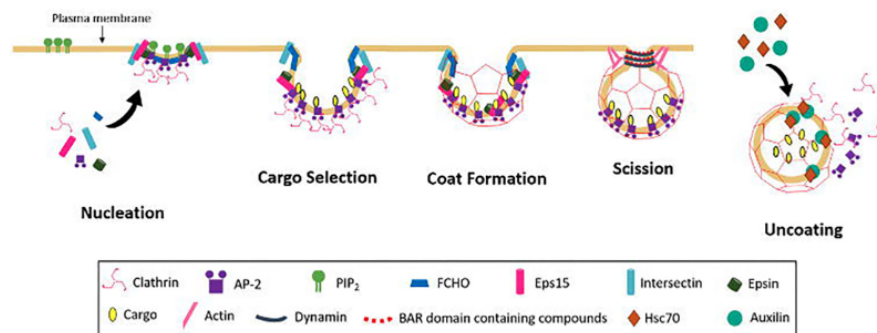
Die Neurotransmission kann ausschließlich durch die Endozytose und Wiederauffüllung synaptischer Vesikel innerhalb der Präsynapse aufrechterhalten werden. Die Endozytose dient der Rückgewinnung synaptischer Vesikel nach erfolgter Exozytose, wie erstmals von Heuser und Reese gezeigt (Heuser & Reese, 1973; Wang & Zhang, 2017). Sie findet im Gegensatz zu der in der aktiven Zone ablaufenden Exozytose in der periaktiven Zone statt. Es gibt verschiedene, unterschiedlich schnell ablaufende Arten der Endozytose (Cano & Tabares, 2016; Smith et al., 2008), die in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt sind und im Folgenden genauer erläutert werden. Es ist anzunehmen, dass alle Arten der Endozytose koexistieren und die Zellen abhängig von ihrer Aktivität zu einem Wechsel zwischen den verschiedenen Modi imstande sind (Gan & Watanabe, 2018).

### 3.3.1 Clathrin-abhängige Endozytose

In mehreren Experimenten konnte die Clathrin-abhängige Endozytose (*clathrin-mediated endocytosis*, CME) als der wichtigste Weg zur Rückgewinnung an konventionellen Synapsen gezeigt werden (Cocucci et al., 2012; Ehrlich et al., 2004; Gad et al., 1998; Heuser & Reese, 1973; Kaksonen & Roux, 2018; Saheki & de Camilli, 2012; Shupliakov et al., 1997).

Clathrin-umhüllte Vesikel können nicht nur aus flachen Plasmamembran-Regionen, sondern auch im Rahmen der *Bulk*-Endozytose aus bereits geformten Plasmamembran-Einstülpungen gebildet werden (Takei et al., 1996; Smith et al., 2008).

Dutzende endozytotische Proteine sind an der Beladung der Vesikel und der Stabilisierung der Clathrin-Hülle beteiligt (McMahon & Boucrot, 2011). Die Rekrutierung, Neuorganisation und der Verlust der Hülle treibt die Endozytose voran und reguliert sie (Sochacki et al., 2017). Die fünf Schritte der Clathrin-abhängigen Endozytose sind in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt und werden im Folgenden genauer beschrieben.



**Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel.** Die Bildung erfolgt in den fünf Schritten Nukleation, Cargo-Auswahl, Bildung, Abspaltung und Entfernen der Hülle (Prichard et al., 2022).

#### Nukleation

Der erste Schritt ist die Markierung endozytotischer „Hot Spots“, an denen die endozytotischen Vesikel gebildet werden. Hierzu häufen sich erste endozytotische Proteine an der Plasmamembran an (Kaksonen & Roux, 2018; Nunez et al., 2011) und induzieren die Krümmung der Plasmamembran (Henne et al., 2010). Diese Nukleationskeime setzen sich aufgrund ihrer Präferenz für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>, PIP<sub>2</sub>) nur an der Plasmamembran zusammen und bestehen aus FCH *domain only* (FCHO) Proteinen, EGFR (*epidermal growth factor receptor*) Pathway Substrat 15 (EPS15) und Intersektinen. PIP<sub>2</sub> ist aktiv an der Rekrutierung endozytotischer Proteine zur Membran beteiligt (Höning et al., 2005; Reider et al., 2009; Stimpson et al., 2009; Henne et al., 2010).

#### Cargo-Auswahl

Die Proteinkomponenten der Clathrinhülle sind verantwortlich für die Rekrutierung bestimmter Transmembranproteine, dem Transportgut (Cargo), das sich an den sich bildenden Vesikel ansammelt (Kaksonen & Roux, 2018). Um eine große Menge an Transportgut zu erkennen und internalisieren zu können, ist eine hohe Anzahl an Adapterproteinen erforderlich. Der am besten untersuchte Cargo-selektive Clathrin-Adapter ist der Adapterproteinkomplex 2 (AP-2),

der nach Clathrin die häufigste Komponente endozytotischer Clathrin-umhüllter Vesikel darstellt (Pearse, 1975; Blondeau et al., 2004). Es wurden weitere Cargo-spezifische Adapterproteine identifiziert, die ihrerseits alle mit AP-2 interagieren (Traub, 2009), was die zentrale Rolle von AP-2 bei der Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln unterstreicht. Adapterproteine erkennen endozytotische Signale wie das YXXØ-Motiv (Collawn et al., 1990; Jadot et al., 1992) in zytosolischen Domänen der Transmembranproteine, die sich nun in der inneren Schicht der Clathrinhüllen befinden (Traub & Bonifacino, 2013).

### **Bildung der Hülle**

Sobald das Transportgut ausgewählt und durch AP-2 oder andere Cargo-spezifische Adapterproteine gebunden ist, erfolgt die Zusammensetzung der Clathrin-Hülle. Die Bindung an das Transportgut führt bei AP-2 zu einer Konformationsänderung, welche die Rekrutierung und Bindung von Clathrin ermöglicht. Dies geschieht an PIP<sub>2</sub>-reichen Regionen in der Plasmamembran (Kelly et al., 2014; Paczkowski et al., 2015).

Clathrin liegt in Form von Triskelen vor. Hierbei handelt es sich um Trimere der schweren Kette des Clathrins, die an drei leichte Ketten gebunden sind und antiparallel zur Ausbildung der Vesikelhülle interagieren (Kirchhausen, 2000; Saheki & de Camilli, 2012; Ungewickell & Branton, 1981). Die Zusammensetzung der Hülle findet statt, sobald die Clathrin-Triskelen beginnen zu einer Art Käfig um das Transportgut herum zu polymerisieren (Kaksonen & Roux, 2018). Dies führt zu einem Vesikel, das noch über einen engen „Hals“ mit der Plasmamembran verbunden ist (Young, 2007). Die Polymerisierung von Clathrin stabilisiert die Krümmung der Membran und verschiebt Cargo-spezifische Adapterproteine und Krümmungseffektoren wie EPS15 oder Epsin zum Rand der sich bildenden Vesikel (McMahon & Boucrot, 2011; Saffarian et al., 2009; Tebar et al., 1996).

### **Abspaltung**

Im nächsten Schritt erfolgt die Vesikelspaltung. Die Knospung des Vesikels hängt vom mechanochemischen Enzym Dynamin ab (Kosaka & Ikeda, 1983), welches als helikaler Kragen um den Hals des Vesikels liegt (Kaksonen & Roux, 2018). Weitere Hilfsproteine verstärken zusammen mit Clathrin zusätzlich die Liposomen-fragmentierende Aktivität der GTPase Dynamin zur Abspaltung des Vesikelhalses (Itoh & De Camilli, 2006; Saheki & de Camilli, 2012; Takei et al., 1996). Die GTP-Hydrolyse verändert die helikale Struktur von Dynamin (Sweitzer & Hinshaw, 1998), wodurch der Radius der Membran innerhalb der Helices reduziert wird und die Membranspannung die Einschnürung erleichtert (Stowell et al., 1999; Roux et al., 2006). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Prichard et al., 2022).

### **Enthüllung**

Der finale Schritt besteht aus der Freisetzung endozytotischer Proteine durch die Entfernung der Hülle, so dass die Bestandteile wiederverwertet werden können und das Vesikel mit seiner

Ziellmembran für den Cargotransport fusionieren kann (Kaksonen & Roux, 2018). Es wird angenommen, dass die Bindung von Auxilin innerhalb des Clathrin-Gitters dessen Verdrehung hervorruft, wodurch die ATPase Hsc70 (*Heat shock cognate*) rekrutiert werden kann. Hsc70 spaltet ATP und bringt durch Bindung mit seiner Substrat-bindenden Domäne weitere Spannung in das Gitter. Eine ausreichende an das Gitter gebundene Anzahl Hsc70 ruft eine akkumulierte Spannung hervor, durch welche die Hülle dissoziiert (Xing et al., 2010).

### 3.3.2 Bulk-Endozytose

Die *Bulk-Endozytose*, auch Aktivitäts-abhängige *Bulk-Endozytose* (*activity dependent bulk endocytosis*, ADBE) genannt, findet nach starker Stimulation dann statt, wenn sehr viele Vesikel innerhalb kurzer Zeit mit der Plasmamembran fusionieren. Überschüssige Plasmamembran wird schnell durch die Bildung großer Membraneinstülpungen zurückgewonnen, die anschließend abgespalten werden. Die erzeugten Endosomen-artigen Intermediate dienen als Vorläufer neuer synaptischer Vesikel. Im Gegensatz zur Clathrin-abhängigen Endozytose findet der Vorgang bereits während der Stimulation und Clathrin-unabhängig statt (Heuser & Reese, 1973; Clayton et al., 2008; Hayashi et al., 2008; Heerssen et al., 2008). Die Reifung der Vesikel erfolgt jedoch erst kurz nach Ende der Stimulation (Nguyen et al., 2012).

Wie alle Formen der Endozytose ist auch die *Bulk-Endozytose* Calcium- und Calmodulin-abhängig. Mit steigendem Calcium-Einstrom beschleunigen sich die Einstülpung und Abspaltung der Membran (Wu et al., 2009). Die Dephosphorylierung der GTPase Dynamin, einem Schlüsselsubstrat von Calcineurin, erfolgt über die gleiche Aktivitätsschwelle, die zur Auslösung der Bulk-Endozytose benötigt wird (Clayton et al., 2009). Deshalb vermutet man einen Aktivitäts-abhängigen Auslöser der *Bulk-Endozytose* durch die Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung (Clayton & Cousin, 2009).

Der nach starker Stimulation stattfindende Calcium-Einstrom aktiviert Calcineurin, das aktiviert Dynamin dephosphoryliert, welches daraufhin an Syndapin bindet. Dynamin interagiert mit einer Reihe von für die Endozytose essenziellen Proteinen, jedoch ist nur die Interaktion mit Syndapin Phosphorylierungs-abhängig (Anggono & Robinson, 2007; Nguyen et al., 2014). Die Bindung an Syndapin induziert die Membrankrümmung und löst die Bildung einer großen Membraneinstülpung aus. Dynamin vermittelt wie auch bei der Clathrin-abhängigen Endozytose (Marks et al., 2001) die Spaltung des entstehenden *Bulk-Endosoms* von der Plasmamembran. Nach der Spaltung wird Dynamin wieder phosphoryliert (Nguyen et al., 2014).

Das *Bulk-Endosom* reift durch Abschnürung vieler kleiner Vesikel aus der Endosomen-artigen Struktur, wobei der zugrunde liegende Mechanismus bislang nicht vollständig geklärt ist (Hayashi et al., 2008; Wu & Wu, 2009). Es gibt Hinweise auf eine Kooperation der Clathrin-

abhängigen Endozytose mit der *Bulk*-Endozytose, um Vesikel zu generieren und die endozytotische Kapazität in sekretorischen Zellen zu erhöhen (Arpino et al., 2022).

### 3.3.3 *Kiss-and-Run*-Endozytose

Die 10-30 Sekunden dauernde Clathrin-abhängige Endozytose ist ein relativ langsamer Prozess, während die *Kiss-and-Run*-Endozytose als exo- und endozytotischer Prozess unter 1-2 Sekunden abläuft (Chanaday et al., 2019). Die Fusion der Vesikel läuft über die Bildung einer  $\Omega$ -förmigen Struktur, die dann entweder mit der Plasmamembran verschmilzt (vollständige Fusion) oder wieder geschlossen wird („*Kiss-and-Run*“). Bei der *Kiss-and-Run*-Endozytose fusionieren Vesikel- und Plasmamembran also unvollständig und die Neurotransmitter werden über eine transiente Fusionspore freigesetzt. Interaktionen der SNARE-Proteine führen zu einem supramolekularen Komplex, der als reversible Fusionspore dient (Fesce et al., 1994; Alabi & Tsien, 2013; Wen et al., 2016; Sharma & Lindau, 2018). Dieser Mechanismus hat kinetische Vorteile und fördert eine effizientere Rückgewinnung der Vesikel (Zhang et al., 2009).

### 3.3.4 Die ultraschnelle Endozytose

Während bestimmter physiologischer Prozesse gilt die Clathrin-abhängige Endozytose als zu langsam. Die ultraschnelle, Clathrin-unabhängige Endozytose wird nicht durch einen Calcium-Einstrom induziert. Vermutlich ist eine Anhäufung zusätzlicher Membran Voraussetzung. Zudem wird Filament-Aktin (F-Aktin) für die Krümmung der Membran benötigt. Dynamin schnürt auch bei diesem Mechanismus die endozytotischen Vesikel ab (Watanabe et al., 2013). Obwohl der Prozess Clathrin-unabhängig ist, hängt er dennoch vom Clathrin-Adapter AP-2 ab (López-Hernández et al., 2022). Dieser Mechanismus entfernt vermutlich die durch Vesikelfusionen hinzukommende Membran neben der aktiven Zone, um so anderen Vesikeln Platz für weitere Fusionen zu schaffen. Hierfür spricht, dass die ultraschnelle Endozytose lateral der Fusionsstellen stattfindet. Das Schicksal der großen endozytotischen Vesikel ist allerdings noch nicht aufgeklärt (Watanabe et al., 2014; Watanabe & Boucrot, 2017).

## 3.4 Kopplung von Exo- und Endozytose

Verschiedene Faktoren koppeln Exo- und Endozytose so, dass das Gleichgewicht zwischen Vesikelpool und Plasmamembran beibehalten wird und die Zellen weder wachsen noch schrumpfen (Wu et al., 2009; Wu et al., 2014; Liang et al., 2017).

Bei der *Kiss-and-Run*-Endozytose sind die beiden Mechanismen direkt gekoppelt (Alabi & Tsien, 2013), während bei der Clathrin-abhängigen und der Bulk-Endozytose nicht genau geklärt ist, wie diese Mechanismen zum richtigen Zeitpunkt ausgelöst werden (Lou, 2018). Möglich wäre die Auslösung der Endozytose durch die im Laufe der Exozytose neu in die Plasmamembran eingebaute Membran oder durch in die Membran übertragene Vesikelbestandteile (Gad et al., 1998; Haucke et al., 2011). Denkbar ist auch die Kopplung

über extrazelluläres Calcium. Dieses löst in sekretorischen Zellen, in denen ein Calcium-Einstrom durch VGCCs die Exozytose hervorruft, auch alle Formen der Endozytose aus (Wu et al., 2009). Die Rolle von Calcium bei der Kopplung von Exo- und Endozytose ist jedoch immer noch umstritten (Xie et al., 2017). Verschiedene Calcium-abhängige Proteine wie Synaptotagmin, die Dynamin phosphorylierende Proteinkinase C oder Calmodulin sind hierbei vermutlich relevant (Xie et al., 2017; Jin et al., 2019).

So kann die Endozytose auch unabhängig von dem die Exozytose auslösenden Calcium-Einstrom eingeleitet werden. Vermutlich löst der während der Stimulation stattfindende Calcium-Einstrom, der auch die Exozytose einleitet, die Bildung von Intermediaten für die Rückgewinnung der synaptischen Vesikel aus; die nachfolgenden Schritte der Endozytose laufen ohne Calcium ab (Ramaswami et al., 1994; Ryan et al., 1996). Kuromi und Kollegen zeigten, dass in *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) unterschiedliche Calcium-Einstrom-Wege voneinander getrennt die Exo- und Endozytose regulieren (Kuromi et al., 2004). Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte synaptische Vesikelprotein Flower, dessen mögliche Funktionen später genau erläutert werden, könnte einen Calcium-Kanal bilden, der zur Kopplung von Exo- und Endozytose beiträgt (Yao et al., 2009). Dabei spielt Flower bei der Clathrin-abhängigen Endozytose eher eine regulatorische als eine auslösende Rolle (Yao et al., 2017). Xue und Kollegen waren dagegen der Ansicht, dass Spannungs-abhängige Calcium-Kanäle des P/Q-Typs Exo- und Endozytose koppeln (Xue et al., 2012).

### 3.5 Calmodulin

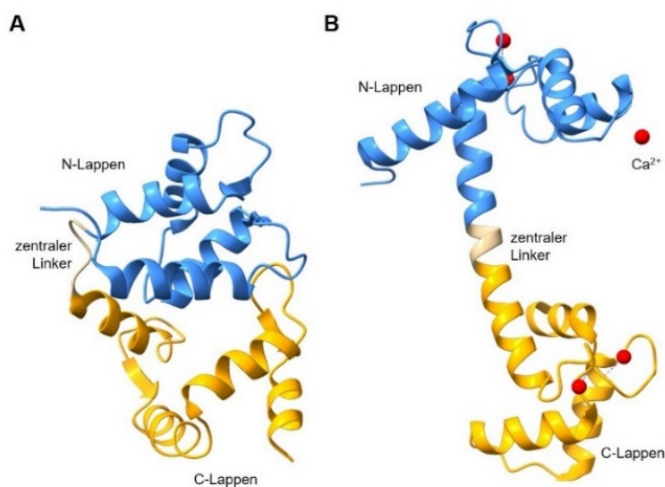
Bei der Endozytose fungiert Calmodulin vermutlich als molekularer Detektor des vorübergehenden Calcium-Einstroms durch die Exozytose und leitet so alle Formen der Endozytose ein. Dazu nimmt Calmodulin über seine N- und C-terminalen Domänen verschiedene Calcium-Konzentrationen wahr (Wu et al., 2009). Die Interaktion mit Calmodulin aktiviert die Phosphatase Calcineurin, die daraufhin endozytotische Proteine dephosphoryliert, was die Endozytose einleitet (Clayton et al., 2009; Wu et al., 2014).

Des Weiteren hat die Interaktion von Apo-CaM und Calcium-CaM mit einer Reihe von Ionenkanälen (Gordon-Shaag et al., 2008; Griessmeier et al., 2009; Halling et al., 2006; Lau et al., 2012) entweder eine aktivierende oder inhibierende Wirkung (Tidow & Nissen, 2013).

Das etwa 18 kDa schwere Calmodulin (CALcium MODULating, CaM) besitzt zwei EF-Hand-Paare mit jeweils zwei Calcium-Bindestellen. Ein EF-Hand-Motiv besteht aus einer N-terminalen Helix (E-Helix), gefolgt von einer Calcium-koordinierenden Schleife und einer C-terminalen Helix (F-Helix). Es kommt in allen Zellen einschließlich Neuronen vor und fungiert als intrazellulärer Calcium-Sensor. Es vermittelt Calcium-gesteuerte Prozesse und reguliert so die Aktivität vieler verschiedener Zielproteine (Chin & Means, 2000; Xia & Storm, 2005; Pepke et al., 2010).

Die Affinität von Calmodulin für Calcium liegt innerhalb des Bereiches intrazellulärer Calcium-Konzentrationen ( $K_d = 10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  M), wodurch die Wahrnehmung der Calcium-Ströme ermöglicht wird (Chin & Means, 2000).

Die Bindung von Calcium an Calmodulin verstärkt aufgrund einer Konformationsänderung die Affinität zu seinen Zielproteinen. In Abwesenheit von Calcium (Apo-CaM) liegt es geschlossen vor, es kann aber ebenso halboffen existieren, wodurch die für die Interaktion mit Zielproteinen wichtige hydrophobe Bereiche exponiert werden. In Anwesenheit von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM) liegt es offen und gestreckt vor (Olwin & Storm, 1985; Swindells & Ikura, 1996; Grabarek, 2006), wie in Abbildung 3.4 dargestellt ist.



**Abbildung 3.4: Kristallstrukturen von Calmodulin in verschiedenen Konformationen.** **A** Apo-Calmodulin (PDB: 1QX5). **B** Calcium-Calmodulin (PDB: 1EXR). Der N-Lappen ist in blau dargestellt, der zentrale Linker in beige, der C-Lappen in gelb und die Calcium-Ionen in rot.

### 3.6 TRPV-Kanäle

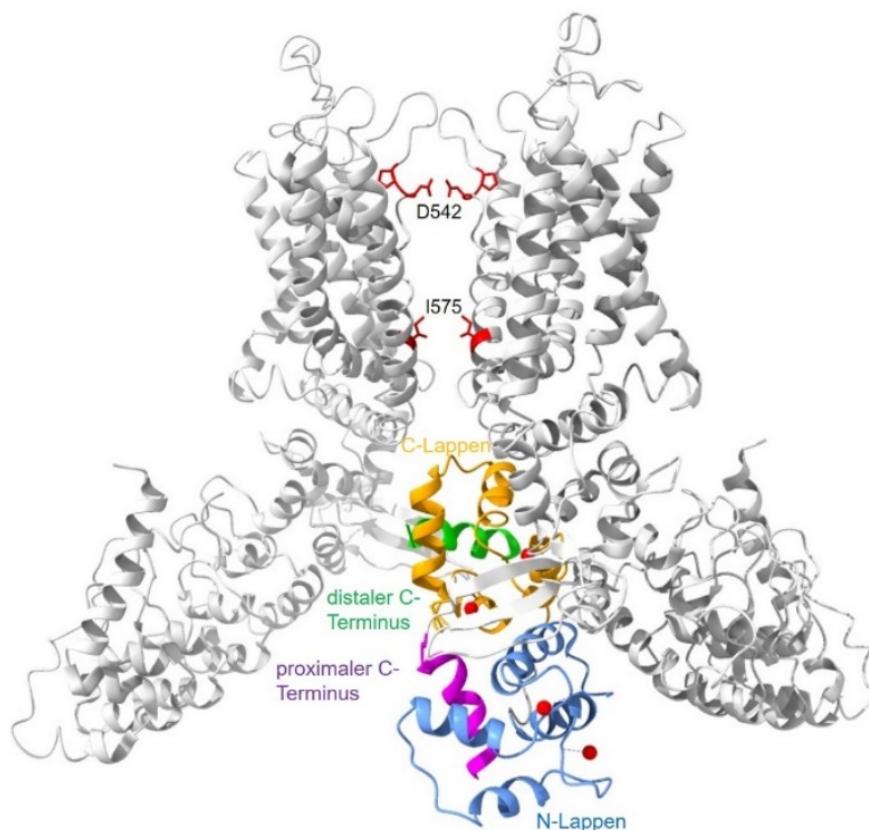
Bei *Transient Receptor Potential* (TRP)-Kanälen handelt es sich um eine der größten Klassen von Ionen-Kanälen (Venkatachalam & Montell, 2007). Sie spielen eine Schlüsselrolle in der menschlichen Physiologie und sind mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert (Nilius, 2007). Basierend auf Sequenz-Homologien besteht die Säuger-TRP-Familie aus sechs Unterfamilien; kanonisch (*canonical*, TRPC), Vanilloid (TRPV), Polycystin (TRPP), Ankyrin (TRPA) und Mucolipin (TRPML) (Clapham et al., 2001).

Auch wenn TRPV-Kanäle nicht an der Endozytose beteiligt sind, wurde für Flower-Proteine eine Sequenz-Ähnlichkeit mit dem Selektivitätsfilter von TRPV5 und TRPV6 festgestellt (Yao et al., 2009), weshalb ihre Struktur und Funktion im Folgenden kurz beschrieben wird.

TRPV5 und TRPV6 unterscheiden sich von den TRPV-Kanälen 1-4 und tragen die Hauptrolle bei der Beibehaltung der Calcium-Level im Blut höherer Organismen (Peng et al., 2018). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TRP-Familie weisen sie eine starke Calcium-Selektivität auf (Nilius et al., 2000). Beide Kanäle sind konstitutiv bei einem physiologischen Membranpotential geöffnet und ein Calcium-abhängiger Feedback-Mechanismus erlaubt die schnelle Inaktivierung (Nilius et al., 2001), was einen übermäßigen Calcium-Einstrom



verhindert. Hierbei ist die Calcium-abhängige Bindung von ein bis zwei Calmodulin-Molekülen pro TRPV5/6-Tetramer involviert (Dang et al., 2019; Groot et al., 2011). Mittels Kryo-Elektronenmikroskopie wurde die Inaktivierung von TRPV5 durch CaM aufgeschlüsselt. Bei basaler intrazellulärer Calcium-Konzentration interagiert der C-Lappen von CaM mit der C-terminalen distalen Helix von TRPV5, während der N-Lappen in einem Calcium-freien Zustand vorliegt. Ein Calcium-Einstrom durch TRPV5 erhöht die Calcium-Konzentration, was die Bindung von Calcium an den N-Lappen von CaM und die Interaktion mit der C-terminalen proximalen Helix von TRPV5 ermöglicht. Diese Interaktion positioniert den C-Lappen von CaM so, dass der Ausgang des Kanals blockiert wird (Dang et al., 2019). Abbildung 3.5 zeigt die Struktur des TRPV5-CaM-Komplexes (pdb-Eintrag 6o20). Zur besseren Übersicht sind nur die Ketten A und C des Tetramers gezeigt. Die Reste D542 im Selektivitätsfilter und I575 im unteren Bereich engen die Pore ein.



**Abbildung 3.5: Struktur des TRPV5-CaM-Komplexes (PDB: 6O20).** Zur besseren Übersicht sind nur die Ketten A und C des Tetramers dargestellt. Die die Pore einengenden Reste D542 und I575 sind rot markiert. Der N-Lappen von CaM (blau) bindet die proximale Helix des C-Terminus von TRPV5 (grün, AS 639-653), der C-Lappen von CaM (orange) bindet die distale Helix (magenta, AS 698-710) (Dang et al., 2019).

### 3.7 Das Flower-Protein in *D. melanogaster*

In den folgenden Kapiteln wird die Rolle des Flower-Proteins in *D. melanogaster* beschrieben.

#### 3.7.1 Das Flower-Protein als Calciumkanal in *D. melanogaster*

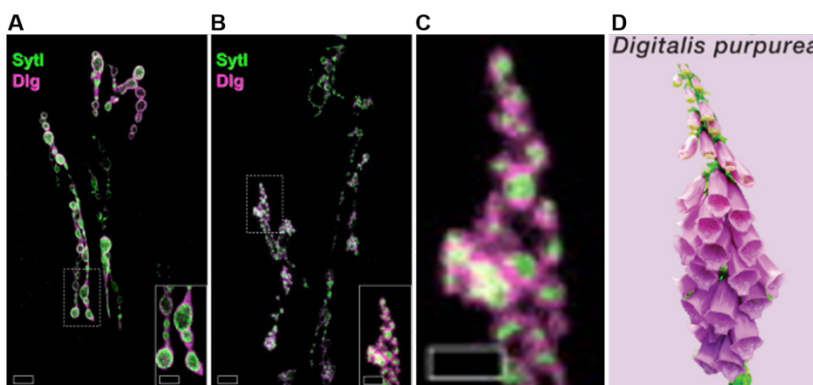
Das Flower-Protein wurde 2009 im Rahmen eines genetischen Screens bei der Untersuchung verschiedener Mutanten der synaptischen Transmission identifiziert (Yao et al., 2009).



Dabei wies die Mutante 3L5 eine gestörte Endozytose auf, wie sie von Mutationen endozytotischer Proteine bekannt ist (Koh et al., 2007; Dickman et al., 2006). So existiert beispielsweise eine geringere Anzahl, dafür aber größere, in der Form veränderte synaptische Vesikel. Außerdem traten nach Stimulation größere Mengen endozytotischer Intermediate auf und die Zahl präsynaptischer Endknöpfchen an der neuromuskulären Endplatte war so erhöht, dass diese gruppiert vorlagen.

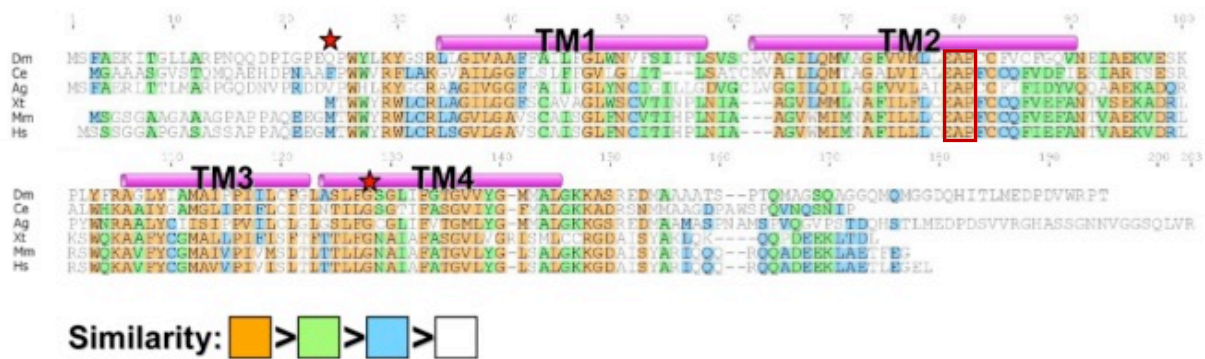
3L5 auf dem Chromosom 3L entspricht dem Gen CG6151. Die drei durch alternatives Spleißen entstehenden Isoformen CG6151-RA, -RB und -RC (Tweedie et al., 2008) kodieren für aus etwa 190 Aminosäuren bestehende Proteine, die nach Sequenzanalysen drei oder vier Transmembrandomänen enthalten. CG6151 ist ein evolutionär vom Wurm bis zum Menschen konserviertes Gen.

Die Ähnlichkeit der präsynaptischen Endknöpfchen der 3L5-Mutante mit der Blüte des Roten Fingerhuts (*Digitalis purpurea*) gab dem Protein den Namen Flower (Yao et al., 2009) (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Immunhistochemische Färbungen der präsynaptischen Endknöpfchen.** A Wildtyp-Kontrolle. B Flower-Mutante 3L5. C Vergrößerte Ansicht der Flower-Mutante. D Die Mutation führt zu einer blütenähnlichen Morphologie, die an die Blüte des Roten Fingerhuts (*Digitalis purpurea*) erinnert. Die Markierung erfolgte mit dem synaptischen Vesikel-Marker Synaptotagmin (grün) und dem postsynaptischen Marker Dlg (purpur) (nach Brose & Neher, 2009; Yao et al., 2009).

Flower weist keine Ähnlichkeit zu anderen endozytotischen Proteinen auf (Brose & Neher, 2009), beinhaltet aber ein konserviertes Glutamat-Alanin-Prolin-(EAP)-Motiv in der zweiten putativen Transmembran-Helix (Abbildung 3.7). Dieses ähnelt dem neun Aminosäuren langen Motiv des Selektivitätsfilters von TRPV5/6-Ionenkanälen (Owsianik et al., 2006; Yao et al., 2009). Auch in anderen Arten von Ionenkanälen, wie VGCCs oder dem CRACM/Orai Calcium-Kanal wird die Pore auf ähnliche Weise durch negativ geladene Aminosäuren gebildet (Yue et al., 2001; Hoenderop et al., 2003; Sather & McCleskey, 2003; Venkatachalam & Montell, 2007).



**Abbildung 3.7: Alinierung der Sequenzen verschiedener CG6151-Orthologe.** Alinierung der Sequenzen verschiedener CG6151-Orthologe aus *Drosophila melanogaster* (Dm), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Anopheles gambiae* (Ag), *Xenopus tropicalis* (Xt), *Mus musculus* (Mm) und *Homo sapiens* (Hs). Die putativen Membranregionen sind lila markiert. Das konservierte EAP-Motiv in der zweiten Transmembrandomäne ist durch einen roten Kasten markiert. Die höchste Homologie liegt in den vorhergesagten Transmembrandomänen vor, was durch die orange Markierung angezeigt wird (Yao et al., 2009).

Lanthan ( $\text{La}^{3+}$ ) wird zur Blockade Calcium-abhängiger Transportaktivitäten verwendet (Reeves & Condrescu, 2003). Schon geringe Konzentrationen davon verhinderten einen durch Flower vermittelten Calcium-Einstrom und somit die davon abhängige *Bulk*-Endozytose. Wegen einer nicht vollständigen Eliminierung der *Bulk*-Endozytose durch den Verlust von Flower lässt sich vermuten, dass VGCCs parallel zu Flower arbeiten (Yao et al., 2017).

### 3.7.2 Flower und $\text{PIP}_2$

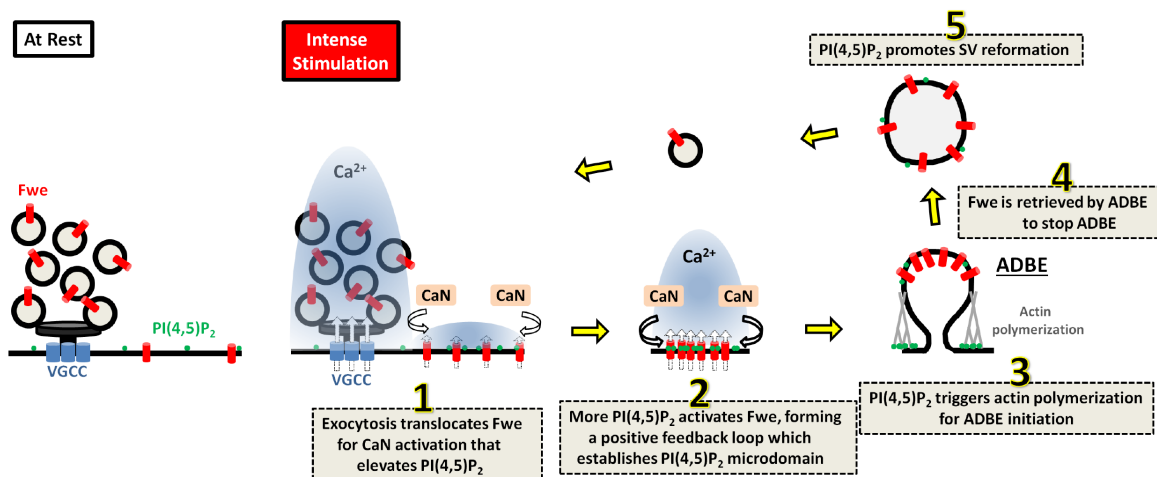
Es gibt Hinweise, dass die Polymerisierung von Aktin für die Membraneinstülpung zur Generierung von Bulk-Endosomen verantwortlich ist (Gormal et al., 2015; Wu et al., 2016; Soykan et al., 2017). Es ist bekannt, dass  $\text{PIP}_2$  die Polymerisierung von Aktin durch Aktivierung einer Reihe von Aktin-Modulatoren vorantreibt (Janmey et al., 2018). Vor Ablauf der Aktin-Polymerisierung bilden sich  $\text{PIP}_2$ -Mikrodomänen, welche die räumliche Information liefern könnten, wo die Membranen sich einstülpen sollen. Der Mechanismus, der die Bildung dieser Mikrodomänen in Folge starker Stimulation an der periaktiven Zone initiiert, ist jedoch unbekannt (Li et al., 2020).

Die  $\text{PIP}_2$ -Mikrodomänen sind sowohl für die ADBE als auch für die Neubildung synaptischer Vesikel essenziell und spielen früh eine Rolle bei der Neubildung synaptischer Vesikel aus *Bulk*-Endosomen. Die Calcium-Abhängigkeit der  $\text{PIP}_2$ -Mikrodomänen führte zu der Hypothese, dass eine durch starke Stimulation ausgelöste Exozytose das Anhäufen von Flower an der periaktiven Zone vorantreibt. Hier könnte Flower den Calcium-Einstrom ermöglichen, der die Bildung der  $\text{PIP}_2$ -Mikrodomänen induziert (Li et al., 2020).

Das neben Calmodulin als Calcium-Sensor der ADBE geltende Calcineurin (Wu et al., 2014) steuert vermutlich den Calcium-Einstrom, der durch Flower zur Induktion der  $\text{PIP}_2$ -Mikrodomänen betrieben wird. Die Aktivierung von Calcineurin könnte die  $\text{PIP}_2$ -Aktivität verstärken, die wiederum die Calcium-Kanal-Aktivität von Flower zur weiteren Erhöhung des intrazellulären Calcium-Levels vorantreibt (Li et al., 2020).

Eine Funktion von PIP<sub>2</sub> ist die Regulierung der Kanalaktivität durch elektrostatische Bindung an positiv geladene Aminosäuren von Ionenkanälen, die an die Transmembrandomänen angrenzen (Hille et al., 2015; Suh & Hille, 2008). In Flower sind solche evolutionär konservierten Aminosäuren vorhanden, während andere zytosolische Reste eine geringe Konservierung zeigen. Diese positiv geladenen Aminosäuren wurden zu ungeladenen Alaninen mutiert, um elektrostatische Interaktionen zu unterbinden. So konnte die spezifische Bindung von Flower an PIP<sub>2</sub> über drei Regionen gezeigt werden. Es handelt sich um die N-terminalen Aminosäuren K29 und R33, die in der Mitte liegenden Aminosäuren K95, K100 und R105 sowie die C-terminalen Aminosäuren K146, K147 und R150. Die Mutation der N-terminalen Reste K29 und R33 führte zum Verlust der Fähigkeit intrazelluläre Calcium-Level beizubehalten. Daraus ist zu schließen, dass die auf Flower und PIP<sub>2</sub> basierende positive Feedback-Schleife auf der PIP<sub>2</sub>-abhängigen *Gating*-Kontrolle von Flower beruht. Die K29A/R33A-Variante ist nicht in der Lage die ADBE-Defekte auszugleichen (Li et al., 2020). Die Überexpression von Flower bei einem Knockdown von CanA1, einer Calcineurin Isoform in *D. melanogaster*, kehrte den ADBE-Defekt um. Vermutlich ist Calcineurin an der Feedback-Schleife zwischen Flower und PIP<sub>2</sub> beteiligt, indem der Flower-abhängige Calcium-Einstrom vermehrt Calcineurin aktiviert, welches wiederum das PIP<sub>2</sub>-Level erhöht (Li et al., 2020).

Es wurde bereits gezeigt, dass das Sortieren der Proteine synaptischer Vesikel bei der Clathrin-abhängigen Endozytose durch das Zusammenspiel von PIP<sub>2</sub> und Adapterproteinkomplexen erreicht wird (Saheki & de Camilli, 2012; Traub & Bonifacio, 2013). Für die ADBE existiert auch ein solcher Sortierungsmechanismus (Kokotos et al., 2019) und zur Bildung synaptischer Vesikel aus dem *Bulk*-Endosom werden Clathrin und Adapterproteinkomplexe benötigt (Kokotos et al., 2019; Kononenko et al., 2014; Park et al., 2016). Bei der Untersuchung der Sortierung von Flower in *Bulk*-Endosomen während der ADBE wurde ein Mechanismus aufgedeckt, bei dem Flower, nachdem es die ADBE initiiert hat, mit *Bulk*-Endosomen zurückgewonnen wird. Außerdem erleichtern die PIP<sub>2</sub>-Mikrodomänen die Wiedergewinnung von Flower aus den *Bulk*-Endosomen. Flower als Auslöser der ADBE wird über einen negativen Feedback-Mechanismus entfernt, was die übermäßige Aufnahme von Membran durch Reduktion der Endozytose verhindert. Basierend auf den beschriebenen Ergebnissen wurde das in Abbildung 3.8 dargestellte Modell vorgeschlagen, in dem die Rolle von Flower-abhängigen PIP<sub>2</sub>-Mikrodomänen bei der Koordinierung der ADBE und der Neubildung synaptischer Vesikel aus Bulk-Endosomen dargestellt ist (Li et al., 2020).



**Abbildung 3.8: Positive Feedback-Schleife zwischen Flower und PIP<sub>2</sub>.** In Folge starker Stimulation wird Flower im Laufe der Exozytose aus den synaptischen Vesikeln in die periaktive Zone übertragen. Hier sorgt aktiviertes Flower für ein geringes Calcium-Level, das Calcineurin (CaN) aktiviert, welches PIP<sub>2</sub> hochreguliert (Schritt 1). Eine erhöhte PIP<sub>2</sub>-Konzentration verstärkt die Calcium-Kanal-Aktivität von Flower und schafft so eine positive Feedback-Schleife, die die Bildung von PIP<sub>2</sub>-Mikrodomänen induziert (Schritt 2). Hohe PIP<sub>2</sub>-Level innerhalb dieser Mikrodomänen rufen *Bulk*-Membraneinstülpungen hervor, indem sie die Aktin-Polymerisation vorantreiben (Schritt 3). Parallel dazu erleichtert PIP<sub>2</sub> die Rückgewinnung von Flower (Schritt 4) und beendet dabei den ADBE-Prozess. Schließlich treiben die PIP<sub>2</sub>-Mikrodomänen die Neubildung der synaptischen Vesikel aus den *Bulk*-Endosomen voran (Schritt 5) (Li et al., 2020).

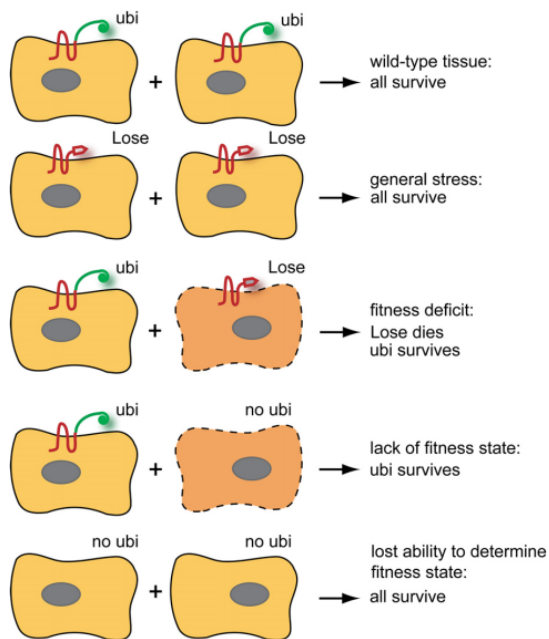
### 3.7.3 Zellkompetition

Während der Entwicklung und im adulten Alter sind Organismen äußeren Einflüssen und endogenem Stress ausgesetzt, was sich auf die Zellviabilität auswirken und Krankheiten verursachen kann. Zellautonome Mechanismen zur Überwachung der intrinsischen zellulären Viabilität, wie zum Beispiel die DNS-Reparaturmaschinerie, sind intensiv untersucht (Sancar et al., 2004). Ein weniger gut charakterisierter, auf nicht-autonomer Zellinteraktion basierender Überwachungsmechanismus ist die Zellkompetition.

#### 3.7.3.1 Zellkompetition und der „Flower-Code“ in *D. melanogaster*

In *D. melanogaster* besteht die physiologische Rolle der Zellkompetition aus der Feinabstimmung des visuellen Systems während der Entwicklung (Merino et al., 2013), dem Ersatz von altem oder beschädigtem Hirngewebe während des Alterns oder nach Verletzung (Moreno et al., 2015) und dem Schutz des Langzeitgedächtnisses (Coelho et al., 2018).

Mehreren Studien der Gruppe von Eduardo Moreno zufolge ist Flower in *D. melanogaster* am Prozess der Zellkompetition beteiligt (Rhiner et al., 2010; Merino et al., 2013; Moreno et al., 2015). Der „Flower-Code“ wurde in den Imaginalscheiben als Mechanismus beschrieben, der von proliferierenden Epithelzellen verwendet wurde, um die sich während des Gewebewachstums zu langsam teilenden Zellen zu erkennen, zu eliminieren und schließlich zu ersetzen (Simpson, 1979; Rhiner et al., 2010). Somit dient der Prozess zur Beibehaltung der Organgröße und der Qualitätskontrolle in normalen Geweben, wird aber auch von Krebszellen zur Tötung benachbarter Wildtypzellen ausgenutzt (Moreno et al., 2002; Moreno, 2008; Casas-Tinto et al., 2011; Merino et al., 2016).



**Abbildung 3.9: Modell Flower-abhängiger Zellkompetition in *D. melanogaster*.** In gesunden Zellen wird  $\text{Flower}^{\text{ubi}}$  (grün) ständig exprimiert und dient als Signal für zelluläre Fitness. Gleichmäßige Hochregulation von  $\text{Flower}^{\text{Lose-A}}$  oder  $\text{Flower}^{\text{Lose-B}}$  (rot) führt nicht zur durch Zellkompetition induzierten Apoptose. Fitness-defiziente Zellen sterben unabhängig von der Expression einer Verlierer-Isoform, wenn die benachbarte Zelle  $\text{Flower}^{\text{ubi}}$  exprimiert. Durch einen vollständigen Verlust von Flower in einem Gewebe können die Zellen den Fitnesszustand nicht mehr ermitteln (Rhiner et al., 2010).

Moreno und Kollegen beobachteten eine Hochregulierung von Flower in Fitness-defizienten Zellen. In *D. melanogaster* werden die drei sich in ihrem C-Terminus unterscheidenden Flower-Isoformen  $\text{Flower}^{\text{ubi}}$ ,  $\text{Flower}^{\text{Lose-A}}$  und  $\text{Flower}^{\text{Lose-B}}$  durch alternatives Spleißen erzeugt. In gesundem Gewebe wird die ubi-Isoform ubiquitär gleichmäßig exprimiert, was eine gute Fitness anzeigt, während die Lose-Isoformen ohne Zellkompetition nicht detektiert werden konnten. Allerdings können Zellen höherer Fitness die Expression beider Lose-Isoformen in benachbarten, Fitness-defizienten Zellen induzieren und so für deren Eliminierung über Apoptose sorgen. Eine Überexpression der Lose-Isoformen in Nachbarschaft von Wildtyp-Zellen, nicht jedoch in Nachbarschaft von Lose-Isoform-exprimierenden Zellen, führte auch in Abwesenheit von Zellkompetition zur Apoptose. Werden alle drei Isoformen herunterreguliert, überleben alle Zellen und es findet zunächst keine Zellkompetition statt, wohingegen ein alleiniger *Knock-down* von  $\text{Flower}^{\text{ubi}}$  in Anwesenheit von Wildtyp-Zellen auch zur Eliminierung schwacher Zellen führt. Daraus lässt sich schließen, dass Zellen einen relativen Unterschied im Expressionslevel der Lose-Isoformen detektieren müssen, um Lose-exprimierende Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Dies wurde als „Flower-Code“ bezeichnet, der in Abbildung 3.9 dargestellt ist (Rhiner et al., 2010; Merino et al., 2013). Die Positionierung der unterschiedlichen C-Terminalen Enden in den Extrazellarraum ermöglicht möglicherweise die Wahrnehmung des Fitness-Zustands der Zelle und treibt den Prozess voran (Rhiner et al., 2010; Merino et al., 2015).

Auch im adulten Gehirn konnte nachgewiesen werden, dass der „Flower-Code“ nicht nur bei der Entwicklung, sondern auch zur Regeneration nach einer Hirnverletzung verwendet wird.

Beschädigtes Gewebe kann um proliferierende Bereiche, in denen die *de novo* Neurogenese stattfindet, eliminiert werden. So wurde erstmals gezeigt, dass Fitness-Marker auch in adulten, nicht-proliferierendem Geweben wie dem Nervensystem aktiviert werden können (Moreno et al., 2015).

Flower<sup>Lose</sup> Zellen können die Expression des SPARC Proteins (*secreted protein acidic and cysteine-rich*) hochregulieren. Dies inhibiert wiederum die Caspase-Induktion der Apoptose als vorübergehende Verteidigung gegen eine Eliminierung (Portela et al., 2010; Parker et al., 2021). Somit könnte SPARC als Verteidigung gegen unnötige Säuberung dienen, insbesondere als Mittel, um der Superkompetition entgegenzuwirken. Superkompetitor-Zellen weisen eine erhöhte Fitness auf und können so Wildtyp-Zellen eliminieren, ein auch von Tumorzellen in ähnlicher Weise genutzter Mechanismus (Moreno & Basler, 2004; Johnston, 2014). Im Gegensatz dazu sorgt die Hochregulierung des Gens *ahuizotl* (Azot) durch Verliererzellen, insbesondere in geschwächten Zellen mit verminderter SPARC-Expression, für eine kompetitive Eliminierung durch Apoptose (Merino et al., 2015). Azot ist ein Calcium-bindendes, zu Calmodulin homologes Protein mit vier EF-Händen, welches ausschließlich auf die Zellkompetitions-bedingte Apoptose ausgerichtet ist (Portela et al., 2010; Lolo et al., 2012). Verschiedene Auslöser der Kompetition und Superkompetition beeinflussen die Expression von Flower<sup>Lose</sup>, Azot und SPARC (Rhiner et al., 2010; Merino et al., 2015).

### 3.7.3.2 Die Rolle von Flower bei der Neurodegeneration in *D. melanogaster*

In Bezug auf Alters-assoziierte Krankheiten, insbesondere neurodegenerative, wurde die Zellkompetition noch nicht vollständig untersucht. Erstmals berichteten Coelho und Kollegen (Coelho et al., 2018) von einer schützenden Rolle der Zellkompetition gegen Neurodegeneration.

Der Verlust von Nerven ist ein Schlüsselsymptom der am weitesten verbreiteten neurodegenerative Erkrankung Alzheimer, die unter anderem durch die Ablagerung von extrazellulären Amyloid-Plaques im Gehirn entsteht. Dabei könnte eine  $\beta$ -Amyloid-bedingte Toxizität der primäre Auslöser der Krankheit sein (Braak & Braak, 1991; Hillen, 2019).

Zum Erreichen eines Zustandes verminderter Fitness wurde Amyloid- $\beta$ 42 in Neuronen von *D. melanogaster* überexprimiert, was zu einer starken Hochregulation von Flower<sup>LoseB</sup> führte. Auch Azot wurde als Marker niedriger Fitness hochreguliert (Coelho et al., 2018).

Die Expression einer pathogenen Form des humanen *huntingtin*-Gens, das ebenfalls einen degenerativen Phänotyp induziert und mit der Entstehung der Huntington-Krankheit in Verbindung steht, führte ebenfalls zu einer Hochregulierung von Flower<sup>LoseB</sup> und einem erhöhten Zelltod (Coelho et al., 2018).

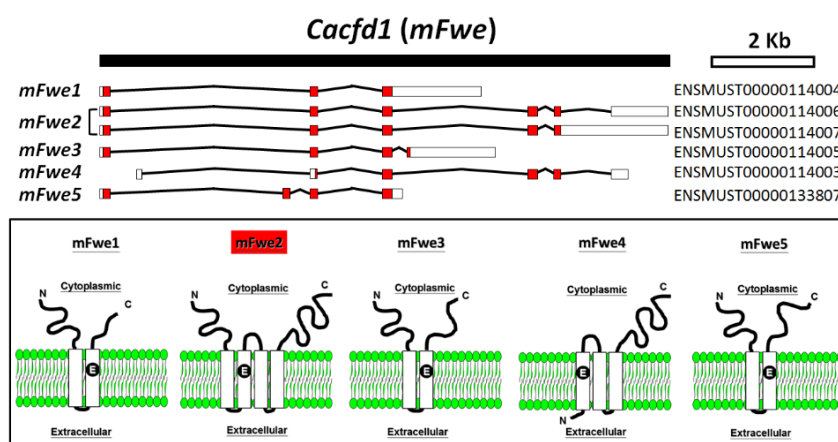
Die schützende Rolle der Zellkompetition gegen Neurodegeneration könnte neue Wege für die Behandlung von Alzheimer eröffnen, mit dem Ziel, die Eliminierung dysfunktionaler



Neuronen in frühen Stadien der Alzheimer-Pathologie zu unterstützen (Coelho et al., 2018; Coelho & Moreno, 2019).

### 3.8 Das Flower-Protein in *Mus musculus*, mouse *Flower-like*

Petrova und Kollegen beschrieben 2012 das murine Flower-Homolog *mouse Flower-like* (mFwe, mFI). Es kodiert für sechs mögliche Transkripte, die in fünf Isoformen translatiert werden (Petrova et al., 2012; Yao et al., 2017). Diese sind in Abbildung 3.10 schematisch dargestellt. Die Isoform mFwe2 (mFIA, mFweA) ist dem Flower von *Drosophila* am ähnlichsten (Yao et al., 2017). In der Literatur unterscheidet sich die Nomenklatur von mouse-Flower-Proteinen, wobei mFwe1 mFweB, mFwe2 mFweA, mFwe3 mFweE und mFwe4 mFID entspricht.



**Abbildung 3.10: Genstruktur von mFwe.** Schematische Darstellung des *Cacfd1* (mFwe) Genloкус, bestehend aus den untranslatierten Regionen (weiß), den kodierenden Exons (rot) und den Introns (schwarz). Sechs alternative mRNA-Spleiß-Isoformen (oben rechts) bilden fünf Protein-Isoformen (unten). Mögliche Calcium-Bindestellen (Glutamat, E) sind in der Transmembranregion hervorgehoben. Die rot markierte Isoform mFwe2 ähnelt dem *D. melanogaster* Flower am meisten (Yao et al., 2017).

#### 3.8.1 Mouse *Flower-like* und Zellkompetition in *Mus musculus*

Petrova und Kollegen untersuchten erstmals die bislang unbekannte Rolle von mFwe in Zellkompetitionsprozessen.

Das Expressionslevel aller mFwe-Isoformen in adulten Mäusen ist insgesamt gering, die Expression der Isoformen mFwe1 und mFwe2 ist am stärksten und in den Augen und im Gehirn höher als im Rest der Gewebe. Eine Überexpression der mFwe-Isoformen in verschiedenen Arten von Säugerzellen bewirkte keine Zellkompetition wie in *D. melanogaster*. Die heterologe Expression der mFwe-Isoformen mFwe1 und mFwe3 in *D. melanogaster* führte jedoch zur Apoptose der umliegenden Zellen, wie auch bei den Lose-A- und Lose-B-Isoformen gezeigt (Rhiner et al., 2010; Petrova et al., 2012).

Das Expressionslevel der mFwe-Transkripte wurde in Papillomen und dem umliegenden Gewebe, in dem Fitness-defizientere Zellen vorliegen, getestet. Die Expression von mFwe1, aber auch von mFwe2, war im umliegenden Gewebe besonders erhöht, sodass sich der „Flower-Code“ möglicherweise auch auf Säuger übertragen lässt und vor allem mFwe1-Zellen als „Verlierer“ markieren könnte (Petrova et al., 2012).

Zur weiteren Untersuchung wurden mFwe-*Knock-out* Mäuse erzeugt. Im Gegensatz zu nicht überlebensfähigen *D. melanogaster-Knock-out*-Mutanten (Rhiner et al., 2010) zeigen mFwe-defiziente Mäuse keine Auffälligkeiten in Entwicklung, Phänotyp und Wachstum. Nach Induktion der Tumorgenese war die Zahl der Papillome in mFwe-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stark reduziert und die Entstehung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt, da die Proliferation mFwe-defizienter Papillom-Zellen vermindert ist. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede bei der Zellproliferation in der Epidermis von Wildtyp- und *Knockout*-Zellen festgestellt werden und das langsamere Wachstum hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung der Maus (Petrova et al., 2012).

Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Expansion prä-tumoraler Zellen durch gezielte Induktion von mFwe1 im umliegenden Gewebe vorangetrieben wird. Dies wurde bereits in *D. melanogaster* nachgewiesen (Moreno et al., 2002; Moreno, 2008; Merino et al., 2016) und deutet auf eine mögliche funktionale Konservierung von Flower-Proteinen in Säugern hin.

### **3.8.2 Mouse Flower-like und Endozytose in *Mus musculus***

Yao und Kollegen untersuchten neben dFwe auch die Funktion der Ratten-Isoform 2 (ratFwe2), deren Sequenz zu 99 % mit mFwe übereinstimmt und konnten ratFwe2 in synaptischen Vesikeln nachweisen (Yao et al., 2017).

Für mFwe2 konnte die gleiche Funktion wie für dFwe (siehe 3.7.1, Yao et al., 2009, 2017) nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass auch ratFwe2 bzw. mFwe2 die Clathrin-abhängige- und die *Bulk*-Endozytose nicht nur in *D. melanogaster*, sondern auch in kultivierten Neuronen aus der Ratte vorantreiben (Yao et al., 2017). Die Ergebnisse weisen somit auch bei der Endozytose auf eine konservierte Rolle von Flower-Proteinen in Säugern hin.

Des Weiteren wurde die Rolle von mFwe bei der Endozytose zytotoxischer Granula (CG) untersucht (Chang et al., 2018). Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) sind ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems, da sie Zielzellen durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen aus CG abtöten. Die Exozytose der CGs findet ausschließlich an immunologischen Synapsen statt und wird ebenfalls durch Calcium ausgelöst (Lancki et al., 1987; Takayama & Sitkovsky, 1987; Leibson et al., 1990). Ein Antikörper gegen rekombinantes Volllängen mFwe2 wies die Expression in CTLs nach. Aus Experimenten mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern lässt sich schließen, dass mFwe zwei oder vier Transmembrandomänen besitzt und N- und C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert sind (Chang et al., 2018).

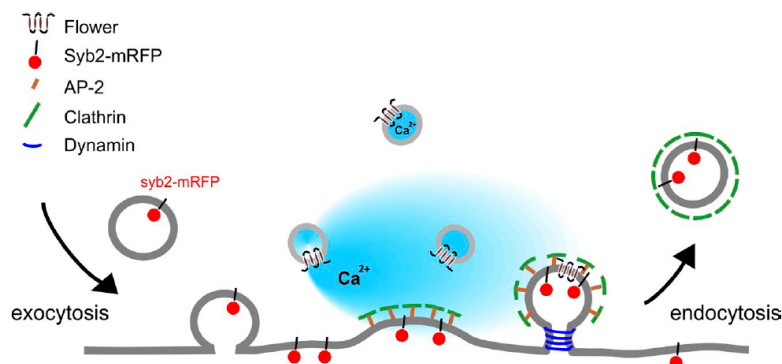
Es konnte eine Hochregulierung der mFwe-Expression nach Stimulierung von CTLs mit vorwiegender Lokalisation in intrazellulären Vesikeln gezeigt werden. Ein kleinerer Anteil konnte in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Chang et al., 2018).

Die Abwesenheit von mFwe hat keinen Einfluss auf die CG-Exozytose sowie die globale Calcium-Signalweiterleitung von CTLs, weshalb untersucht wurde, ob sich die Endozytose zytotoxischer Granula in Abwesenheit von Flower verändert. In mFwe-defizienten Mäusen ist



die CG-Endozytose vollständig blockiert. Das Fehlen von mFwe und die daraus resultierende Blockade der Endozytose reduziert außerdem die Tötungsfähigkeit der CTLs. Eine Blockade der CG-Endozytose bereits in einer frühen Phase noch vor der Membranknospung durch die Abwesenheit von mFwe konnte nachgewiesen werden (Chang et al., 2018).

In Neuronen hängt die Endozytose synaptischer Vesikel von der intrazellulären Calciumkonzentration ab (Gad et al., 1998; Klingauf et al., 1998) und Flower zeigt Sequenzähnlichkeit zu Calcium- und transienten Rezeptorpotential-Kanälen (Yao et al., 2009). Daher wurde spekuliert, dass mFwe an der Calcium-Signalleitung beteiligt sei, welche die Endozytose initiiert. Daraufhin wurde getestet, ob die Bereitstellung von Calcium über andere Quellen die Blockade der CG-Endozytose in mFwe-defizienten CTLs aufheben kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von mFwe für eine effiziente CG-Endozytose erforderlich ist und dass die Blockade der Endozytose, verursacht durch das Fehlen von mFwe, durch die Bereitstellung von Calcium behoben werden kann (Chang et al., 2018). Ein mögliches Szenario wäre, dass mFwe Calcium aus dem Lumen der intrazellulären Vesikel freilässt und so eine Calcium-Mikrodomäne unterhalb der Plasmamembran generiert, die zum Vorantreiben der Endozytose ausreicht. Das entsprechende Modell ist in Abbildung 3.11 dargestellt.



**Abbildung 3.11: Modell zur Funktion von mFwe bei der Endozytose zytotoxischer Granula.** MFwe befindet sich in intrazellulären Vesikeln und fungiert als Calciumkanal. Ein mFwe-gesteuerter Calcium-Ausstrom aus diesen Vesikeln treibt die Endozytose zytotoxischer Granula voran (Chang et al., 2018).

Bei der anschließenden Untersuchung der Lokalisation von mFwe deutet das punktuelle Expressionsmuster von endogenem und überexprimiertem mFwe in CTLs auf eine Lokalisation in intrazellulären Vesikeln hin. Eine Lokalisierung von mFwe in CGs konnte ausgeschlossen werden und mFwe-enthaltende Vesikel erscheinen vor den CGs am synaptischen Spalt (Chang et al., 2018). Diese Vesikel entsprechen nicht denen, die an der Synapse sekretiert werden und enthalten auch keine Marker für frühe, späte und wiederverwertete Endosomen. Dass weder ihre Identität noch ihre Zusammensetzung eindeutig ist, könnte erklären, warum ihre Fusion mit der Synapse nicht detektierbar war und elektrophysiologische Aufnahmen zu keinen Calciumströmen führten (Xue et al., 2012).

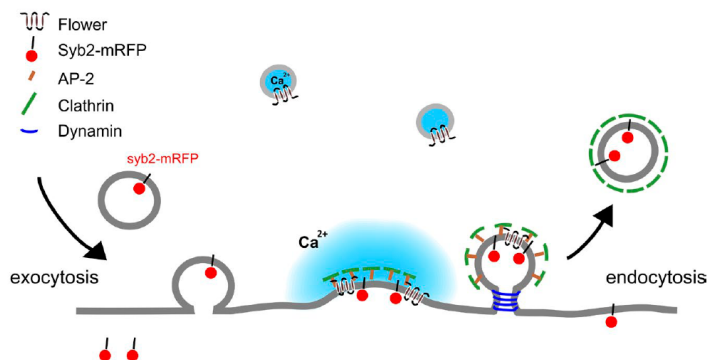
Obwohl keine Fusion mFwe-enthaltender Vesikel bei Bildung der immunologischen Synapse und während der Fusion zytotoxischer Granula beobachtet wurde, ist mFwe eindeutig auch in

der Plasmamembran lokalisiert. Somit besteht die Möglichkeit einer Funktionsausübung während der Integration in die Plasmamembran. Jedoch konnte kein Anstieg der zyttoplasmatischen Calciumkonzentration in CTLs bei Expression von mFwe gemessen werden, weshalb eine Funktion als Calciumkanal in der Plasmamembran als unwahrscheinlich angesehen wird (Chang et al., 2018).

Ein wichtiger Schritt der Endozytose ist die Bindung des Adapterproteins AP-2 an Membranproteine, die endozytiert werden sollen. Zwei putative AP-2 Bindemotive wurden direkt vor der ersten (YRWL) und direkt nach der letzten Transmembrandomäne (YARI) identifiziert (Ortega et al., 2012).

Eine Interaktion *in vivo* konnte nach Affinitätsreinigung mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Keine Interaktion konnte beim Ersatz von Aminosäuren der Bindemotive durch Alanine beobachtet werden. Die Expression dieser mFwe-Mutante resultierte im Gegensatz zur bevorzugten vesikulären Lokalisation von WT mFwe vorwiegend in einer Lokalisation in der Plasmamembran, was auf eine Beteiligung dieser Bindemotive an der Endozytose von mFwe hindeutet. Die Wiedereinführung der mFwe-Mutante in mFwe-defiziente Mäuse hebt den endozytotischen Defekt nicht auf (Chang et al., 2018).

MFwe in der Plasmamembran könnte als Rekrutierungsplattform für AP-2 dienen und dadurch die AP-2- und Clathrin-Konzentration bis zu einem die Endozytose vorantreibenden Niveau erhöhen (Abbildung 3.12).



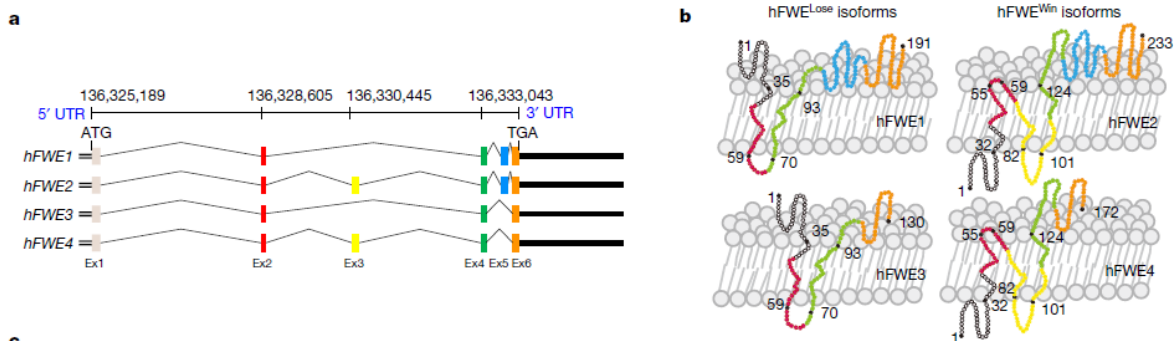
**Abbildung 3.12: Alternatives Modell zur Funktion von mFwe bei der Endozytose zytotoxischer Granula.** MFwe-enhaltende Vesikel fusionieren mit der Plasmamembran an der immunologischen Synapse. MFwe in der Plasmamembran rekrutiert Calcium-abhängig endozytotische Adapterproteine wie AP-2, um die Endozytose zytotoxischer Granula voranzutreiben (Chang et al., 2018).

## 3.9 Das humane Flower-Protein

### 3.9.1 Humanes Flower und Zellkompetition im Menschen

Bislang war unbekannt, ob ähnliche Zellkompetitionsmechanismen wie in *D. melanogaster* oder der Maus auch im Menschen vorliegen.

C9ORF7 (auch bekannt als CACFD1) kodiert für humanes Flower (hFWE) und generiert vier Protein-codierende Varianten (hFWE1-hFWE4), die durch alternatives Spleißen produziert werden. Eine mögliche Anordnung der Membran-durchspannenden Domänen ist in Abbildung 3.13B dargestellt (Madan et al., 2019).



**Abbildung 3.13: Humane Flower-Isoformen.** Die Farbkodierung der Aminosäureketten in b ist komplementär zur Farbkodierung der hFWE-Exons in a (Madan et al., 2019).

Die Überexpression der vier Isoformen in hFWE<sup>KO</sup> Zellen zeigte, dass humane, einzelne hFWE Isoformen homogen exprimierende Zellen keine Apoptose durchlaufen (Madan et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass hFWE1 oder hFWE3 exprimierende Zellen in Apoptose gehen, wenn sie mit Zellen kultiviert werden, die hFWE2 oder hFWE4 exprimieren. Dieser Zelltod war mit einer erhöhten Proliferation von Zellen, die hFWE2 oder hFWE4 exprimierten, verbunden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass hFWE2 und hFWE4 als hFWE<sup>Win</sup> Isoformen fungieren, während es sich bei hFWE1 und hFWE3 um hFWE<sup>Lose</sup> Isoformen handelt. Die Eliminierung der *Lose*-Isoformen erfolgte durch Caspase-abhängige Apoptose und ist abhängig von einem Kontakt mit hFWE<sup>Win</sup>-Isoformen, denn entsprechende Beobachtungen konnten nicht bei dünn besiedelten Platten gemacht werden. Besonders hervorzuheben ist, dass die Expression der individuellen hFWE Isoformen keinen Effekt auf zelluläre Calcium-Level hatte. Somit ist davon auszugehen, dass die humanen Isoformen nicht als Calciumtransporter fungieren und ihre Funktion zudem Calcium-unabhängig ist. Es lässt sich schlussfolgern, dass humane Flower-Proteine als kanonische Fitness-Fingerprints arbeiten (Madan et al., 2019).

Erstmals wurde die Rolle von Flower-Proteinen bei humanem Krebs untersucht, wobei maligne und benigne Brust- und Darmtumore sowie normales Brust- und Darmgewebe verglichen wurden. In normalem Gewebe zeigten alle Isoformen nur eine geringe Expression. In Tumorgewebe konnte jedoch eine erhöhte Expression von hFWE<sup>Win</sup>-Isoformen nachgewiesen werden, während in an das Tumorgewebe angrenzendem stromalem Brust- und Darmgewebe die hFWE<sup>Lose</sup>-Isoformen hochreguliert waren. Hier waren gleichzeitig an der Regulierung der Apoptose beteiligte Gene hochreguliert. Die hFWE<sup>Win</sup>-Isoformen sind in malignem Krebsgewebe stärker hochreguliert als in benignem und hFWE<sup>Lose</sup>-Isoformen liegen ungewöhnlich hoch in Krebs-benachbartem Stroma vor. Hieraus lässt sich schließen, dass Tumorzellen eine hohe hFWE<sup>Win</sup> Expression zeigen und dazu neigen, in Bereichen von Stroma mit hoher hFWE<sup>Lose</sup> Expression zu wachsen (Madan et al., 2019).

Individuelle Isoformen wurden in Brustgewebe von FWE<sup>KO</sup> Mäusen zur Generierung von Tumoren überexprimiert. Die Analyse aller möglichen Kombinationen zeigte, dass hFWE2 und hFWE4 exprimierende Zellen aggressive Tumore bildeten, wenn sie in Brustgewebe

implantiert wurde, das hFWE1 oder hFWE3 exprimiert. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion zwischen der Expression von hFWE<sup>Win</sup> Isoformen in Tumoren und hFWE<sup>Lose</sup> Isoformen im Stroma wichtig für das Tumorstadium sind. Weitere Experimente zeigten eine Kooperation stromaler *Lose*- und tumoraler *Win*-Isoformen, um das aggressive Tumorstadium voranzutreiben (Madan et al., 2019).

Anschließend wurde untersucht, ob die Inhibierung von hFWE Krebs verhindert. Ein *Knockdown* der hFWE-Expression reduzierte das Tumorstadium und die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung. Wachstum und metastatisches Potential konnten durch Einführung von hFWE2 wiederhergestellt werden. Daraufhin wurde das therapeutische Potential eines *Knockdowns* des hFWE-Gens in Kombination mit Chemotherapie untersucht. Ein hFWE-Knockdown reduzierte signifikant das Tumorstadium. Die Behandlung mit einer Kombination aus anti-hFWE shRNS (*short hairpin* RNS, Ribonukleinsäure) und Chemotherapie reduzierte das Tumorstadium weiter und konnte in einigen Fällen die Tumorentstehung vollständig verhindern. Die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung wurde durch den hFWE-Knockdown reduziert, noch stärker in Kombination mit Chemotherapie (Madan et al., 2019).

Somit haben humane hFWE-Proteine ein großes therapeutisches Potential, da mit Hilfe von auf diese Proteine abzielenden Therapien das Krebswachstum und die Metastasierung gehemmt werden könnten. Eine bessere Vorhersage des Effektes einer Chemotherapie auf die Zellkompetition und die Entwicklung therapeutischer Strategien, die Zellkompetitionsmechanismen nutzen, ist wichtig. So könnte das Ergebnis der Krebsbehandlung zugunsten gesunder Zellen und nicht der Repopulation resistenter onkogener Klone verschoben werden (Parker et al., 2021).

### 3.9.2 Humanes Flower und Endozytose im Menschen

Ähnlich wie es für mFwe2 gezeigt wurde (Chang et al., 2018), wird hFWE4 schnell aus der Plasmamembran über einen Mechanismus internalisiert, der auf AP-2 Bindemotiven beruht, die im N- und C-terminalen Bereich des Proteins konserviert sind (Rudd et al., 2023). Somit ist die Rolle der Flower-Isoformen bei der Clathrin-abhängigen Endozytose wahrscheinlich auch im Menschen konserviert. Aufgrund der Lokalisation der Termini im Zytosol legen neu veröffentlichte Daten nahe, dass die Präsentation hFWE-Isoform-spezifischer C-terminaler Enden wahrscheinlich nicht als Mechanismus zur Auslösung der hFWE-vermittelten Zellkompetition dient, sondern einen konservierten Mechanismus der hFWE4-Internalisierung aufzeigt, der die Präsentation noch undefinierter Mediatoren im Rahmen der Zellkompetition regulieren könnte (Rudd et al., 2023). Die häufigsten Isoformen hFWE3 und hFWE4 weisen eine unterschiedliche Lokalisation auf. Während sich hFWE3 vorwiegend in der Membran des endoplasmatischen Retikulums befindet und dort verbleibt, ist hFWE4 in zytoplasmatischen Vesikeln und der Plasmamembran lokalisiert (Rudd et al., 2023), was ebenfalls nicht

kompatibel mit dem von Madan und Kollegen (Madan et al., 2019) beschriebenen Zellkompetitions-Mechanismus ist.

### 3.9.3 hFWE<sup>Lose</sup> als prognostischer Marker bei COVID-19-Patienten

Es ist naheliegend, dass das System der „Fitness-Fingerprints“ nicht nur bei Krebs, sondern auch bei anderen Krankheiten eine Rolle spielen könnte und hFWE<sup>Lose</sup> generell als Marker zur Anzeige eines suboptimalen Zustands einer Zelle dienen könnte. Eine SARS-CoV-2-Infektion von Alveolarepithelzellen kann zu Zelltod und Gewebeschäden führen (Huang et al., 2020). Zellen unter Stress in einem suboptimalen Status könnten ein erhöhtes Risiko für einen Virus-induzierten Zelltod aufweisen. Deshalb wurde vermutet, dass hFWE<sup>Lose</sup> mit einem erhöhten Risiko für einen SARS-CoV-2-induzierten Zelltod assoziiert ist und deshalb als prognostischer Biomarker bei COVID-19-Patienten dienen könnte. So wurde eine erhöhte hFwe<sup>Lose</sup>-Expression in Nasenabstrichen von Patienten, die nach einer Infektion hospitalisiert waren oder verstarben, im Vergleich zu nicht hospitalisierten Patienten nachgewiesen und es konnte gezeigt werden, dass der hFWE<sup>Lose</sup>-Biomarker gefolgt vom Alter den höchsten Einfluss auf den Ausgang der Erkrankung hat. So besteht nun die Möglichkeit, Individuen auf ihr Risiko der Entwicklung eines schweren COVID-19-Verlaufs noch vor der Infektion mit SARS-CoV-2 zu untersuchen. Diese Studie ist der erste Hinweis darauf, dass der Fitnesszustand der Zelle eine Rolle bei der Pathogenese von Infektionskrankheiten spielt und eröffnet die Möglichkeit der Nutzung der hFWE<sup>Lose</sup>-Expression als Biomarker auch bei anderen viralen Pathogenen wie Influenza (Yekelchik et al., 2021).

### 3.10 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl eine Funktion von Flower-Proteinen bei der Endozytose und der Zellkompetition nachgewiesen werden konnte, fehlen bisher strukturelle Informationen, die Aufschluss über den mechanistischen Hintergrund ihrer verschiedenen Funktionen geben könnten. Eine hochaufgelöste Struktur ist daher von entscheidender Bedeutung. Das erste Ziel meiner Dissertation bestand darin, die von Dr. Michael Lafontaine in der Abteilung etablierte Reinigungsmethode (Lafontaine, 2017) zu optimieren, um eine Grundlage für die strukturelle und funktionelle Analyse von mouse Flower-like (mFl) zu schaffen. Zusätzlich sollten verschiedene Rekonstitutionsmethoden getestet werden, um einen nativeren Zustand des heterolog in *E. coli* exprimierten Proteins zu erreichen. Eine erste strukturelle Charakterisierung sollte durch biochemische Methoden erfolgen, wobei eine Größenausschluss-Chromatographie in Kombination mit einem Multidetektorsystem sowie native Gelelektrophoresen Informationen über den Oligomerezustand von mFl liefern sollten. Durch Röntgen-Kleinwinkelstreuungs-Experimente sollte ein Oberflächenmodell erstellt werden, um erste strukturelle Parameter zu erhalten. Die Funktionalität des gereinigten Proteins sollte durch elektrophysiologische Messungen gezeigt und Calcium-Ströme

## Einleitung

analysiert werden. Die Interaktion mit Calmodulin, einem potenziellen Interaktionspartner von mFI, sollte untersucht werden, wobei Calmodulin auch bei der Kristallisation von mFI helfen sollte. Um beugende Kristalle zu erhalten, sollten verschiedene Kristallisationsmethoden getestet werden, einschließlich der Herstellung neuer mFI-Varianten und der Kristallisation mit Hilfe von Kristallisationschaperonen. Gleichzeitig sollte die Struktur mittels Kryo-Elektronenmikroskopie bestimmt werden. Der Einsatz spezifischer Nanobodies sollte bei beiden Methoden die Lösung der Struktur erleichtern.

## Kapitel 4 Material

### 4.1 Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit *Escherichia coli* (*E. coli*) gearbeitet. Die verwendeten Stämme sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1: Verwendete *E. coli* Stämme sowie ihre Verwendung und Herkunft.**

Stamm	Genotyp	Herkunft
XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i>	Stratagene
BL21(DE3)	<i>F- ompT lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal dcm (DE3)</i>	Novagen (Darmstadt)
BL21 Star(DE3) x pRARE	<i>F-ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) me131 (DE3) pRARE</i>	AG Schlenstedt, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes (UdS), Campus Homburg: BL21 Star(DE3) transformiert mit pRARE-Plasmid (Novy et al., 2011; Lopez et al., 1999)
Rosetta2(DE3)	<i>F- ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) (DE3) pRARE2</i>	Novagen (Darmstadt)
WK6	<i>F- lacIq delta(lacZ)M15 proA+B+ delta(lac-proB) galE rpsL</i>	AG Rettig, Zelluläre Neurophysiologie, Zentrum für integrative Physiologie und Molekularmedizin (CIPMM), UdS

### 4.2 Oligonukleotide

In Tabelle 4.2 sind die zur Klonierung der mFI-Varianten verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Die T7-Primer dienten zur Sequenzierung und Überprüfung des korrekten Einbaus des Inserts.

**Tabelle 4.2: Verwendete Oligonukleotide sowie ihre Sequenz und Verwendung.**

Primer	Sequenz
T7_for	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7_term_rev	5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG T-3'
mFIY104A_for	5'-GCA GAA GGC TGT CTT CGC CTG CGG GAT GGC-3'
mFIY104A_rev	5'-GCC ATC CCG CAG GC AAG ACA GCC TTC TGC-3'
mFINtrunc_for	5'-CGA TAT TAT TGA GGC TCA CAG AGA ACA GAT TGG TGG TTG GTA CCG CTG GCT GTG CCG C-3'
mFINtrunc_rev	5'-GCG GCA CAG CCA GCG GTA CCA ACC ACC AAT CTG TTC TCT GTG AGC CTC AAT AAT ATC G-3'
mFICtrunc_for	5'-GGA CTG TCT GCC CTG GGC AAA GGT CGC TGG TCT CAT CCG CAG TTT GAA AAA TAA GG-3'
mFICtrunc_rev	5'-CCT TAT TTT TCA AAC TGC GGA TGA GAC CAG CGA CCT TTG CCC AGG GCA GAC AGT C-3'
mFI_G812L_for	5'-CTC GGG CGC CGC CCT GGC GGC CGC GCT GCC AGC CCC GG-3'
mFI_G812L_rev	5'-GGC GGG GCT GGC AGC GCG GCC GCC AGG GCG GCG CCC G-3'

### 4.3 Plasmide zur Expression in *E. coli*

Tabelle 4.3 zeigt die zur Proteinproduktion in *E. coli* verwendeten Plasmide.

**Tabelle 4.3: Verwendete Plasmide zur Proteinproduktion in *E. coli*.**

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pCA528_6xHis-SUMO-mFI-StrepII	beruht auf einem pCA528_6xHis-SUMO-Vektor, T7-Promotor, Kanamycin-Resistenzgen, N-terminales 6xHis-SUMO-Anhängsel, mFwe2-cDNS, über $\Omega$ -PCR angefügtes C-terminales StrepII-Anhängsel	mFwe2-cDNS (AG Flockerzi, Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UdS; Frohnweiler, 2013) in pCA528-Vektor kloniert, StrepII-Anhängsel von Dr. Michael Lafontaine (Lafontaine, 2017)
pCA528_6xHis-SUMO-mFI-Stop	enthält über $\Omega$ -PCR eingefügtes Stopcodon, kodiert für mFI(1-141)	(Lafontaine, 2017)
pCA528_6xHis-SUMO-mFI(G812L)-StrepII	pCA528_6xHis-SUMO-mFI-StrepII-Vektor, über ortsgerichtete Mutagenese eingefügte Mutationen G8L und G12L	diese Arbeit
pCA528_6xHis-SUMO-mFI(Y104A)-StrepII	pCA528_6xHis-SUMO-mFI-StrepII-Vektor, über ortsgerichtete Mutagenese eingefügte Mutation Y104A	diese Arbeit
pCA528_6xHis-SUMO- $\Delta$ NmFI-StrepII	pCA528_6xHis-SUMO-mFI-StrepII-Vektor, Aminosäuren 1-24 von mFI mittels $\Omega$ -PCR deletiert	diese Arbeit
pCA528_6xHis-SUMO-mFI $\Delta$ C-StrepII	pCA528_6xHis-SUMO-mFI-StrepII-Vektor, Aminosäuren 142-171 von mFI mittels $\Omega$ -PCR deletiert	diese Arbeit
pCA528_6xHis-SUMO- $\Delta$ NmFI $\Delta$ C-StrepII	pCA528_6xHis-SUMO-mFI-StrepII-Vektor, Aminosäuren 1-24 und 142-171 von mFI mittels $\Omega$ -PCR deletiert	diese Arbeit
pET28a_Calmodulin	pET28a-Derivat, Kanamycin-Resistenzgen, Calmodulin-cDNA	(Urbansky, 2017)
pGEX4T3_GST-Thrombin-Calmodulin	beruht auf pGEX-KG-Vektor, tac-Promotor, Ampicillin-Resistenzgen, N-terminales GST-Anhängsel gefolgt von Thrombin-Schnittstelle	AG Flockerzi, Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UdS: Calmodulin-cDNA (aus <i>Rattus norvegicus</i> ) in pGEX4T3-Vektor kloniert (Niemeyer et al., 2001)
p6His-Ulp1	Mutation Ulp1(403-621), basiert auf pET28b	AG Flockerzi, Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät der UdS

### 4.4 Ausgewählte Proteinsequenzen

#### (6xHis-SUMO-)mFI-StrepII (285/181 AS)

(HHHHHHGSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKR QGKEMDSLRLFLYDGIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG)MSGSGAAGAAAGPAPPA QEEGMTWWYRWLCRLAGVLGAVSCAISGLFNCVTIHLPLNIAAGVWMIMNAFILLCEAPFCC QFVEFANTVAEKVDRLRSWQKAVFYCGMAIVPIVMSLTTLTLLGNAIAFATGVLYGLSALGKK GDAISYARIQQRQQADEEKLAETFEGELGRWSHPQFEK

#### Calmodulin (148 AS)

MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGN GTIDFPEFLTMMARKMKDSTDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVD EMIREADIDGDGQVNYEEFVQMTAK



## Nanobody NB14 (131 AS)

QVQLQESGGGLVQTDGSLRLSCAASGHSFSTYGMGWFRQAPGKQRDFVAVITYPGLITRY  
ADSVKGRWTISRDNNAKNAVYLMNGLKPDPTAVYYCALLGQGPNGMENFREITYWGQGT  
QVTVSS

### 4.5 Chemikalien und Detergenzien

Die verwendeten Chemikalien sowie ihre Hersteller oder Bezugsquelle sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

**Tabelle 4.4: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller oder Bezugsquelle.**

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid/Bisacrylamid: Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
Agar: Bacto Agar	BD (Heidelberg)
Agarose: SeaKem LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
di-Ammoniumhydrogenphosphat	AppliChem (Darmstadt)
Ammonium-Dihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Amphipol A8-35	Anatrace (Maumee, USA)
Ampicillin Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Antifoam 204	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bariumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BCIP: 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	AppliChem (Darmstadt)
Benzamidin Hydrochlorid Hydrat	AppliChem (Darmstadt)
Biobeads SM-2 20-50 mesh	Bio-Rad (München)
BODIPY FL L-Cysteine	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
BSA	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Cholesterylhemisuccinate	Sigma-Aldrich (Steinheim)
$\alpha$ -Chymotrypsin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Cobalt(II)-Chlorid	Acros Organics (Geel, Belgien)
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth (Karlsruhe)
Desthiobiotin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DIBMA 10 Tris (PureCube)	Cube Biotech (Monheim)
DIBMA 12 Tris (PureCube)	Cube Biotech (Monheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Fluka (Buchs, Schweiz)
Disuccinimidyl suberate (DSS)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
DNA-Marker Smart ladder	Eurogentec (Köln)
dNTP-Mix (100 mM)	Bioline (Luckenwalde)
L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dpn I FD	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
E. coli Extract Polar, 25 mg/mL in Chloroform	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Essigsäure ( <i>Acetic acid glacial</i> )	ZChL (zentrales Chemikalienlager, UdS)
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol vergällt 1 % MEK	ZChL
Ethidiumbromid (0,5 %, w/v)	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glucose Monohydrat, D(+)	Roth (Karlsruhe)
Glutathion, L, oxidiert	Roth (Karlsruhe)

## Material

Glutathione Agarose Resin (PureCube)	Cube Biotech (Monheim)
Glycin	VWR (Darmstadt)
Guanidinhydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	ZChL
HABA, 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Harnstoff (Urea)	Grüssing (Filsum)
Hefeextrakt: Bacto Yeast Extract	BD (Heidelberg)
1,2,3-Heptanetriol	Fluka (Buchs, Schweiz)
HEPES Di-Natriumsalz	VWR (Darmstadt)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Iodacetamid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	ZChL
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	ZChL
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe)
Lanthan(III)-chlorid Heptahydrat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid Hexahydrat	ZChL
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Grüssing (Filsum)
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Milchzucker	dm (Karlsruhe)
NativePAGE 20x cathode buffer additive	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
NativePAGE 20x running buffer	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
NativePAGE 4-16 % 10-well Fertiggele	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
NativePAGE 4-16 % 15-well Fertiggele	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
NativePAGE 4x sample buffer	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
NativePAGE 5 % G-250 sample additive	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Natrium-Acetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natronlauge 10 N	ZChL
Nitro Blau Tetrazolium (NBT)	AppliChem (Darmstadt)
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat	VWR (Darmstadt)
Nickel(II)sulfat Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
N-Methyl-D-Glucamin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Perfluorooctanoic acid 95% (PFOA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PI(4,5)P <sub>2</sub> (L- $\alpha$ -phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate from porcine brain)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Polyethylenglykol, MW400-4000	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PMAL-C8	Anatrace (Maumee, USA)
Ponceau S-Lösung	AppliChem (Darmstadt)
Protein Marker AppliChem VI	AppliChem (Darmstadt)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
Salzsäure 37 %	ZChL
SDS-Pellets	Roth (Karlsruhe)
Silver Stain Developer	Bio-Rad (München)
Silver Stain Oxidizer Concentrate	Bio-Rad (München)
Silver Stain Reagent Concentrate	Bio-Rad (München)
Smartblock	Candor (Wangen)
Sokalan CP9, 25% in wässriger Lösung (DIBMA)	BASF (Ludwigshafen)
Soy Extract Polar, 25 mg/mL in Chloroform	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Strep-Tactin Superflow Resin	Iba (Göttingen)
Sucrose, D(+)	ZChL
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)

TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid	AppliChem (Darmstadt)
TRIS PUFFERAN $\geq 99,3\%$ (Buffer Grade)	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Merck Millipore (Darmstadt)
Yeast Extract	Merck Millipore (Darmstadt)
Ytterbium(III)-chlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Zinkchlorid	Grüssing (Filsum)

Die verwendeten Detergenzien, ihre kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC) und ihre Hersteller sind Tabelle 4.5 zu entnehmen.

**Tabelle 4.5: Verwendete Detergenzien, ihre kritische Mizellenbildungskonzentrationen (CMC) und ihre Hersteller.**

Detergenz	CMC [mM] (% w/v)	Mizelle	Hersteller
n-Decyl- $\beta$ -Maltosid (DM)	1,66 mM (0,08 %)	40 kDa	Avanti (Alabaster, USA)
n-Decyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid (DDM)	1,8 mM (0,087 %)	70 kDa	Glycon (Luckenwalde)
Fos-Cholin-12 (Fos12)	1,5 mM (0,047 %)	19 kDa	Glycon (Luckenwalde)
Lauryl-dimethylamin-N-oxid (LDAO)	1-2 mM (0,023 %)	17 kDa	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG)	0,01 mM (0,001 %)	93 kDa	Anatrace (Maumee, USA)
Triton X-100	0,22-0,24 mM (0,01-0,016 %)	80 kDa	Sigma-Aldrich (Steinheim)

#### 4.6 Standards, Enzyme, Proteasen und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Kits und Standards sowie deren Hersteller finden sich in Tabelle 4.6.

**Tabelle 4.6: Verwendete Enzyme, Kits und Standards sowie ihre Hersteller.**

Enzym	Hersteller
DNase I	AppliChem (Darmstadt)
DpnI FD	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
HiFi DNA Polymerase	VWR (Darmstadt)
Polymerase ALLin Mega HiFi	highQu (Kraichtal)
Polymerase S7 Fusion High-Fidelity (MD-S7-100)	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Polymerase Mytaq Red	Bioline (Luckenwalde)
<b>Kits</b>	
E. coli NightSeq	SeqLab (Göttingen)
Pierce BCA Protein Assay	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
MyTAQ RED DNA-Polymerase Kit	Bioline (Luckenwalde)
HiFi Kit	highQu (Kraichtal)
QuickChange	Agilent Technologies (Waldbronn)
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab (Erlangen)
<b>Standards</b>	
NativeMark unstained	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Smart Ladder MW1700-10, 200-10000 bp	Eurogentec (Köln)
Protein Marker VI (10-245 kDa), prestained	AppliChem (Darmstadt)

## 4.7 Antikörper

**Tabelle 4.7: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper zur immunologischen Detektion mittels Western-Blot.**

Antikörper		Hersteller
Anti-His	Anti-poly-Histidin monoclonal, AP-Konjugat, <i>mouse</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-StrepII	Anti-Strep tag II (StrepMAB classic), AP-Konjugat, <i>mouse</i>	Iba (Göttingen)
Anti- <i>mouse</i>	Anti- <i>mouse</i> IgG, AP-Konjugat ( <i>goat</i> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti- <i>rabbit</i>	Anti- <i>rabbit</i> IgG, AP-Konjugat ( <i>goat</i> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
anti-mFl-Antikörper	Antikörper gegen N-, C- sowie N- und C-Terminus von mFl, <i>rabbit</i>	AG Rettig

## 4.8 Säulenmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Matrices und Chromatographiesäulen sind in Tabelle 4.8 aufgeführt. Die Reinigungen wurden im Eintopf-Verfahren (*Batch*-Verfahren) und lediglich die abschließenden Größenausschlusschromatographien wurden an einem HPLC/FPLC-System (Äkta Purifier, Äkta Pure, microÄkta und Äkta Start, GE Healthcare) durchgeführt.

**Tabelle 4.8: Verwendete Säulenmaterialien, die Methode und ihre Hersteller.**

Material	Methode	Hersteller
Ni <sup>2+</sup> -NTA Agarose-Matrix	Immobilisierte Metallkationen Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	GE Healthcare (München)
HisTrap FF Säule 5 mL	IMAC	GE Healthcare (München)
Strep-Tactin-Matrix	StrepII-Tactin Affinitäts-Chromatographie	Iba (Göttingen)
Phenylsepharose	hydrophobe Interaktions-Chromatographie	Cube Biotech (Monheim)
GSH-Matrix	GST-Reinigung	Cube Biotech (Monheim)
Superdex 75 10/300 GL-Säule	Analytische Größenausschluss-Chromatographie	GE Healthcare (München)
Superdex 75 16/600 pg-Säule	Präparative Größenausschluss-Chromatographie	GE Healthcare (München)
Superdex 200 16/600 pg-Säule	Präparative Größenausschluss-Chromatographie	GE Healthcare (München)
Superdex 200 26/60 pg-Säule	Präparative Größenausschluss-Chromatographie	GE Healthcare (München)
Superdex 200 Increase 10/300 pg-Säule	Analytische Größenausschluss-Chromatographie	GE Healthcare (München)
Superdex 200 Increase 5/150 pg-Säule	Analytische Größenausschluss-Chromatographie	GE Healthcare (München)
Superose 6 Increase 10/300 pg-Säule	Analytische Größenausschluss-Chromatographie	GE Healthcare (München)
Superose 6 Increase 5/150 GL-Säule	Analytische Größenausschluss-Chromatographie	GE Healthcare (München)
PD10 Mini- oder MidiTrap-Säule	Umpufferung	GE Healthcare (München)

## 4.9 Nährmedien

### 4.9.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* XL-1 Blue-Zellen erfolgte in LB (*lysogenic broth*)-Medium. Für die Proteinproduktion wurde bei der IPTG-basierten Induktion ebenfalls LB-Medium verwendet, für die Autoinduktion ZYM für die Vorkultur und ZYM5052 für die Hauptkultur (Studier, 2005). Die Produktion der Nanobodies erfolgte in TB (*terrific broth*)-Medium (Sambrook 1989). Zur

Herstellung von LB-Agar wurden 15 g Agar zu einem Liter LB-Medium gegeben. Die Selektion der Bakterien erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika (Tabelle 5.1) zum Medium oder durch Bestreichen der LB-Agar-Platten mit diesen. Die Zusammensetzung der einzelnen Medien ist Tabelle 4.9 zu entnehmen, die entsprechenden Stocklösungen Tabelle 4.10.

**Tabelle 4.9: Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*.**

Medium	LB	ZYM	ZYM5052	TB
Induktionsart	IPTG-basiert	Autoinduktion	Autoinduktion	IPTG-basiert
Pepton	10 g/L	10 g/L	10 g	12 g/L
Hefeextrakt	5 g/L	5 g/L	5 g	24 g/L
NaCl	10 g/L	-	-	-
Glycerin (100%, w/v)	-	4 mL/L	-	4 mL/L
Autoklavieren				
KP <sub>i</sub> -Puffer (10x)	-	-	-	100 mL
50x M	-	20 mL/L	20 mL/L	-
50x 5052	-	-	20 mL/L	-
1000x Spurenelemente	-	0,2 mL/L	0,2 mL/L	-
MgSO <sub>4</sub> [1 M]	-	2 mL	2 mL/L	-

## 4.10 Puffer und Lösungen

### 4.10.1 Lösungen für molekularbiologische Methoden

In den folgenden Tabellen ist die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt. Diese wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und der jeweilige pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt.

**Tabelle 4.10: Stocklösungen für Medien.**

50x M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,25 M
	NH <sub>4</sub> Cl	2,5 M
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 M
	H <sub>2</sub> O	ad 1 L
50x 5052	Glycerol	25 % w/v
	Glucose	2,5 % w/v
	Lactose	10 % w/v
	H <sub>2</sub> O	ad 1 L
10x KP <sub>i</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	23 g/L
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	125 g/L

**Tabelle 4.11: Lösungen für Agarose-Gele.**

50x TAE-Puffer	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	50 mM
	pH	8,0
6x DNS-Ladepuffer	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	1% (w/v)
	EDTA	125 mM
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
	Xylencyanol	0,05% (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)

## Material

In Tabelle 4.12 sind die Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gele aufgeführt. Die Zusammensetzung der Lösungen für die Silber-Färbung ist dem Bio-Rad *Silver Stain* Protokoll zu entnehmen.

**Tabelle 4.12: Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gele.**

10x Laufpuffer	Tris pH 8,3 Glycin SDS	250 mM 2 M 1% (w/v)
4x SDS-Probenpuffer	Tris pH 6,8 Glycerin SDS Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	250 mM 40% (v/v) 8% (w/v) 0,04 % (w/v) 4% (w/v)
Trenngelpuffer	Tris SDS pH	1,5 M 0,4% (w/v) 8,8
Sammelgelpuffer	Tris SDS pH	1 M 0,4% (w/v) 6,8
Coomassie-Blau-Lösung	Brilliant Blue G250 Ethanol Essigsäure	0,1% (w/v) 40% (w/v) 10% (v/v)
Entfärbelösung	Essigsäure	10% (w/v)
12 %-iges Trenngel	H <sub>2</sub> O Acrylamid (30 %) Trenngelpuffer APS (10 %) TEMED	1,7 mL 2 mL 1,7 mL 50 µL 2 µL
16 %-iges Trenngel	H <sub>2</sub> O Acrylamid (30 %) Trenngelpuffer APS (10 %) TEMED	0,95 mL 2,7 mL 1,3 mL 50 µL 2 µL
5 %-iges Sammelgel	H <sub>2</sub> O Acrylamid (30 %) Trenngelpuffer APS (10 %) TEMED	690 µL 170 µL 130 µL 10 µL 1 µL

In Tabelle 4.13 sind die für einen Western-Blot verwendeten Puffer angegeben.

**Tabelle 4.13: Pufferlösungen für den Western-Blot.**

10x Transferpuffer-Stocklösung	Tris-Base Glycin	250 mM 1,92 M
1x Transferpuffer	10x Transferpuffer H <sub>2</sub> O Methanol	100 mL 700 mL 200 mL
10 x TBS	Tris pH 7,4 NaCl	500 mM 1,5 M
Block-Lösung	1x TBS Magermilchpulver	5 %
Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer	Tris pH 9,5 NaCl MgCl <sub>2</sub>	100 mM 100 mM 5 mM
Färbelösung	AP-Puffer NBT (50 mg/mL) BCIP (20 mg/mL)	10 mL 50 µL 50 µL

#### 4.10.2 Puffer zur Proteinreinigung

Alle Puffer wurden steril filtriert und gegebenenfalls zusätzlich entgast.

**Tabelle 4.14: Puffer zur Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StreptII, mFI-StreptII und Varianten.**

Zellyse	BBMC	Tris pH 8,0 Glycerol CaCl <sub>2</sub>	20 mM 10% 20 mM
Solubilisierung	Solubilisierungs-Puffer	Tris pH 8,0 KCl Imidazol CaCl <sub>2</sub> TCEP	50 mM 20 mM (150 mM) 20 mM 20 mM 1 mM
IMAC	IMAC-WP	Tris pH 8,0 KCl Imidazol CaCl <sub>2</sub> LDAO TCEP	50 mM 20 mM (150 mM) 20 mM 20 mM 0,1 % (w/v) 1 mM
	IMAC-EP / EP2	Tris pH 8,0 KCl Imidazol CaCl <sub>2</sub> LDAO / Fos12 TCEP	50 mM 20 mM (150 mM) 300 mM 20 mM 0,05 % / 0,1 % 1 mM
SUMO-Verdau	SUMO-VP	Tris pH 8,0 KCl CaCl <sub>2</sub> LDAO DTT	50 mM 150 mM 20 mM 0,05 % (w/v) 2 mM
StreptII-Affinitäts-Chromatographie	StreptII-WP	Tris pH 8,0 KCl Imidazol CaCl <sub>2</sub> Fos12 TCEP	50 mM 150 mM 20 mM 20 mM 0,1 % (w/v) 1 mM
	StreptII-EP	Tris pH 8,0 KCl Imidazol CaCl <sub>2</sub> Fos12 TCEP Desthiobiotin	50 mM 150 mM 20 mM 20 mM 0,1 % (w/v) 1 mM 2,5 mM
Gelfiltration	GF-P1	Tris pH8 KCl CaCl <sub>2</sub> Fos12 TCEP	50 mM 75 mM (150 mM) 20 mM 0,1 % (w/v) 1 mM
	GF-P2	NaAcetat pH 4,5 KCl CaCl <sub>2</sub> Fos12 TCEP	25 mM 75 mM (150 mM) 20 mM 0,1 % (w/v) 1 mM

**Tabelle 4.15: Puffer zur Reinigung der SUMO-Protease.**

	Zellyse	IMAC		GF
	Ulp1-LP	Ulp1-WP	Ulp1-EP	Ulp1-VP
Tris pH 8,0	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	200 mM	300 mM	300 mM	300 mM
Imidazol	10 mM	20 mM	250 mM	
Reduktionsmittel	5 mM $\beta$ -ME	5 mM $\beta$ -ME	5 mM $\beta$ -ME	2 mM DTT

**Tabelle 4.16: Puffer zur Reinigung von Calmodulin.**

Lysepuffer	C-LP	Tris-HCl EDTA PMSF	50 mM 2 mM 0,2 mM
Äquilibrierungspuffer	C-ÄP	Tris-HCl NaCl CaCl <sub>2</sub>	50 mM 0,1 M 5 mM
Waschpuffer 1	C-WP1	Tris-HCl NaCl CaCl <sub>2</sub>	50 mM 0,1 M 0,1 mM
Waschpuffer 2	C-WP2	Tris-HCl NaCl CaCl <sub>2</sub>	50 mM 0,5 M 0,1 mM
Elutionspuffer	C-EP	Tris-HCl EGTA	50 mM 1 mM
Gelfiltrationspuffer	C-GF1	Tris, pH 7 NaCl CaCl <sub>2</sub>	20 mM 75 mM 10 mM
	C-GF2	Tris, pH 7 NaCl EGTA	20 mM 75 mM 1 mM
	C-GF3	HEPES KCl	20 mM 75 mM

**Tabelle 4.17: Puffer zur Reinigung der Nanobodies.**

Periplasma-Extraktion	TES	Tris, pH 7 EDTA Sucrose	50 mM 0,53 mM 20 % (w/v)
Osmotischer Schock	OS	Tris pH 7 MgSO <sub>4</sub> PMSF	10 mM 5 mM 1 mM
Waschpuffer	NB-WP	Tris pH 7 NaCl Imidazol	50 mM 150 mM 20 mM
Elutionspuffer	NB-EP	Tris pH 7 NaCl Imidazol	50 mM 150 mM 250 mM
Gelfiltrationspuffer	NB-GF	Tris pH 7 NaCl	50 mM 150 mM



#### 4.11 Kristallisationsscreens

Die in Tabelle 4.18 aufgeführten *Sparse-Matrix*-Screens dienen zur Kristallisation.

**Tabelle 4.18: Verwendete Sparse-Matrix-Kristallisationsscreens und ihre Hersteller.**

Screen	Hersteller
Hampton Research cryo Screen	HamptonResearch (Aliso Viejo, USA)
Hampton Research Crystal Screen 1+2	HamptonResearch (Aliso Viejo, USA)
Hampton Research lite Screen	HamptonResearch (Aliso Viejo, USA)
Hampton Research MembFac	HamptonResearch (Aliso Viejo, USA)
Hampton ResearchPEG/ION Screen 1+2	HamptonResearch (Aliso Viejo, USA)
JBScreen Classic 2	JenaBioscience (Jena)
JBScreen Cryo 1-4	JenaBioscience (Jena)
JBScreen Detergent 1+2	JenaBioscience (Jena)
JBScreen Membrane 1-3	JenaBioscience (Jena)
JBScreen Plus Additives	JenaBioscience (Jena)
JBScreen Plus chaotropics	JenaBioscience (Jena)
JBScreen Plus kosmotropic	JenaBioscience (Jena)
JBScreen Plus salts	JenaBioscience (Jena)
JBScreen Wizard1+2	JenaBioscience (Jena)
JBS-Floppy-Choppy	JenaBioscience (Jena)
JCSG-plus	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
Mb Class II Suite Nextal Qiagen	Qiagen (Hilden)
Mb Class Suite Nextal Qiagen	Qiagen (Hilden)
MemTrans HT96	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
MemChannel HT96	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
Memgold I HT96	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
Memgold II HT96	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
Memstart+Memsys HT96	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
Morpheus 1-3 HT96	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
Nextal Tubes JCSG Core Suite I Qiagen	Qiagen (Hilden)
Nextal Tubes JCSG Core Suite II Qiagen	Qiagen (Hilden)
ProPlex	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)

#### 4.12 Geräte

**Tabelle 4.19: Verwendete Geräte und ihre Hersteller.**

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer MINI-SUB CELL-GT	BioRad (München)
Analysewaage CPA225D	Sartorius (Göttingen)
Laborwaage Extend	Sartorius (Göttingen)
Anzuchtschüttler Minitron und Unitron	Infors-HT (Bottmingen, CHE)
Blot-Apparatur Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad (München)
Brutschrank (37 °C)	Binder (Tuttlingen)
Chromatographiesystem Äkta Purifier FPLC, Äkta Pure, microÄkta und Äkta Start FPLC	GE Healthcare (München)
Dampfsterilisator DX 200	Systec (Wettenberg)
Dampfsterilisator SANO clav	Wolf (Bad Überkingen)
Detektor Brechungsindex VE 3580 RI	Malvern Instruments (Malvern, UK)
Detektor Rechtwinkelstreuung Viscotek 270 Dual Detector	Malvern Instruments (Malvern, UK)
Dewar Isotherm	KGW (Karlsruhe)
Eismaschine	Manitowoc (Herborn)
Gefrierschrank (-20 °C, -80 °C)	Liebherr (Ochsenhausen)
Hochdruckhomogenisator Emulsi-Flex	Avestin (Ottawa, CAN)
Homogenisator T 25 digital ULTRA-TURRAX	IKA (Staufen)
Inkubator Vinothek (18 °C)	Liebherr (Ochsenhausen)

## Material

Inkubator Minstrel HT	Rigaku (Sevenoaks, GB)
Kristallisationsroboter Phoenix	Art Robbins (Sunnyvale, USA)
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge 5430G	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer (mit Heizplatte) MSH20A	IDL (Nidderau)
Magnetrührer (mit Heizplatte) Variomag mobil	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Mikroskop SZX9 und CX31	Olympus (Hamburg)
Mikrowelle	Severin (Sundern)
Mikrovolumenküvette im Nanoliter-Bereich TrayCell	Hellma (Müllheim)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific (Bonn)
Orbital-Shaker (Blots und Gele) DOS10I, DOS-20S	NeoLab (Heidelberg)
pH-Messgerät Seven Easy	Mettler Toledo (Gießen)
Photometer Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare (München)
Pipetten PIPETMAN Neo (2, 20 und 200 µL)	NeoLab (Heidelberg)
Pipetten PIPETMAN Neo PCR Kit (10, 100 und 1000 µL)	Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Rotoren 45Ti, JA25.50, JLA8.1000	Beckman Coulter (Krefeld)
SDS-Gelelektrophoreseapparatur Xcell SureLock	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS-Gelelektrophoreseapparatur Mini Protean3	BioRad (München)
Spannungsgeber PowerPac BASIC	BioRad (München)
Sterilbank MSC-Advantage	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler MyCycler	BioRad (München)
Tischzentrifuge Mini Spin Plus	Eppendorf (Hamburg)
TEM JEM-2100F	Jeol (Akishima, Japan)
TEM JEM-Z200FSC CRYO ARM™ 200	Jeol (Akishima, Japan)
Trockenschrank (60 °C)	Binder (Tuttlingen)
Überkopf-Rotator Intelli-Mixer	Neo-Lab (Heidelberg)
Ultrazentrifuge Optima LE-80K und 45 Ti-Rotor	Beckman Coulter (Krefeld)
UV-Tisch	Bender (Wiesloch)
Vitrobot IV	Thermo Scientific (Waltham, USA=
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Wasserbad K20	Thermo Scientific (Bonn)
Wasseranlage Ultra Pure, Milli-Q Integral 15	Millipore (Schwalbach)
Wasseranlage ELGA Purelab	ELGA LabWater (Celle)
Zell-Densitometer WPA C08000	Biochrom (Cambridge, UK)
Zentrifuge Avanti J-26XP	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge Eppendorf 5424	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Microfuge 18	Beckman Coulter (Krefeld)

### 4.13 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.20: Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller.

Material	Hersteller
Aluminiumfolie	Roth (Karlsruhe)
Bechergläser, diverse Größen	VWR (Darmstadt)
Deckgläser (22 mm)	Roth (Karlsruhe)
Einmal-UV-Küvette	Sarstedt (Nümbrecht)
Einmal-Pasteurpipetten 5 mL	VWR (Darmstadt)
Erlenmeyer Kolben, diverse Größen	VWR (Darmstadt)
Falcon-Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-one (Nürtingen)
Glasflaschen, diverse Größen	VWR (Darmstadt)
Glaspipetten 5-25 mL	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Hand-Homogenisator (Potter)	Satorius (Göttingen)
Immobilon-Transfer Membran (PVDF)	Millipore (Schwalbach)
Konzentrator Amicon Ultra (0,5 mL, MWCO 3, 10, 30, 50, 100 kDa)	Millipore (Schwalbach)

Konzentrator Centriprep (15 mL, MWCO 3, 10, 30, 50, 100 kDa)	Millipore (Schwalbach)
Kristallisationsplatte MRC 96-well-Platte	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
Kristallisationsplatte MRC Maxi 48-well-Platte	JenaBioscience (Jena)
Kristallisationsplatte Linbro 24-well-Platte	Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Küvette (DNA) TrayCell	Hellma Analytics (Mühlheim)
Loop (0,1-5 mL)	GE Healthcare (München)
Nylonschleifen, verschiedene Größen	Molecular Dimensions (Sheffield, UK)
Parafilm	Pechiney (Menasha, USA)
Pasteurpipetten (Kunststoff)	Sarstedt (Nümbrecht)
PCR-Reaktionsgefäße (200 µL)	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Petrischalen (Kunststoff)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten (Kunststoff), steril (5, 10, 25 mL)	NeoLab (Heidelberg)
Protran Nitrozellulose-Membran 0,2 µM	BioRad (München)
Reaktionsgefäße (1,5-2 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Röhrchen (Kunststoff), steril (13 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Schikane-Kolben, diverse Größen	VWR (Darmstadt)
Spitzen 10-1000 µL	Gilson (Villiers-le-Bel, FRA)
Spritzen 1-50 mL	Braun (Melsungen)
Spritzenfilter Filtropur 0,2 µM	Sarstedt (Nümbrecht)
Standzylinder, diverse Größen	Vitlab (Seeheim-Jungenheim)
Sterilfilter (0,1, 0,2, 0,45 µM)	Sarstedt (Nümbrecht)
Ultrazentrifugenbecher (75 mL)	Beckman Coulter (Krefeld)
Whatman-Papier (Mini Trans-Blot Filterpapier)	BioRad (München)
Zentrifugenbecher (1 L)	Beckman Coulter (Krefeld)

#### 4.14 Computer-Programme

Tabelle 4.21: Verwendete Computer-Programme.

Datenbank	Referenz/ Hersteller/ Website
AlphaFold	<a href="https://alphafold.ebi.ac.uk/">https://alphafold.ebi.ac.uk/</a> (Jumper et al., 2021)
RCSB PDB	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>
Uniprot	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>
Server/ Programme	
ClustalW	(Thompson et al., 1994)
Clustal Omega	(Madeira et al., 2022)
ExPASy	<a href="http://web.expasy.org">http://web.expasy.org</a>
DAS	(Cserzo et al., 1997)
FoXS	(Schneidman-Duhovny et al., 2013, 2016)
HMMTOP	(Tusnady & Simon, 1998)
JNET	(Cuff & Barton, 2000)
Jury-of-Experts	(Ginalski et al., 2003)
MemBrain	(Yin et al., 2018)
MEMSAT	(Jones et al., 1994; Jones, 2007)
OCTOPUS	(Viklund & Elofsson, 2008)
Philius	(Reynolds et al., 2008)
Phobius	(Kall et al., 2007)
Poly-Phobius	(Kall et al., 2005)
Porter5	(Torrissi et al., 2019)
PPM 2.0	(Lomize et al., 2012)
PPM 3.0	(Lomize et al., 2021)
PredictProtein	(Rost et al., 2004)
PredTMR	(Pasquier et al., 1999)
PROCHECK	(Laskowski et al., 1993)
Prot-pi	<a href="https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool">https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool</a>
Proteus2	(Montgomerie et al., 2008)
Protter	(Omasits et al., 2014)
PsiPred	(Mcguffin et al., 2000)

## Material

RaptorX	(Källberg et al., 2012)
SCAMPI	(Bernsel et al., 2008)
SPOCTOPUS	(Viklund et al., 2008)
TMHMM	(Krogh et al., 2001)
TMPred	(Hofmann and Stoffel, 1993)
TOPCONS	(Tsirigos et al., 2015)
Transsec	(Montgomerie et al., 2006)
XtalPred	(Slabinski et al., 2007)
<b>Programme</b>	
ATSAS 2.8, 3.1	EMBL, Hamburg
Adobe Reader	Adobe (SanJosé, USA)
CCP4	STFC Rutherford Appleton Laboratory (Oxon, UK)
Chimera	(Pettersen et al., 2004)
ChimeraX	(Pettersen et al., 2021; Goddard et al., 2018)
Clone Manager 9	Sci-Ed Software (Cary, USA)
cryoSPARC™ 3.3.1	Structura Biotechnology Inc.
ISPyB	<a href="https://esrf.fr/ispyb">https://esrf.fr/ispyb</a>
Kappa Camera Control	Kappa Optronics (Gleichen)
Mendeley Reference Manager	<a href="https://www.mendeley.com">https://www.mendeley.com</a>
Microsoft Office 2021	Microsoft (Redmond, USA)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific (Bonn)
OmniSEC 4.6	Malvern Instruments, Herrenberg
Origin Pro	Originlab (Northhampton, USA)
PyMOL	DeLano Scientific LLC (San Carlos, USA)
RELION 3.1	MRC Laboratory of Molecular Biology
Unicorn Workstation 5.11	GE-Healthcare (München)
WinCOOT	(Emsley & Cowtan, 2004)

### 4.15 Beamlines

Tabelle 4.22: Verwendete Beamlines.

Methode	Beamline	Synchrotron	Referenz
Röntgen-Kleinwinkel-Streuung	BM29 Petralll	ESRF DESY	(Pernot et al., 2010)
Röntgenkristallographie	X06SA (PX) X06DA (PXIII) ID23-1 ID23-2 ID29 ID30A3 ID30B	SLS SLS ESRF ESRF ESRF ESRF ESRF	(Nurizzo et al., 2006) (Flot et al., 2010) (De Sanctis et al., 2012) (Von Stetten et al., 2020) (McCarthy et al., 2018)

Den Zugang zu den Beamlines des ESRF ermöglichten die Frankfurt/Saarland BAG (*Block Allocation Group*) (MX1836, MX1944, MX2070) und die Saarland BAG (MX2287, MX2359).

## Kapitel 5 Methoden

### 5.1 Computergestützte Methoden

#### 5.1.1 Sequenzvergleich

Proteinsequenzvergleiche wurden mit Hilfe des Programms Clustal Omega (Madeira et al., 2022) durchgeführt, welches die Methode der progressiven Alinierung (*alignment*) anwendet. Dabei werden Sequenzen aufgrund ihrer Ähnlichkeit schrittweise in einen hierarchischen Baum, den sogenannten Leitbaum (*guide tree*), gruppiert (Boyce et al., 2014). Eine Mehrfachalinierung (*multiple sequence alignment*) erfolgt durch eine Serie von paarweisen Alinierungen, wobei der Verzweigungsreihenfolge im erstellten Leitbaum gefolgt wird (Thompson et al., 1994). Zudem werden Informationen aus den statistischen *Hidden Markov Model* (HMM)-Profilen der Sequenzen zur Optimierung der Alinierung verwendet. Jedes HMM-Profil repräsentiert dabei eine Gruppe von Ähnlichkeiten aufweisenden Sequenzen (Sievers & Higgins, 2014). Diese Methode ermöglicht eine effiziente Analyse von Sequenzähnlichkeiten.

#### 5.1.2 Vorhersage von Transmembranhelices

Die Vorhersage von Transmembranhelices wurde unter Verwendung verschiedener Algorithmen und Methoden mit Hilfe von Servern durchgeführt. Eine gängige Methode ist die Verwendung eines Hydrophobizitätsprofils nach Kyte & Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). Die Methode basiert auf experimentell bestimmten Hydropathie-Indizes, wobei aus einem entlang der Proteinsequenz bewegten Fenster ein Hydropathie-Plot erstellt wird.

Ein weiterer häufig verwendeter Algorithmus ist der auf HMMs basierende HMMTOP (*Hidden Markov Model for Topology Prediction*) (Tusndy & Simon, 2001), der statistische Modelle zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit von Transmembranhelices in einer Proteinsequenz nutzt. Server wie TOPPred (von Heijne, 1992) berücksichtigen zusätzlich das Vorkommen positiv geladener Aminosäurereste, sodass gleichzeitig die Topologie vorhergesagt werden kann.

Bei den häufig verwendeten Kombinationsmethoden werden die Ergebnisse verschiedener Vorhersagealgorithmen kombiniert, was zur strukturellen Charakterisierung von Membranproteinen beiträgt. Die verwendeten Server sind in Tabelle 4.21 aufgeführt.

#### 5.1.3 Sekundär- und Tertirstrukturvorhersage

Die Vorhersage der Sekundär- und Tertiärstruktur wurde mit Hilfe verschiedener Algorithmen und Methoden unter Verwendung von Servern durchgeführt.

Die meisten Algorithmen wie beispielsweise PSIPRED (Jones, 1999), RaptorX (Kallberg et al., 2012) oder AlphaFold (Jumper et al., 2021) basieren auf neuronalen Netzwerken und analysieren Aminosäuresequenzen zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit von Alpha-Helices, Beta-Faltblattern und Schleifen an verschiedenen Sequenzpositionen. AlphaFold greift im Vergleich zu traditionellen Methoden zur Sekundärstrukturvorhersage auf umfassendere Informationen wie Sequenzdaten, evolutionäre Analysen und experimentelle Daten zurück

und soll in der Lage sein, Strukturen mit einer Genauigkeit vorherzusagen, die in den meisten Fällen mit experimentellen Strukturen konkurrieren (Jumper et al., 2021).

Die zur Vorhersage von Sekundär- und Tertiärstrukturen verwendeten Server sind in Tabelle 4.21 aufgeführt.

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Die Kultivierung aller *E. coli*-Stämme erfolgte in autoklaviertem Medium bei 37 °C und 200 rpm. Zur Vereinzelung wurden Klone auf LB-Agarplatten bei 37 °C für etwa 16 Stunden inkubiert. Zur Selektion von Plasmid-enthaltenden Stämmen wurde dem LB-Medium Antibiotikum in der in Tabelle 5.1 angegebenen Endkonzentration zugegeben.

**Tabelle 5.1: Verwendete Antibiotika, die Konzentrationen der angesetzten Stocklösungen sowie die Konzentrationen im LB-Medium.**

Antibiotikum	Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL in Aqua dest.	100 µL/mL
Chloramphenicol	34 mg/mL in Isopropanol	34 µL/mL
Kanamycin	30 mg/mL in Aqua dest.	30 µL/mL

### 5.2.2 Bestimmung der optischen Dichte

Die Zelldichte wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch mit sterilem Medium als Referenz bestimmt.

### 5.2.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung DMSO-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Inoue-Methode (Inoue et al., 1990). Anschließend wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 5.2.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock (Inoue et al., 1990). Dazu wurden 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen 10 min auf Eis angetaut und nach Zugabe von 10-50 ng der jeweiligen Plasmid-DNS oder alternativ 7 µL PCR-Produkt 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C nach dem die Zellen 2 min lang auf Eis abkühlten. Zum Aufbau der Antibiotikaresistenzen wurden die Zellen nach Zugabe von 800 µL LB-Medium 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 3000 x g wurde der Überstand dekantiert und die Zellen im Rücklauf resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden auf zuvor mit entsprechenden Antibiotika beschichteten Platten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht erfolgte die Überführung einzelner Klone in 2-4 mL Flüssigmedium.

### 5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*) dient der *in vitro* Amplifikation von DNS mit Hilfe einer thermostabilen DNS-Polymerase (Mullis et al., 1986;

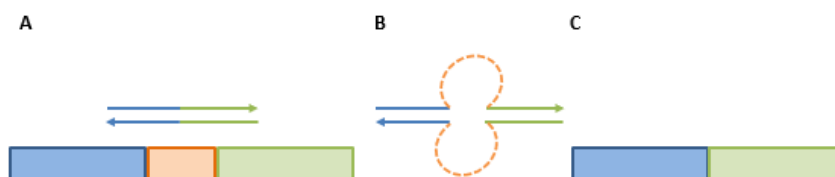
Saiki et al., 1988). Zwei zu der zu amplifizierenden DNS komplementäre, flankierende Nukleotid-Primer (*Forward* und *Reverse*) vervielfältigen dabei das gewünschte DNS-Segment. Nach der Denaturierung der DNS durch Erhitzen wird die Temperatur gesenkt, woraufhin die Primer hybridisieren (*Annealing* Schritt). Die erforderliche Temperatur hängt von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer ab (Benita, 2003). Ein Elongationsschritt verlängert die angelagerten Primer durch die thermostabile Polymerase und synthetisiert den komplementären DNS-Strang dadurch neu.

#### 5.2.5.1 Zielgerichtete Mutagenese

Einfache Mutationen lassen sich durch eine zielgerichtete Mutagenese einfügen, indem die Mutation enthaltende Primer erstellt werden. Zur Generierung der Varianten mFI(Y014A)-StreptII und mFI(G812L)-StreptII wurde das *Agilent Quickchange Mutagenesis Kit 1* nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach erfolgreicher, mittels Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung überprüfter Mutation, erfolgte der Abbau methylierter DNS-Vorlage (*Template*) mit 0,5 µL *DpnI* für zwei Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden 7 µL eines Ansatzes zur Transformation von *E. coli* XL-1-Zellen eingesetzt.

#### 5.2.5.2 Omega-PCR

Die Omega-PCR gilt als schnelle Methode zur Klonierung (Chen et al., 2013), die ohne Verwendung von Restriktionsendonukleasen und modifizierenden Enzymen auskommt. Verkürzte mFI-Konstrukte wurden mit Hilfe der Deletions-Omega-PCR hergestellt, die in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt ist. Chimäre Primer sollen sich an komplementäre Stellen des Zielkonstruktes anlagern, wodurch sich eine Omega-förmige Struktur bildet, die im neu entstehenden PCR-Produkt entfernt wird.



**Abbildung 5.1: Prinzip der Deletions-Omega-PCR.** Der Deletionsschritt wird durch die Verwendung chimärer Primer in einer PCR durchgeführt. Die chimären Primer (blau-grün) lagern sich an das *Template* an (A), woraufhin das deletierte Fragment eine Ω-förmige Struktur ausbildet (B) und die gewünschten Fragmente miteinander verbunden werden (C).

Zur Generierung der verkürzten mFI-Konstrukte wurde das in Tabelle 5.3 gezeigte Protokoll mit der HiFi Polymerase (highQu) unter Verwendung des in Tabelle 5.2 angegebenen Pipettierschemas verwendet. Nach erfolgreicher mittels Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung überprüfter Deletion erfolgte der Abbau methylierter *Template*-DNS mit 0,5 µL *DpnI* für zwei Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden 7 µL eines Ansatzes zur Transformation von *E. coli* XL-1-Zellen eingesetzt.

**Tabelle 5.2: Pipettierschema für die Omega-PCR-Reaktionen in einem 50 µL Ansatz.**

Komponente	Volumen
HiFi-Puffer (Mastermix)	25 µL
Forward Primer (10 pmol/µL)	2 µL
Reverse Primer (10 pmol/µL)	2 µL
DNS-Vorlage (10 ng/µL)	4,5 µL
HiFi Polymerase (2 U/µL)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O	16 µL

**Tabelle 5.3: Verwendetes PCR-Protokoll für die Omega-PCR.**

Schritt	T [°C]	t [s]	Zyklen
Denaturierung	95	60	1
Denaturierung	95	15	30
Anlagerung	75-85	15	
Elongation	72	200	
Elongation	72	600	1
Lagerung	8	∞	

### 5.2.5.3 Kolonie-PCR

Mit Hilfe einer Kolonie-PCR (engl. *colony*-PCR) lässt sich das Vorhandensein einer Insertion oder Deletion überprüfen, wobei anstatt der gereinigten DNS *E. coli*-Kolonien bei der PCR als Vorlage dienen können (Güssow & Clackson, 1989). *E. coli* XL1-Zellen wurden mit einem PCR-Produkt transformiert und anschließend 3 mL LB-Medium mit einzelnen gewachsenen Klonen angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 220 rpm wurden 50-200 µL Zellen für 30 s bei 20000 g zentrifugiert und das Pellet in 20 µL HF-Puffer resuspendiert. Mehrfaches Erhitzen auf 95 °C mit anschließendem Abkühlen auf Eis und Vortexen lysierte die Zellen. Hiervon wurden 2 µL als PCR-Vorlage verwendet. Das Pipettierschema für die *Colony*-PCR ist in Tabelle 5.4 aufgeführt.

**Tabelle 5.4: Pipettierschema zur Kolonie-PCR in einem 20 µL Ansatz.**

Komponente	Volumen
5x MyTaq Red Puffer	4 µL
Template	2 µL
Primer T7 for (10 pmol/µL)	0,8 µL
Primer T7 term (10 pmol/µL)	0,8 µL
MyTaq Red Polymerase (5 U/µL)	0,4 µL
H <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Durch Verwendung der MyTaq Red Polymerase können die PCR-Produkte wegen der roten Farbe ohne vorherige Zugabe von Probenpuffer auf das Gel aufgetragen werden. Die Kolonie-PCR wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt (Tabelle 5.5).



**Tabelle 5.5: Protokoll für die Colony-PCR.**

Schritt	T [°C]	t [s]	Zyklen
Denaturierung	95	60	1
Denaturierung	95	15	30
Anlagerung	57	15	
Elongation	72	10	
Elongation	72	300	1
Lagerung	8	∞	

### 5.2.6 Plasmid-Isolierung

Unter Verwendung des Plasmid Miniprep Kit von Peqlab wurde nach den Angaben im Benutzerhandbuch des Herstellers verfahren. Die optionalen Waschschrte wurden durchgeführt und die Elution erfolgte mit 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ .

### 5.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNS-Fragmenten (McDonnell et al., 1977; Southern, 1979; Voytas, 2000). Diese wandern aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphatrückgrates durch ein angelegtes elektrisches Feld Richtung Anode, wobei die Größe des Fragments die Laufgeschwindigkeit bestimmt (Voytas, 2001). Es wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. 6-8  $\mu\text{L}$  von mit 6x Ladepuffer versetzten Proben wurden auf ein mit 1x TAE-Puffer überschichtetes Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der „Smart Ladder“ (Eurogentec). Die Elektrophorese wurde in einer „Mini-Sub Cell GT“-Kammer (BioRad) bei einer Spannung von 100 V durchgeführt und nach etwa einer Stunde gestoppt.

Die Färbung der Gele erfolgte für 10-15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (Verhältnis Ethidiumbromid zu Wasser 1:4000 v/v). Ethidiumbromid interkaliert mit der doppelsträngigen DNS, wodurch sich seine Fluoreszenz um den Faktor 50 bis 100 erhöht (Le Pecq & Paoletti, 1966).

### 5.2.8 Bestimmung der DNS-Konzentration

Zur Bestimmung der DNS-Konzentration wurden 3  $\mu\text{L}$  Probe in einer TrayCell-Küvette photometrisch gemessen und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Der zur Bestimmung der Probenreinheit dienende Quotient  $A_{260}/A_{280}$  sollte bei 1,8 liegen (Handhabungshinweise TrayCell, Hellma Analytics).

### 5.2.9 DNS-Sequenzierung

Zum Ausschluss einer ungewünschten Mutation wurde die Plasmid-DNS von der Firma Microsynth (Göttingen) nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) sequenziert. Zur Herstellung eines Sequenzieransatzes wurden 30 pmol Sequenzierprimer und 800-1200 ng DNS mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 15  $\mu\text{L}$  ergänzt.

Alternativ stand die *Ecoli NightSeq* Sequenzierung zur Verfügung, für die anstelle von Plasmid-DNS eine Kolonie oder 5  $\mu\text{L}$  Flüssigkultur verwendet werden können.

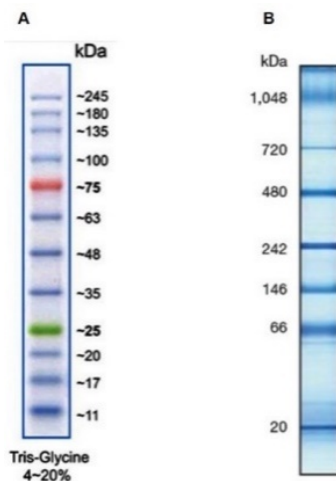
### 5.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung von Größe und Reinheit der Proteine wurde unter denaturierenden Bedingungen eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt (Shapiro et al., 1967). Die verwendeten Gele bestanden aus einem Sammel- und einem Trenngel, die sich in pH-Wert und Polyacrylamidkonzentration unterschieden. Die Proteine werden vor der Auftrennung im Trenngel zunächst an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel konzentriert (Laemmli, 1970; Gallagher, 2006).

Das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (engl. *Sodiumdodecylsulfate*, SDS) bindet an hydrophobe Bereiche im Protein und führt so zur Entfaltung. Das ebenfalls im Probenpuffer vorkommende  $\beta$ -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken. Wegen der starken negativen Ladung von SDS wird die Eigenladung des Proteins durch die angelagerten Detergenzmoleküle maskiert. Durch das so entstandene konstante Masse- zu Ladungsverhältnis können die Proteine nach ihrer molaren Masse in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden (Smith, 1994; Alberts et al., 2011).

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 4x Probenpuffer versetzt und zytosolische Proteine zusätzlich für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 40 mA pro Gel in einer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllten Kammer durchgeführt. Als Standard für das Molekulargewicht diente der Protein-Marker VI (Abbildung 5.2A).



**Abbildung 5.2: Proteinmarker.** **A** Größenstandard Protein Marker VI ([www.applichem.com](http://www.applichem.com)). **B** NativeMark ungefärbter Proteinstandard ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

#### 5.3.2 Native PAGE

Eine native, nicht-denaturierende Elektrophorese wurde mit dem NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System von Thermofisher nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard für das Molekulargewicht diente der ungefärbte Proteinstandard NativeMark (Abbildung 5.2B). Das System basiert auf der *Blue Native* PAGE, bei der Coomassie G-250 den Proteinen eine negative Ladung verleiht und die Wanderung der Proteine in Richtung Kathode bei neutralem pH-Wert ermöglicht (Schägger & von Jagow, 1991).

### 5.3.3 Coomassie-Blau-Färbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Coomassie-Blau-Lösung gegeben und für etwa 15 min unter Schütteln zur Sichtbarmachung der Proteinbanden gefärbt. Der Farbstoff interagiert über hydrophobe Wechselwirkungen und Bindung an basische Aminosäuren und ermöglicht den Nachweis von Proteinmengen ab 100 ng pro Bande (Magdeldin et al., 2014; Georgiou et al., 2008).

Die Entfärbung erfolgte mit 10 %-iger Essigsäure, wobei die Gele zur Beschleunigung des Prozesses in der Mikrowelle aufgekocht wurden (Kurien & Scofield, 2012).

### 5.3.4 Silber-Färbung

Die besonders sensitive Silberfärbung diente zum Nachweis geringerer Proteinmengen (Switzer et al., 1979; Heukeshoven & Dernick, 1985; Magdeldin et al., 2014). Mit dieser Methode ist allerdings weder eine qualitative noch eine quantitative Charakterisierung wegen Problemen in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Hintergrundfärbung möglich (Poehling & Neuhoﬀ, 1981). Die Silberfärbung erfolgte nach dem *Modified Silver Stain Protocol* von Bio-Rad (Merril et al., 1981).

### 5.3.5 Western-Blot-Analyse

Bei einem Western-Blot werden zuvor in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und dort mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979). Ein primärer in der Maus oder im Kaninchen produzierter Antikörper bindet spezifisch an das zu untersuchende Protein. Ein in der Ziege hergestellter sekundärer Antikörper erkennt die konstante Region des primären Antikörpers. Die Kopplung an Alkalische Phosphatase (AP) ermöglicht einen kolorimetrischen Nachweis (Towbin et al., 1979).

#### 5.3.5.1 Wet-Blot

Nach einer SDS-PAGE wurde das Gel für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurde eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran genutzt, die vor Verwendung mit Methanol aktiviert und anschließend ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert wurde. Der Blot wurde bei 4 °C bei 100 V für 2,5 h im Kühlraum durchgeführt.

#### 5.3.5.2 Immundetektion

Nach erfolgreichem Transfer wurde die PVDF-Membran für 30-60 min mit 5 %-iger Milchpulverlösung in TBS blockiert, worauf die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C unter Schütteln erfolgte. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für jeweils 5 min zum Entfernen von ungebundenem Antikörper erfolgte die Inkubation mit dem AP-gekoppelten sekundären Antikörper für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend drei Mal für jeweils 10 min in TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte durch NBT/BCIP, wofür 50 µL NBT (50 mg/mL) und 50 µL BCIP (50 mg/mL) zu 10 mL AP-Puffer

gegeben wurden. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion durch Waschen mit destilliertem Wasser abgestoppt.

### 5.2.5.3 Dot-Blot

Ein Dot-Blot wurde entweder zum Nachweis des Proteins oder zur Überprüfung des Expressionsniveaus durchgeführt (Zeder-Lutz et al., 2006). Hierzu wurden 2 µL Lysat, Solubilisat oder gereinigtes Protein auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen, die anschließend für 30 min getrocknet wurde. Nach 30-minütiger Inkubation in Block-Lösung folgte eine einstündige Inkubation mit einem primären Antikörper. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für jeweils 5 min wurde die Membran für eine Stunde mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS für die Dauer von jeweils 10 min entfernt, woraufhin die Detektion mit NBT/BCIP in AP-Puffer erfolgte.

## 5.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 5.3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Nanodrop

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Absorption der Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm an einem Spektrophotometer (NanoDrop 2000) bestimmt (Gill & von Hippel, 1989; Desjardins et al., 2010). Dabei muss der molare Extinktionskoeffizient berücksichtigt werden, der vom Anteil der genannten Aminosäuren abhängt und sich mit Hilfe des Programms ProtParam (ExPASy, Gasteiger et al., 2003) berechnen lässt. Die mit diesem Programm ermittelten Parameter der verwendeten Proteine sind in Tabelle 5.6 dargestellt.

**Tabelle 5.6: Mittels ProtParam berechnete Parameter verschiedener Proteine.**

Protein	Amino-säuren	MW [kDa]	Isoelektrischer Punkt	A280 (1 g/L)
6xHis-SUMO-mFI-StrepII	287	31,8	5,82	1,273
mFI-StrepII	181	19,6	6,11	1,988
mFI(G812L)-StrepII	181	19,7	6,11	1,977
mFI(Y104A)-StrepII	181	19,5	6,11	1,921
mFIdC-StrepII	160	17,8	7,55	2,185
SUMO-dNmFIdC-StrepII	231	26,0	6,58	1,288
6xHis-SUMO-mFI-Stop	247	26,8	5,98	1,235
6xHis-Ulp1p	227	26,5	6,79	1,129
Calmodulin	149	16,8	4,09	0,177
NB14	131	14,5	8,63	1,963

Für eine Messung wurden 3 µL Protein mit dem jeweiligen Puffer als Referenz eingesetzt.

### 5.3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Die BCA-Methode beruht auf der Bicinchoninsäure-Reaktion (Smith et al., 1985). Die Durchführung erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific nach den Angaben des Herstellers. Nach dem Messen der Absorption bei 562 nm wurde die Proteinkonzentration über eine aus BSA-Standardverdünnungen erstellte Eichgerade berechnet.

### 5.3.7 Methanol-Chloroform-Extraktion

Um ein Verschmieren von Banden im Polyacrylamidgel bei Vorliegen von Polymeren (DIBMA oder PMAL-C8) zu vermeiden, wurden die entsprechenden Proben mit CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O in einem Mischverhältnis von 4:1:3 (v/v/v) präzipitiert (Wessel & Flügge, 1984). Hierzu wurde zu einer eiskalten Probe nacheinander das vierfache Volumen eiskalten Methanols, ein einfaches Volumen Chloroform und ein dreifaches Volumen eiskalten Wassers gegeben, wobei nach jeder Zugabe gevortext wurde. Die Mischung wurde für 5 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme der wässrigen Schicht wurde ein vierfaches Volumen Methanol hinzugegeben und die Probe gevortext. Zur Pelletierung von präzipitiertem Protein wurde für 1 min bei 5000 x g und weitere 5 min bei 20000 x g bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Trocknung des Pellets folgte die Lösung in SDS- oder nativem Probenpuffer (Danielczak et al, 2019).

## 5.4 Proteinproduktion in *E. coli*

### 5.4.1 Proteinproduktion im analytischen Maßstab

Um optimale Proteinproduktionsbedingungen zu finden, wurde eine Testexpression durchgeführt. Die Expression der Flower-Varianten mittels Autoinduktion wurde unter den bekannten Expressionsbedingungen von 6xHis-SUMO-mFl-StrepII im kleinen Maßstab von 20 bis 50 mL mittels Probenentnahme nach 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden getestet.

Die Testexpression der Nanobodies mittels IPTG-basierter Induktion erfolgte im kleinen Maßstab nach Bedingungen von Pardon (Pardon et al., 2014). Die Probenentnahme erfolgte nach einer, drei, fünf und 16 Stunden bei Temperaturen von 28 °C und 37 °C.

Die entnommenen Proben wurden mit 1xPBS auf eine OD von 2 normiert und mit Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Erhitzen auf 95 °C für 10 min und anschließendes Einfrieren lysiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 20000 x g wurden 10 µL des Überstandes zur Überprüfung der Überexpression in einer SDS-PAGE und einem Dot- oder Western-Blot analysiert.

### 5.4.2 Proteinproduktion im präparativen Maßstab

Die Großexpression erfolgte in 5 L Erlenmeyer-Schikanekolben in 1 oder 1,5 L des entsprechenden Flüssigmediums. Nanobodies wurden in Kolben ohne Schikane exprimiert. Das Medium wurde mit entsprechenden Antibiotika (vgl. Tabelle 5.1) und 3 Tropfen anti-*Foam* zur Vermeidung von Schaumbildung versetzt. Die Expression von pCA528\_6xHis-SUMO-mFl-StrepII wurde von Dr. Michael Lafontaine etabliert (Lafontaine, 2017). Die einzelnen Expressionsbedingungen sind Tabelle 5.7 zu entnehmen.

**Tabelle 5.7: Expressionsbedingungen für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli*.** NB steht stellvertretend für alle produzierten Nanobodies.

Konstrukt	Stamm	Volumen	Induktion	Induktions- bedingung	
pCA528_6xHis-SUMO-mFI-StrepII	BL21Star(DE3) x pRARE	18-27 L	Autoinduktion	68-92 h	22 °C
pCA528_6xHis-SUMO- $\Delta$ NmFI $\Delta$ C-StrepII	BL21 Star (DE3) x pRARE	9-18 L	Autoinduktion	68-92 h	22 °C
pCA528_6xHis-SUMO-mFI $\Delta$ C-StrepII	BL21 Star (DE3) x pRARE	9-18 L	Autoinduktion	68-92 h	22 °C
pCA528_6xHis-SUMO- $\Delta$ NmFI-StrepII	BL21 Star (DE3) x pRARE	9-18 L	Autoinduktion	68-92 h	22 °C
pCA528_6xHis-SUMO-mFI(Y104A)-StrepII	BL21 Star (DE3) x pRARE	9-18 L	Autoinduktion	68-92 h	22 °C
pCA528_6xHis-SUMO-mFI(G812L)-StrepII	BL21 Star (DE3) x pRARE	9-18 L	Autoinduktion	68-92 h	22 °C
pCA528_6xHis-SUMO-mFI-Stop	BL21 Star (DE3) x pRARE	9 L	Autoinduktion	72 h	22 °C
pET28a_Calmodulin	BL21(DE3)	6-9 L	1 mM IPTG	4 h	30 °C
pGEX4T3-GST-Calmodulin	BL21(DE3)	9 L	0,4 mM IPTG	4 h	30 °C
pET_6xHis-Ulp1p	Rosetta2(DE3)	9 L	0,5 mM IPTG	4 h	20 °C
pMES_NB	WK6	1-6 L	1 mM IPTG	16 h	28 °C

#### 5.4.2.1 IPTG-basierte Induktion

Die Expression aller exprimierten Proteine steht unter Kontrolle eines T7 RNA-Polymerase Promotors, der wiederum durch das *lac* Operon kontrolliert wird und durch Zugabe des Lactose-Analogons IPTG angeschaltet werden kann (Studier & Moffatt, 1986; Li et al., 2011). 50  $\mu$ L chemisch kompetente Zellen wurden, wie unter 5.1.4 beschrieben, mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden einzelne Klone nach Überführung in 2-4 mL Flüssigmedium über Tag bei 200 rpm und 37 °C inkubiert (Vorkultur 0). 50-100 mL Flüssigmedium wurden dann im Verhältnis 1:1000 mit der Vorkultur 0 angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 200 rpm und 37 °C inkubiert (Vorkultur I). Die Hauptkultur (1-1,5 L) wurde dann mit 30-100 mL der Vorkultur I angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 bei 130 rpm und 37 °C inkubiert. Nach Absenkung auf die gewünschte Expressionstemperatur erfolgte die Induktion der Proteinproduktion durch Zugabe von 0,4-1 mM IPTG. Zur Expression der Nanobodies wurden dem TB-Medium 0,1 % (w/v) Glucose und 1 mM MgCl<sub>2</sub> zugefügt.

#### 5.4.2.2 Autoinduktion

Die verschiedenen mFI-Konstrukte wurden nach Studier mit Hilfe der Autoinduktion exprimiert (Studier, 2005). Hierbei erfolgte die Anzucht der Vorkulturen in ZYM-Medium, die der Hauptkulturen in ZYM5052-Medium.

Das Medium enthält Glucose, Glycerol und Lactose, welche in der aufgeführten Reihenfolge von *E. coli* als Kohlenstoffquelle bevorzugt verstoffwechselt werden (Blommel et al., 2007). Zusätzlich enthalten sind Salze zur Pufferung des pH-Wertes. Während Glucose zunächst

eine Basalinduktion verhindert, wird nach deren Verbrauch die Expression durch Lactose induziert (Inada et al., 1996).

Ein Klon wurde von einer Agarplatte in 2-4 mL LB-Medium überführt und für 16 Stunden kultiviert (Vorkultur 0). Für die Vorkultur I wurden 100 mL ZYM-Medium mit der Vorkultur 0 angeimpft (1:1000 bis 1:100 v/v) und für 8-16 Stunden kultiviert. 1,5 L ZYM5052-Medium wurden für die Hauptkultur mit 10-20 mL der Vorkultur I beimpft. Nach acht Stunden erfolgte eine Temperatursenkung auf 22 °C, woraufhin die Zellen vor der Ernte für 68-92 Stunden kultiviert wurden.

#### **5.4.3 Zellernte**

Die Zellernte erfolgte nach der gewünschten Expressionsdauer durch 15-minütige Zentrifugation in 1 L Bechern bei 5000 x g und 8 °C. Die pelletierten Zellen wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

### **5.5 Zellyse und Solubilisierung**

#### **5.5.1 Zellyse**

Ein gefrorenes Zellpellet wurde in 200 mL Lysepuffer aufgetaut und mittels Ultraturrax homogenisiert. Zur Verhinderung des Abbaus des Proteins und zum Abbau genomischer DNS wurden die Zellen mit 1 mM Benzamidin, 1 mM e-Aminocaprinsäure, 10 µL DNase/ 100 mL Lysepuffer und 1 mM PMSF versetzt. In einem Homogenisator wurde die Zellsuspension zur weiteren Homogenisierung dreimal auf- und abgezogen, bevor die Lyse im Hochdruckhomogenisator erfolgte. Nach der Spülung des Gerätes mit destilliertem Wasser und Lysepuffer lief das Zellhomogenisat dreimal bei 1100-1500 bar durch das Gerät. Die lysierten Zellen wurden anschließend bei 100000 x g bei 4 °C für eine Stunde in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Bei Membranproteinen wurde der Überstand nach Ziehen einer Probe verworfen und das Membranpellet in einem vorher austarierten Becherglas gewogen. Bei zytosolischen Proteinen befand sich das Protein im Überstand, so dass das Pellet verworfen wurde.

#### **5.5.2 Solubilisierung**

Membranproteine werden mit Hilfe von Detergenzien solubilisiert und isoliert, indem diese die hydrophobe Umgebung einer Lipiddoppelschicht wiederherstellen (Garavito et al., 2001). Die Solubilisierung erfolgt durch Zugabe eines großen Überschusses an Detergenz zur resuspendierten Membran (Michel, 1983).

Das Membranpellet wurde mittels Ultraturrax in Solubilisierungspuffer resuspendiert, wobei die Membrankonzentration etwa 100 mg/mL betragen sollte. Die Solubilisierung erfolgte durch 1 % LDAO (Lauryldimethylamin-N-oxid) für eine Stunde bei 4 °C unter Rühren. Zur Verringerung der Detergenzkonzentration wurde das Solubilisat auf eine LDAO-Konzentration

von 0,3-0,5 % verdünnt. Anschließend wurde das solubilisierete Material bei 100000 x g und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert.

### 5.6 Rekonstitution

#### 5.6.1 Rekonstitution von mFI in PMAL-C8

Amphipole sind amphipathische Polymere mit abwechselnd polaren und nicht-polaren Seitenketten, die sich um die Transmembrandomäne von integralen Membranproteinen wickeln (Nagy et al., 2001). Das verwendete zwitterionische PMAL-C8 (Poly-(maleinsäureanhydrid-*alt*-1-decen)-3-Dimethylamino-1-propylamin-Derivat) hat ein Molekulargewicht von etwa 18,5 kDa.

Um mFI-StrepII in PMAL-C8 zu rekonstituieren, wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt. Nach Zugabe der dreifachen Menge Amphipol in Gramm folgte eine vierstündige Inkubation im Rotator bei 4 °C. Danach wurden 50 mg Biobeads pro 2 mL Lösung zum Entfernen von Detergenz aus der Lösung hinzugegeben und im Rotator bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach erneuter Zugabe der gleichen Menge Biobeads wurde die Lösung eine weitere Stunde im Rotator bei 4 °C inkubiert und anschließend durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

#### 5.6.2 Rekonstitution von mFI in DIBMA

Von amphiphilen Co-Polymeren wie Diisobutylen/Maleinsäure (DIBMA) (Danielczak et al., 2019) oder Styren/Maleinsäure (SMA) umhüllte Nanodiscs entstehen spontan bei Zugabe dieses Polymers zu Zellmembranen, wobei Membranproteine inklusive der sie umgebenden Lipide extrahiert werden. DIBMA verhält sich gegenüber bivalenten Kationen wie Magnesium oder Calcium toleranter als SMA (Danielczak et al., 2019).

Zur Extraktion von mFI aus *E. coli*-Membranen wurden die Zellen zunächst, wie in Kapitel 5.5.1 beschrieben, lysiert. Ein Membranpellet wurde in Lysepuffer zu einer Endkonzentration von 25 mg/mL Nassmasse resuspendiert und mit 3 mM (2,5% (w/v)) DIBMA versetzt. Die Proben wurden unter Rotieren bei Raumtemperatur für 24 Stunden inkubiert und schließlich für eine Stunde bei 100000 x g bei 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

#### 5.6.3 Rekonstitution von mFI in Proteoliposomen

Die Rekonstitution in Proteoliposomen erfolgte nach einem angepassten Protokoll von Radian und Kanner (Radian & Kanner, 1985). In einer Vakuumzentrifuge wurden 500 µL in Chloroform gelöstes *Soybean Polar Lipid Extract* Lipid (Avanti) für etwa zwei Stunden getrocknet. Der Lipidfilm wurde durch Sonifizieren mit einem Puffer aus 25 mM Tris pH 8 und 150 mM KCl gelöst und die Lipidkonzentration auf 15 mg/mL eingestellt. Nach 20-maligem Extrudieren (Mini-Extruder, Avanti) lagen monodisperse Liposomen vor, wobei die Liposomengröße von der Anzahl an Durchgängen durch die Extrudermembran abhängt. Zur Ermittlung der benötigten Menge Detergenz zum Einbau des Proteins in die Liposomen wurde die Absorption



der Lipidlösung bei 560 nm bestimmt, die durch Zugabe einer gewissen Menge Detergenz um 15 % sinken soll, was 0,17 % Triton X-100 bewirkten.

100 µL Liposomen wurden mit 50 µL verschieden stark konzentrierter Proteinlösung gemischt, sodass Lipid-zu-Protein-Verhältnisse (*lipid-to-protein ratio*, LPR) zwischen 3,5 und 2000 vorlagen. Nach Zugabe von 0,17 % Triton X-100 erfolgte eine zehnminütige Inkubation auf Eis. Die Proteoliposomen wurden auf eine mit Puffer äquilibrierte und trocken zentrifugierte PD10 SpinTrap-Säule gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 800 x g befanden sich die Proteoliposomen im Durchfluss. Proben der Proteoliposomen und des zweiten Elutionsschrittes wurden mittels Western-Blot analysiert.

#### 5.6.4 Rekonstitution von mFI in Nanodiscs

Nanodiscs (NDs) bestehen aus einem Lipid-Doppelschicht-Fragment, das von den amphipathischen Helices zweier *membrane scaffold* Proteine (MSP) umhüllt ist (Bayburt et al., 2002; Denisov et al., 2004). Für die Rekonstitution von mFI wurden die Lipide *Soybean Polar Lipid Extract* (Soy PC, Avanti) und *E. coli Polar Extract* (*E. coli* PE, Avanti) getestet. Zur Herstellung der Lipidlösungen wurden 1 mL (25 mg/mL) in Chlorophorm gelöstes Lipid getrocknet und mit 1,6 % DM-haltigem Puffer (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>) durch Ultraschall gelöst, sodass die Konzentration für Soy PC bei 60 mM und für *E. coli* PE bei 83 mM lag. Für ein Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:70 wurden 27,6 µL mFI-StrepII (14 mg/mL) mit 38,9 µL Soy PC bzw. 28,2 µL *E. coli* PE versetzt. Neben dem Puffer mit Tris (pH 7,4) wurde auch ein NaAc-Puffer (pH 4,6) getestet. Die Protein-Lipid-Lösungen wurden für 15 min bei Raumtemperatur, dann für eine Stunde bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 mg MSP1E3D1 (MSP:Protein:Lipid 0,1:1:70) mit anschließender Inkubation für eine Stunde bei 4 °C unter Rotieren. Zum Entfernen des Detergenz erfolgte die Dialyse in einem Dialyseschlauch gegen 1 L Puffer (25 mM NaAc pH 4,6 oder 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>), der nach 1, 2 und 12 Stunden gewechselt wurde.

### 5.7 Chromatographische Reinigung

#### 5.7.1 Immobilisierte-Metallkationen-Affinitätschromatographie

Wegen des in natürlichen Proteinen nur selten vorkommenden Histidins kann die Reinigung von Proteinen mit einem Poly-Histidin-Anhängsel über eine immobilisierte Metallkationen-Affinitätschromatographie (IMAC) erfolgen (Arnold, 1991; Cheung et al., 2012). Die IMAC wurde im Eintopf (*batch*)-Verfahren durchgeführt, wozu die Matrix mit Wasser gewaschen und in IMAC Waschpuffer (WP) äquilibriert wurde. Anschließend wurde sie in etwa 40 mL WP resuspendiert und zu dem Solubilisat gegeben. Die Bindung erfolgte für zwei Stunden unter Rühren bei 4 °C. Anschließend wurde die Matrix mit dem Solubilisat in eine Leersäule abgegossen und mit zehn Säulenvolumina WP gewaschen. Die 6xHis-Anhängsel der Proteinkonstrukte können an die immobilisierten Nickel-II-Ionen binden. Die Elution erfolgte mit fünf Säulenvolumina Elutionspuffer, der einen hohen Überschuss Imidazol enthält, welches

ebenfalls an Nickel-II-Ionen bindet und dadurch das Protein von der Säule verdrängt (Porath et al., 1975; Berget, 2006).

### 5.7.2 StrepII-Tactin-Affinitäts-Chromatographie

Die StrepII-Tactin-Affinitätschromatographie wurde im *batch*-Verfahren durchgeführt. Bei dem *StrepII*-Anhängsel handelt es sich um ein acht Aminosäuren langes Peptid (WSHPQFEK). Die Matrix besteht aus dem technisierten Streptavidin StrepII-Tactin, welches das rekombinante Protein mit StrepII-Anhängsel binden kann (Korndorfer, 2002; Schmidt & Skerra, 2007).

Die Bindung an die in Strep-WP äquilibrierte Matrix erfolgte über Nacht unter Rühren bei 4 °C. Hierbei wurde gleichzeitig der in 5.5.3 beschriebene SUMO-Verdau durchgeführt. Nachdem die Lösung mit der Matrix in eine Leersäule abgegossen wurde, erfolgte das Waschen mit zehn Säulenvolumina Strep-WP. Eluiert wurde schrittweise mit 60 mL Desthiobiotin-haltigem Elutionspuffer. Desthiobiotin konkurriert mit dem StrepII-Anhängsel um die Strep-Tactin Bindestelle, wodurch das Protein verdrängt wird (Schmidt & Skerra, 2007).

### 5.7.3 Ulp1-Verdau zur Abspaltung des 6xHis-SUMO-Anhängsels

Das SUMO-Anhängsel (*small ubiquitin-related modifier*) erhöht sowohl die Expression als auch die Löslichkeit von Proteinen (Butt et al., 2005; Lee et al., 2008).

Das Abspalten des 6xHis-SUMO-Anhängsels erfolgte mit der katalytischen Domäne der besonders präzisen SUMO-Protease Ulp1p (Ulp1p<sub>403-621</sub>), welche die Tertiärstruktur von SUMO erkennt, was ein fehlerhaftes Schneiden innerhalb des Zielproteins verhindert (Mossessova & Lima, 2000; Marblestone et al., 2006).

Für eine Imidazolkonzentration von unter 100 mM für den SUMO-Verdau (Zuo et al., 2005; Malakhov et al., 2004) wurden die IMAC-Elutionsfraktionen etwa 1:4 mit SUMO-Verdünnungspuffer verdünnt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 4 °C unter Rühren mit einem Protease-zu-Protein-Verhältnis von etwa 1:2. Anschließend wurde die Strep-Elutionsfraktion über 5 mL in WP äquilibrierte IMAC-Matrix gegossen. Nach Waschen mit fünf Säulenvolumina Strep-WP wurde der Durchfluss mit der Waschfraktion, in der das gewünschte mFI-StrepII enthalten ist, vereinigt und mit einem 50 kDa Konzentrator auf ein Volumen zwischen 50 µL und 5 mL eingeengt.

### 5.7.4 Größenausschluss-Chromatographie

Eine Größenausschluss-Chromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) trennt Moleküle nach ihrer Größe auf (Raynal et al., 2010). Die Säule besteht aus einem Gel aus porösen Kügelchen definierter Porengröße, die nur kleinen Molekülen das Eindringen ermöglicht. Da größeren Molekülen somit ein kleineres Volumen zur Verfügung steht, eluieren sie zuerst (Berg et al., 2006). Die verwendeten Säulen sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. Die gereinigten Proteine wurden vor dem Auftragen zum Abtrennen von Aggregaten und Verunreinigungen bei 21000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Eluat wurde mit

Gelfiltrationspuffer durch die Säule gedrängt und in 0,075 bis 1 mL Fraktionen gesammelt. Die Absorption der Proteine lässt sich bei 280 nm verfolgen. Die das Protein enthaltenden Fraktionen der jeweiligen Peaks wurden vereinigt.

## 5.8 Proteincharakterisierung

### 5.8.1 Molekulargewichtsbestimmung mittels statischer Lichtstreuung

Mit Hilfe einer an einen Brechungsindex-, einen UV-, und einen Rechtwinkel-Lichtstreu-Detektor gekoppelten SEC lässt sich das Molekulargewicht eines Proteins bestimmen (Hayashi et al., 1989).

Beim *Right Angle Light Scattering* (RALS) trifft Licht auf ein Molekül oder Partikel, wird absorbiert und in alle Richtungen emittiert, wobei sich die Intensität des gestreuten Lichts und der über den RI- und UV-Detektor gemessenen Konzentration der Probe nach folgenden Formeln berechnen lässt (Gimpl et al., 2016; Malvern, 2013).

$$UV\text{-Signal} = K_{UV} \times \frac{dA}{dc} \times c$$

1

$$RI\text{-Signal} = K_{RI} \times \frac{dn}{dc} \times c$$

2

$$RALS\text{-Signal} = K_{RALS} \times MW \times \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \times c$$

3

$K_{UV/RI/RALS}$  = Kalibrierungskonstante

$dA/dc$  = Quotient des molaren Extinktionskoeffizienten

$dn/dc$  = probenabhängiges RI-Inkrement

MW = Molekulargewicht

Zur Durchführung des Experiments wurden der im Äkta-System integrierte UV-Detektor mit den Viscotek Detektorsystemen VE3580 RI und Viscotek 270 Dual Detector in Reihe geschaltet. Das System wurde mit dem entsprechenden Puffer bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie gespült. Zunächst musste ein Kalibrierlauf mit BSA (Rinderserumalbumin, engl. *bovine serum albumine*) durchgeführt werden, wozu 50-250 µL einer 2 mg/mL konzentrierten BSA-Lösung (ThermoFisher Scientific) auf eine Säule injiziert wurden. Je nach verwendeter Säule wurden 50-500 µL gereinigtes Protein injiziert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm OmniSEC 4.6 mit einer manuellen Festlegung der Basislinie und Peak-Grenzen. Die für  $dn/dc$  und  $dA/dc$  verwendeten Werte sind in Tabelle 5.8 dargestellt (Lafontaine, 2017).

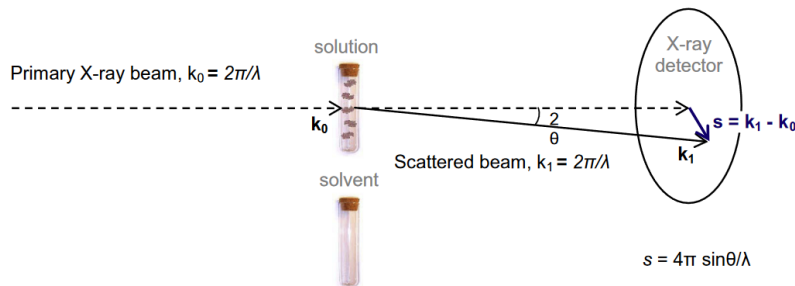
**Tabelle 5.8:  $dn/dc$ - und  $dA/dc$ -Werte ausgewählter Proteine.**

Protein	$dn/dc$ [mL/g]	$dA/dc$ [mL/mg×cm]
mFI-StreptII	0,1933	1,988
NB14	0,185	0,66
BSA	0,185	0,66

## 5.8.2 Kleinwinkelröntgenstreuung an Biomakromolekülen

### 5.8.2.1 Theoretischer Hintergrund

Die Kleinwinkelröntgenstreuung (engl. *Small angle X-ray scattering*, SAXS) erlaubt die strukturelle Charakterisierung von Biomolekülen mit einer Größe von 1 bis 1000 nm in Lösung und liefert Informationen über die Größe und Form eines Proteins (Svergun & Koch, 2003; Kikhney & Svergun, 2015; da Vela & Svergun, 2020) sowie Strukturen mit einer Auflösungsgrenze von 50 Å bis 10 Å (Putnam et al., 2007).



**Abbildung 5.3: Schematische Darstellung eines SAXS-Experiments.** Zufällig orientierte Moleküle in Lösung beugen einen einkommenden Röntgenstrahl, wobei der Wellenvektor mit  $k$  bezeichnet wird und der Winkel zwischen direktem und gebeugtem Strahl  $2\theta$  beträgt. Die Streuintensität wird als Funktion des Moduls des Streuvektors  $s$  (auch bezeichnet als  $q$ ) aufgezeichnet (Kikhney & Svergun, 2015).

Eine Proteinlösung wird mit einem kollimierten, monochromatischen Röntgenstrahl bestrahlt, wobei die Intensität der gebeugten Röntgenstrahlen durch einen Röntgendetektor detektiert und gemittelt wird (Kikhney & Svergun, 2015). Die Methode beruht auf der elastischen Beugung von Röntgenstrahlung an zufällig in der Lösung orientierten Partikeln. So entsteht ein isotropisches, eindimensionales Streumuster mit dem Streuvektor, entweder als  $q$  oder  $s$  bezeichnet, der sich aus der Differenz der Wellenvektoren  $\vec{k}_1$  des gebeugten Strahls um den Streuwinkel  $2\theta$  und  $\vec{k}_0$  ergibt (Svergun & Koch, 2003; Putnam et al., 2007; Pérez & Nishino, 2012). Für den Streuvektor  $q$  gilt:

$$q = \frac{4 \times \pi \times \sin\theta}{\lambda}$$

4

$q = \vec{k}_1 - \vec{k}_0$ : Differenz zwischen den Wellenvektoren des gebeugten Strahls  $k_1$  und des einfallenden Strahls  $k_0$

$2\theta$  = Streuwinkel,  $\theta$  = halber Streuwinkel zwischen einfallender und gebeugter Strahlung

$\lambda$  = Wellenlänge

Informationen über die dreidimensionale Struktur aus den eindimensionalen experimentellen Daten erweisen sich als schwierig zu extrahieren. Eine genaue Beschreibung des theoretischen Hintergrunds findet sich unter anderem in Putnam et al. (2007) und Svergun & Koch (2003) und wird im Folgenden kurz erläutert.

Der Streubeitrag des Puffers wird subtrahiert und mehrere Streukurven gemittelt, sodass die resultierende Streukurve  $I(q)$  der Streuung des Proteins entspricht (Putnam et al., 2007). Da die Wellenlänge fix und  $\theta$  sehr klein ist (in der Regel  $< 3^\circ$ ), entspricht  $I(q)$  gegen  $q$  der Intensität als Funktion des Streuwinkels (Jacques & Trewella, 2010).

Die im Folgenden beschriebene initiale Prozessierung der experimentellen Daten erfolgte mit dem Software-Paket PRIMUS (Konarev et al., 2003).

Der Gyrations-Radius  $R_g$  ist ein Maß für die Größe einer Probe und entspricht dem „reziproken Raum“ (Putnam, 2016). Er gibt die mittleren intramolekularen Abstände jedes streuenden Elektrons zum Zentrum der Elektronendichte an und liefert damit die Information über die Größe des Partikels (Putnam et al., 2007). Der **Guinier-Plot** von  $\ln(I(q))$  gegen  $q^2$  ergibt bei kleinen Streuwinkeln, also dem Beginn der Streukurve, eine lineare Funktion. Aus dieser lassen sich der  $R_g$  aus der Steigung und  $I(0)$ , bei der es sich um die Intensität bei  $0^\circ$  ( $q = 0$  bzw.  $2\theta = 0^\circ$ ) für  $qR_g \leq 1,3$  bei globulären Proteinen handelt, durch Extrapolation des linearen Fits am Schnittpunkt mit der Y-Achse ablesen. Die Intensität lässt sich über die Guinier-Annäherung berechnen (Guinier & Fournet, 1955):

5

$$I(q) = I(0) \times \exp \left[ -\frac{q^2 \times R_g^2}{3} \right]$$

$I(0)$  = gemessene Intensität bei einem Beugungswinkel von  $0^\circ$

$R_g$  = Gyrationsradius [nm]

$q = \vec{k}_1 - \vec{k}_0 = 4 \times \pi \times \sin \frac{\theta}{\lambda}$ : Differenz zwischen den Wellenvektoren des gebeugten Strahls  $k_1$  und des einfallenden Strahls  $k_0$  mit  $k_{0,1} = 2\pi/\lambda$ .

$R_g$  und  $I(0)$  sind abhängig von der Monodispersität einer Probe, weshalb Aggregate oder Verunreinigungen leicht zu Fehlinterpretationen führen können (Kikhney & Svergun, 2015). Höhere  $q$ -Werte enthalten Details über die Form des Moleküls. Für gefaltete Makromoleküle gilt das **Porod-Gesetz** (Porod, 1951).

6

$$I(q) \propto q^{-4}$$

Das Porod-Volumen entspricht dem durch ein hydriertes Molekül ausgeschlossenen Volumen, was in der Regel der doppelten Molekülmasse in kDa entspricht, und wird durch folgende Gleichung beschrieben (Porod, 1982; Putnam et al., 2007):

7

$$V = 2\pi^2 \times I(0) \times Q^{-1}$$

mit

$V$  = Porod-Volumen [nm<sup>3</sup>]

$Q = \int_0^\infty q^2 \times I(q) dq$  (Porod-Invariante)

Bei größeren Winkeln ergeben die Daten einen linearen Plot beim Auftragen von  $q^4 \times I(q)$  gegen  $s^4$ , wobei dies nur für globuläre Proteine mit gleichförmiger Elektronendichte gilt (Putnam et al., 2007).

Der **Kratky-Plot** mit  $q^2 \times I(q)$  als Funktion von  $q$  (Glatter & Kratky, 1985) lässt sich direkt aus der Streukurve berechnen und gibt Aufschluss über die Faltung, die Flexibilität oder das Vorhandensein mehrerer Domänen in einem Protein. So entspricht der Kratky-Plot für

gefaltete, globuläre Proteine etwa einer Parabel, wobei die Lage des Peaks zusätzlich Aufschluss über die Größe gibt (Putnam et al., 2007).

Die **Paarverteilungsfunktion**  $P(r)$  und der maximale Partikeldurchmesser  $D_{\max}$  wurden mit der Software GNOM bestimmt (Svergun, 1992). Bei der Paarverteilungsfunktion  $P(r)$  handelt es sich um ein Histogramm aller Abstände zwischen Elektronen eines streuenden Partikels. Durch indirekte Fourier Transformation der experimentellen Streukurve im reziproken Raum erhält man die Paarverteilungsfunktion (*Pair Distribution Function*)  $P(r)$  im realen Raum (Pérez & Nishino, 2012). Sie beruht auf der Annahme, dass  $P(r)$  null ist bei  $r = 0$  und die maximale lineare Ausdehnung bei  $D_{\max}$  liegt (Kikhney & Svergun, 2015).

Das Streumuster eines Partikels  $I(q)$  ist eine Fourier Transformation seiner  $P(r)$ -Funktion und lässt sich durch die folgende Gleichung in Beziehung setzen:

$$P(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty \frac{q^2 I(q) \sin(qr)}{qr} dq \quad 8$$

Per Definition ist die Paarverteilungsfunktion positiv und läuft langsam Richtung maximaler Dimension  $D_{\max}$  aus und ist null für  $r > D_{\max}$  (Kikhney & Svergun, 2015). Die Form der  $P(r)$ -Funktion ermöglicht Rückschlüsse auf die Form des Partikels (Svergun et al., 2013).

Der  $R_g$  lässt sich ebenfalls über die Paarverteilungsfunktion nach Formel 9 bestimmen.

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\max}} r^2 P(r) dr}{\int_0^{D_{\max}} P(r) dr} \quad 9$$

Der aus der  $P(r)$ -Funktion abgeleitete  $R_g$  wird auch als  $R_g$  des „realen Raums“ bezeichnet. Eine Übereinstimmung zwischen  $R_g$  des „reziproken Raums“ und des „realen Raums“ spricht für eine gute Datenqualität (Putnam, 2016).

Auch  $I(0)$  lässt sich aus der Paarverteilungsfunktion bestimmen, wobei  $I(0)$  der Fläche unterhalb von  $P(r)$  entspricht (Putnam et al., 2007):

$$I(0) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} P(r) dr \quad 10$$

Die Bestimmung von  $I(0)$  und  $R_g$  über die Paarverteilungsfunktion bietet den Vorteil, dass die gesamten Daten zur Berechnung genutzt werden und sich nicht, wie bei der Guinier-Annäherung, auf den kleinen Bereich um den direkten Strahl beschränkt (Putnam et al., 2007; Putnam, 2016).

Mit Hilfe des Programms PRIMUS (Konarev et al., 2003) lassen sich der Guinier-Plot, der Kratky-Plot und die Paarverteilungsfunktion darstellen sowie die beschriebenen Parameter  $R_g$ ,  $I(0)$ ,  $D_{\max}$  und das Porod-Volumen berechnen.

Die Paarverteilungsfunktion erlaubt das Erstellen von *ab initio*- und *rigid body* Modellen. Wegen der fehlenden Struktur von mFI wurden Methoden des ***ab initio*-Modellings**

angewendet. Aus an kleinen Winkeln durchgeführten SAXS-Messungen mit einer Auflösung von 2-3 nm lassen sich lediglich Oberflächenmodelle berechnen, da diese Röntgenstrahlen nicht sensitiv für die innere Struktur sind (Svergun et al., 1995).

Zur Berechnung stehen beispielsweise die Programme GASBOR (Svergun et al., 2001), DAMMIN (Svergun, 1999) und DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) der Atsas-Suite (Manalastas-Cantos et al., 2021) zur Verfügung, die auch über die Website ATSAS online (<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/atsas-online>) genutzt werden können.

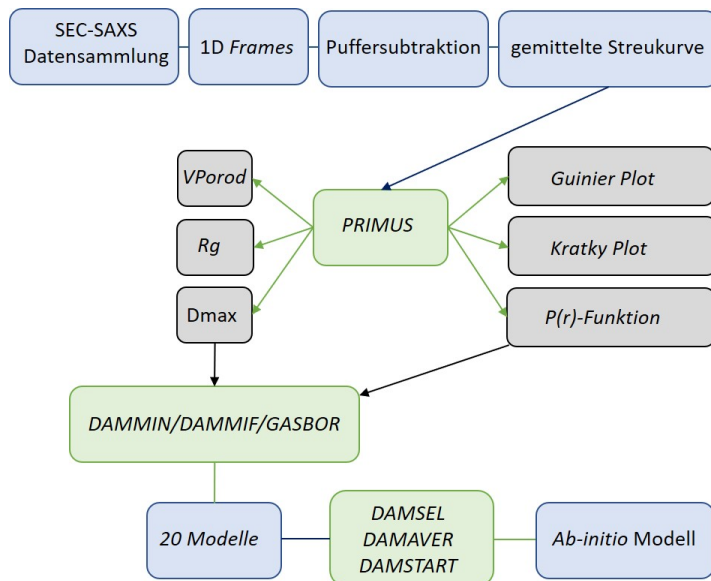
Mittels DAMMIN und GASBOR lassen sich einzelne *ab initio*-Modelle berechnen. DAMMIF vergleicht zusätzlich mit dem in DAMAVER implementierten Programm DAMSEL (Volkov & Svergun, 2003) welches Modell am wahrscheinlichsten zu den experimentellen Daten passt. Dabei handelt es sich um das Modell mit einem  $\chi^2$ -Wert von etwa 1 und der niedrigsten NSD (*normalized spatial discrepancy*) (Besl & McKay, 1992; Da Vela & Svergun, 2020; Kozin & Svergun, 2001). DAMAVER generiert neben einem gemittelten *damaver* Modell außerdem ein *damstart* Modell, welches für eine weitere Verfeinerung in DAMMIN (Svergun, 1999) verwendet werden kann.

Die drei genannten Programme berechnen die Modelle nach dem Prinzip des *Simulated Annealing* (Svergun, 1999). Dabei wird ein durch die  $P(r)$ -Funktion (GNOM-Ausgabedatei, Svergun, 1992) bzw. den  $D_{\max}$  definiertes Suchvolumen mit *Dummy*-Atomen gefüllt (*dummy-atom model*, DAM) und die theoretische Streukurve des DAM von einer zufälligen Konfiguration ausgehend schrittweise an die experimentelle Streukurve angepasst (Putnam et al., 2007; da Vela & Svergun, 2020). Es besteht die Möglichkeit, eine Symmetrie und Anisometrie (*prolate*, länglich oder *oblate*, flach) vorzugeben. Beim GASBOR-Modell entspricht ein Dummy-Atom einer Aminosäure und wird als DRM (*dummy residue model*) bezeichnet (Svergun, 1999). Zur Berechnung der Oberflächenmodelle sollten Daten bis  $q_{\max} = 8/R_g$  verwendet werden (Petoukhov et al., 2012).

Theoretisch lassen sich SAXS-Kurven auch direkt aus atomaren Modellen über die  $P(r)$ -Funktion mit dem Programm CRY SOL berechnen (Putnam et al., 2007; Svergun et al., 1995). Da keine atomare Struktur von mFI vorliegt, wurde eine Strukturvorhersage von AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022) verwendet.

Ein Überblick zur Auswertung der SAXS-Daten ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

## Methoden



**Abbildung 5.4: Schema zur Analyse von SAXS-Daten.** Die verwendeten Programme sind grün hinterlegt, die daraus berechneten Parameter und Funktionen sind grau hinterlegt.

### 5.8.2.2 HPLC-SAXS-Messungen

Es wurden HPLC-(*High-performance liquid chromatography*)-SAXS-Messungen zur Verbesserung der Datenqualität für Membranproteine in Detergenzlösung durchgeführt (Pernot et al., 2010; Molodenskiy et al., 2020). Die Datensammlung erfolgte an der BioSAXS-Beamline BM29 des ESRF bei einer Wellenlänge von 0,9919 Å über einen Pilatus3 2M Detektor (Pernot et al., 2010, 2013). Weitere Messungen wurden an der Beamline Petra III des DESY (Schroer et al., 2022) durchgeführt.

Die Probe wird auf eine SEC-Säule injiziert und das Eluat kontinuierlich mit Röntgenstrahlen bestrahlt, da das HPLC-System direkt in die den Röntgenstrahlen ausgesetzte Durchflussskapillare integriert ist (Brennich et al., 2017). Je nach verwendeter Säule wurden 25-200 µL gereinigtes Protein mit einer Konzentration von etwa 10-20 mg/mL über eine Hamilton-Spritze oder automatisiert über den Probenwechsler (Round et al., 2015) auf die mit Puffer äquilibrierte Säule injiziert. Die Messung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 mL/min (für 10/300 µg-Säulen) oder 0,3 mL/min (für 5/150 µg-Säulen), so dass eine Aufnahme (*Frame*) pro Sekunde für 3000 bzw. 600 erstellte Aufnahmen aufgenommen wurde.

Die Steuerung des Probenwechslers sowie die Aufnahme und Visualisierung der Daten erfolgte über die Software BsxCube, die Steuerung des HPLC-Systems über die Software des Herstellers (Shimadzu). Die Ergebnisse der automatischen Prozessierung durch EDNA (Incardona et al., 2009; Brennich et al., 2016) können über die Datenbank ISPyB abgerufen werden (de Maria Antolinos et al., 2015). Die weitere Prozessierung der Daten erfolgte, wie in Kapitel 5.8.2.1 beschrieben.

### 5.8.3 Interaktionsstudien mittels Pulldown-Assay

Die Durchführung der Pulldown-Assays lehnte an das Prinzip des GST-Pulldowns an (Einarson et al., 2007).



Zuerst erfolgte die Immobilisierung des ersten Proteins mit seinem Affinitätsanhängsel an der entsprechenden Matrix. Waschen mit Puffer entfernte nicht gebundenes Protein und nach Zugabe des Interaktionspartners erfolgte eine mindestens 30-minütige Inkubation. Erneut wurde nicht gebundenes Protein durch Puffer gewaschen. Nach beendeter Elution von der Matrix wurden Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Für den GST-Pulldown von Calmodulin und mFI-Peptiden wurden 100  $\mu$ L GSH-Beads mit 100  $\mu$ L GST-CaM (0,1 mM) für zwei Stunden unter Rotieren bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS durch Zentrifugation bei 800 x g für 1 min erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ L Peptid (0,5 mM) und eine Inkubation unter Rotieren bei 4 °C. Nach erneutem Waschen mit PBS fand die Elution durch Zugabe von Glutathion und Zentrifugation bei 800 x g für 2 min statt.

Für den StrepII-Pulldown von mFI und CaM bzw. Nanobodies wurden 250  $\mu$ L StrepII-Matrix mit 250  $\mu$ L mFI-StrepII (0,1 mM) und 250  $\mu$ L CaM (0,5 mM) bzw. 250  $\mu$ L Nanobody (0,15 mM) verwendet. Die Elution erfolgte durch Desthiobiotin-haltigen Puffer.

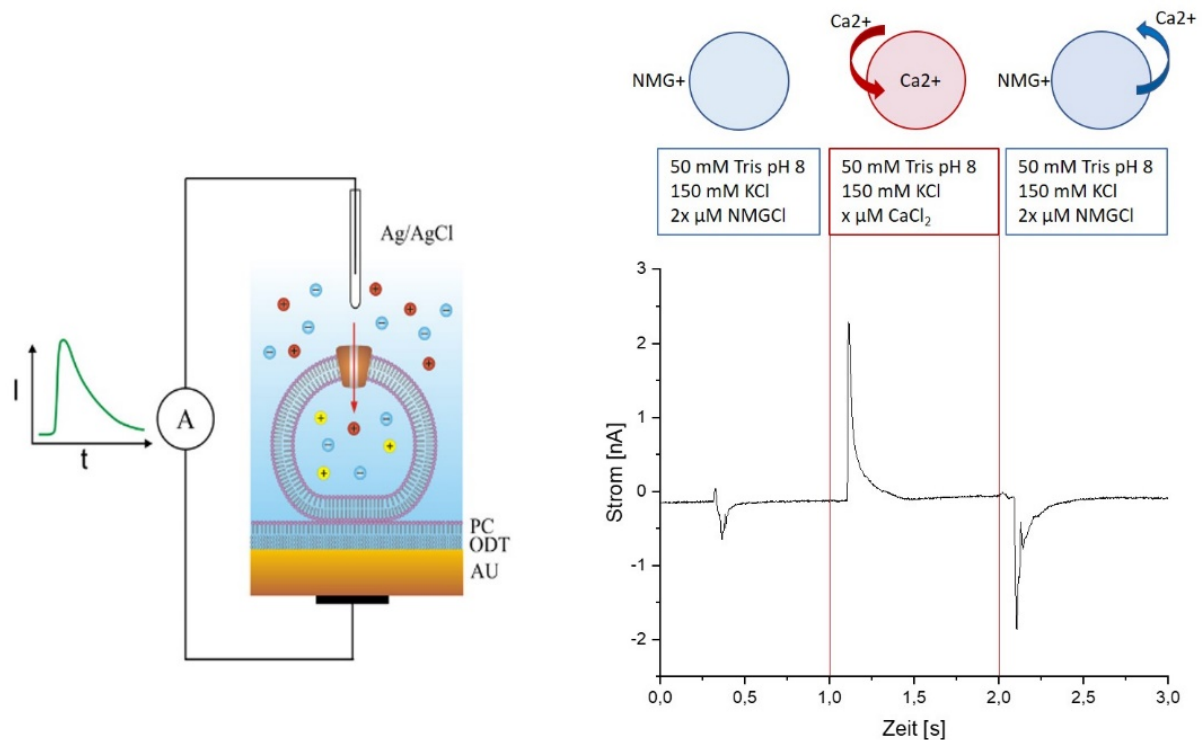
#### 5.8.4 Crosslinking-Experimente mit DSS

Das N-Hydroxysuccinimid-(NHS)-Ester DSS (Disuccinimidyl-suberat) reagiert mit primären Aminogruppen und bildet stabile Amidbindungen. Primäre Amine finden sich in den Seitenketten von Lysinen und dem N-Terminus jeder Polypeptidkette (Mattson et al., 1993). MFI-StrepII wurde in HEPES pH 8 umgepuffert und 27  $\mu$ L mFI-StrepII (0,088 mM) mit 3  $\mu$ L DSS-Lösung verschiedener Konzentration (0-8 mM) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Tris-haltigem SDS- oder nativem Probenpuffer und das Überprüfen des *Crosslinkings* durch eine SDS- oder native PAGE.

#### 5.9 SSM-basierte Elektrophysiologie

Messungen an Festkörper-gestützten Membranen (*solid supported membranes*, SSMs) stellen eine Alternative zur *Patch Clamp* Technik dar. Als Substrat dient ein mit Gold beschichteter Sensor, dessen hydrophile Goldoberfläche durch Alkylierung mit Octadecanethiol in einen hydrophoben Zustand versetzt wird. Nach Zugabe von sich auf der hydrophoben Oberfläche ausbreitendem Phosphatidylcholin bildet sich durch spontane Selbst-Assemblierung eine Liposomen adsorbierende Lipidmonoschicht (Abbildung 5.5, Seifert et al., 1993). Dabei bilden Proteoliposomen und die SSM ein kapazitiv gekoppeltes Membransystem, das Ladungstranslokationen detektieren lässt.

Die Goldschicht dient als eine Elektrode, eine Stahlkapillare als Gegenelektrode, wobei der Austausch zweier Lösungen zu einem Konzentrationsgradienten führt. Für einen einzelnen Lösungsaustausch wird eine nicht-aktivierende und eine aktivierende Lösung benötigt.



**Abbildung 5.5: Liposomen, die einen Kationenkanal enthalten, werden an der SSM adsorbiert.** Die SSM besteht aus einer Octadecanthal-Schicht (ODT), die von einer Phosphatidylcholin-Monoschicht (PC) bedeckt ist und sich auf einem Goldsubstrat (AU) befindet (Schulz et al., 2009). In der Abbildung ist das verwendete Protokoll schematisch dargestellt. Zuerst befinden sich die Proteoliposomen im nicht-aktivierenden Puffer (blau). Nach Austausch zu aktivierendem Puffer (rot) strömt Calcium ein, wodurch ein Peak entsteht. Es folgt ein erneuter Tausch zu nicht-aktivierendem Puffer, wodurch Calcium ausströmt (negativer Peak).

SSM-basierte Elektrophysiologie-Messungen wurden an einem SURFE2R N1 Instrument (Nanon Technologies) durchgeführt. Dazu wurde ein 1 mm SURFE2R N1 Sensor oder ein 3 mm SURFE2R N1 Sensor durch Zugabe einer 0,5 mM Thiollösung (Octadecanthal in Isopropanol) alkyliert und für mindestens 30 min bei RT in einer geschlossenen Petrischale im Dunkeln inkubiert. Nach Waschen des Sensors mit Isopropanol und Wasser wurden 1,5  $\mu\text{L}$  Lipidlösung (7,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin in n-Decan) auf die Goldoberfläche gegeben. Nach sofortiger Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  nicht-aktivierendem Puffer wurden 5  $\mu\text{L}$  Proteoliposomen hinzugefügt und der Sensor für 30 min bei 2000 g zentrifugiert. Vor jeder Messung wurde die Qualität des Sensors durch Messung der Kapazität und Leitfähigkeit überprüft, wobei auf eine Kapazität von 15-30 nF und eine Leitfähigkeit von 5 nS geachtet wurde. Unter Verwendung eines „single solution exchange“ Protokolls bestand der aktivierende Puffer (A) aus 25 mM Tris pH 8, 150 mM KCl und 100-5000  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . Zum Erreichen eines Ladungsausgleiches enthielt der nicht-aktivierende Puffer (NA) 25 mM Tris pH 8, 150 mM KCl und jeweils die zu Calcium doppelte Konzentration NMGCi. Es wurde bei einer Verstärkung von  $10^8$  V/A mit einer Flussrate von 200  $\mu\text{L}/\text{s}$  gemessen, wobei die Messung für 3 mm Sensoren über 6 s, für 1 mm Sensoren über 3 s und der Wechsel zwischen den Puffern nach 1 bzw. 2 s erfolgte.

### 5.9.1 Alkylierung mit MTSET

Eingesetzt wurden Proteoliposomen mit einem LPR von 2000, was einer Proteinkonzentration von 0,005 ng/ $\mu$ L (0,255  $\mu$ M) entspricht. Aufgrund der sieben vorhandenen Cysteine in mFI wurde ein vierzehnfacher Überschuss MTSET (2-(Trimethylammonium)ethyl) Methanthiosulfonat) zugegeben (3,57  $\mu$ M), sodass das Volumen 10  $\mu$ L betrug. Die Reaktion erfolgte auf Eis und wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ L Cystein (200  $\mu$ M) nach 30, 90, 180, 360 und 600 s abgestoppt. Für den Zeitpunkt null wurde zuerst mFI mit Cystein versetzt und anschließend MTSET zugegeben. Eine weitere Probe wurde nicht abgestoppt und bei 4 °C für drei Tage inkubiert, um eine vollständige Alkylierung zu erreichen. Dies wurde mit mFI ohne Calcium und mit mFI nach Zugabe von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt. Jeweils 5  $\mu$ L Proteoliposomen wurden auf einen vorbereiteten 1 mm Sensor gegeben.

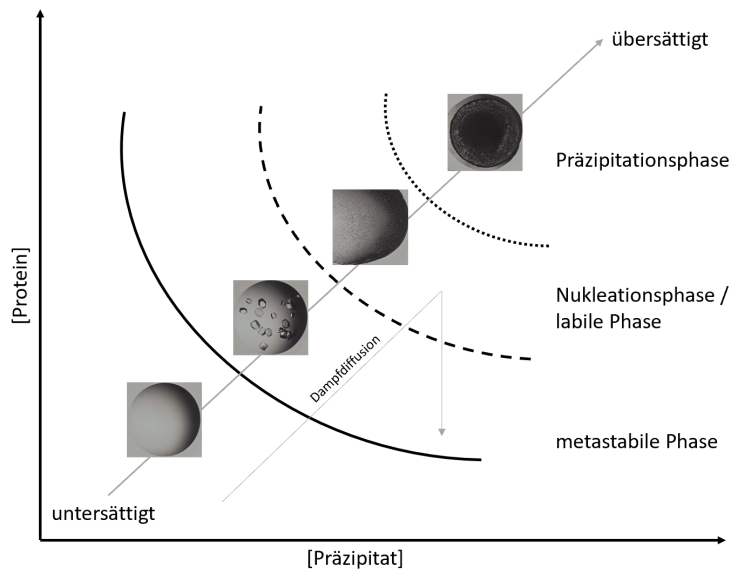
## 5.10 Proteinkristallisation

### 5.10.1 Theoretischer Hintergrund

Die dreidimensionale Struktur bestimmt die Funktion eines Proteins. Zum Verständnis der Funktionsweise ist daher die Aufklärung der 3D-Struktur eines Proteins die Voraussetzung. Die Proteinkristallisation mit anschließender Röntgenkristallographie an Einkristallen war lange die einzige adäquate Methode zur Bestimmung von Strukturen auf atomarer Ebene. Die Kristallisation gilt als ein empirischer Prozess, da es keine umfassende Theorie darüber gibt, unter welcher Bedingung ein Protein kristallisiert (McPherson & Gavira, 2014).

Die Röntgenstrukturanalyse konnte aktuell 87 % der etwa 180000 in der Proteindatenbank (PDB, [www.pdb.org](http://www.pdb.org)) hinterlegten hochaufgelösten Proteinstrukturen bestimmen (Stand Juni 2023; NMR 7 %, EM 6 %), was ihre zentrale Bedeutung im Bereich der Strukturaufklärung hervorhebt.

Eine reine, hochkonzentrierte Proteinlösung wird mit Hilfe präzipitierender Agenzien, die dem Protein Wasser entziehen und anziehende Kräfte verstärken, in ein geordnetes Kristallgitter überführt. Ein Phasendiagramm, in dem Präzipitat- gegen Proteinkonzentration aufgetragen wird, veranschaulicht den Prozess des Kristallwachstums (Abbildung 5.6). Voraussetzung dabei ist ein übersättigter, metastabiler Zustand der Proteinlösung, weil das System mit steigender Übersättigung in die labile Phase mit zunehmender Wahrscheinlichkeit der Nukleation gelangen kann. Die Entstehung von Kristallisationskeimen reduziert die Proteinkonzentration in der Lösung, wodurch das System in die metastabile Phase zurückkehrt und das frei in der Lösung befindliche Protein sich an die Kristallisationskeime anlagert. Die optimale Protein- und Präzipitatkonzentration ist wichtig, da eine zu starke Übersättigung zu einer amorphen Präzipitation des Proteins führen kann und eine zu niedrige Konzentration eine Nukleation verhindert (Rupp, 2010).



**Abbildung 5.6: Phasendiagramm zur Proteinkristallisation.** Es ist die Präzipitat- gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Erreichen diese die labile Phase, kommt es zur Nukleation. Daraufhin findet in der metastabilen Phase das Kristallwachstum statt. Der Verlauf eines Dampfdiffusionsexperiments im Phasendiagramm ist mit einem hellgrauen Pfeil dargestellt. Die Bilder stammen von einem Kristallisationsversuch mit Lysozym (nach Rupp, 2015).

Art und Konzentration des Fällungsmittels, die Proteinkonzentration, der pH-Wert und die Temperatur spielen bei der Kristallisation eine Rolle. Da bislang die Vorhersage einer Kristallisationsbedingung für ein Protein nicht möglich ist, muss zunächst nach potenziellen Treffern gesucht werden, die anschließend weiter optimiert werden können. Hierzu eignen sich kommerziell erhältliche Kristallisations-*Screens*, sogenannte *Sparse-Matrix-Screens* (Chayen & Saridakis, 2008), die mit Hilfe eines Roboters (Phoenix Kristallisationsroboter, Art Robbins) nach der Methode des sitzenden Tropfens im 96-*well* (engl. Vertiefung)Format pipettiert werden (Müller & Lancaster, 2013). Zur Optimierung wurde im 24-*well*-Format nach der Methode des hängenden Tropfens beziehungsweise im 48-*well*-Format nach der Methode des sitzenden Tropfens ein sogenannter *Grid-Screen* angesetzt. So konnten verschiedene Parameter der Bedingungen der potenziellen Treffer wie die Protein-, Präzipitat- oder Salzkonzentration, das Salz, das Präzipitat oder das Protein-zu-Präzipitat-Verhältnis verändert werden (Cox & Weber, 1988; Luft et al., 2007).

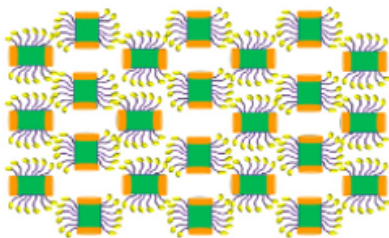
### 5.10.2 Dampfdiffusions-Kristallisation von Membranproteinen *in surfo*

Die Dampfdiffusions-Kristallisation unterteilt sich in die Methode des sitzenden (*sitting drop*) und des hängenden Tropfens (*hanging drop*). Dabei wird die Proteinlösung gegen ein Reservoir mit einer höheren Präzipitatkonzentration als im Proteintropfen äquilibriert, sodass dem Tropfen Wasser entzogen wird. Der Entzug von Wasser führt zu einer Übersättigung im Tropfen. Reservoir und Proteinlösung sind gemeinsam zu einem geschlossenen System verschlossen. Bei dem Tropfen selbst handelt es sich dagegen um ein offenes System, in dem die Diffusion von Wasser möglich ist (Benvenuti & Mangani, 2007; Chayen & Saridakis, 2008; McPherson & Cudney, 2014; Rupp, 2015).

Membranproteine gelten aufgrund ihres amphiphilen Charakters, der Detergenz zur Solubilisierung und Reinigung erforderlich macht, als am schwierigsten zu kristallisieren (Ostermeier & Michel, 1997; Rigaud et al., 2000).

Erste Kristallisationsversuche von Membranproteinen erfolgten mit der *in-surf*-Kristallisation, bei der Kristalle aus in Detergenz solubilisierten Proteinen durch Dampf-Diffusion wachsen (Mus-Veteau et al., 2014). Hierbei entstehen sogenannte TypII-Kristalle (Abbildung 5.7), deren Kristallkontakte über polare Kopfgruppen des Detergenz entstehen, während die hydrophoben Bereiche des Membranproteins durch das Detergenz abgeschirmt werden (Michel, 1983; Kang et al., 2013).

„Typ II“-Kristalle



**Abbildung 5.7: "Typ II"-Kristalle.** Detergenzmoleküle schirmen hydrophobe Regionen des Membranproteins (grün) ab und Kristallkontakte werden über polare Kopfgruppen des Detergenz hergestellt (Krauss et al., 2013).

Im Kristall liegen solubilisierter Membranproteine als Protein-Detergenz-Komplex vor (Le Maire et al., 2000). Dabei ist die Wahl eines geeigneten Detergenz zum Wachstum gut geordneter Kristalle bedeutsam, da wegen des amphiphilen Charakters sowohl Protein-Detergenz- als auch Detergenz-Detergenz-Wechselwirkungen möglich sind, welche die Stabilität des Kristalls stark beeinflussen (Privé, 2007; Newby et al., 2009; Delmar et al., 2015). Nachteilig ist, dass Detergenzmizellen die für Kristallkontakte nötige Oberfläche des Proteins maskieren können und dass sie möglicherweise nicht stabil genug für die Entstehung qualitativ hochwertiger Kristalle sind (Michel, 1983).

Initiale Kristallisationsversuche von Flower-Konstrukten erfolgten mit Hilfe des Kristallisationsrobotors im 96-*well*-Maßstab nach der Methode des sitzenden Tropfens. Dabei wurden 0,15-0,4 µL einer auf 12-24 mg/mL konzentrierten Proteinlösung und Tropfenverhältnissen von 1:1, 1:2 oder 1:0,5 mit einem Reservoirvolumen von 50 µL unter Verwendung der in Tabelle 4.18 angegebenen *Sparse-Matrix*-Screens pipettiert.

Außerdem wurde eine Optimierung initialer zu ersten Proteinkristallen führenden Kristallisationsbedingungen in 24-*well*-Linbro-Platten in einem größeren Maßstab angestrebt. Dazu wurden 1-2 µL Tropfen mit Protein-zu-Reservoir-Verhältnissen von 1:1 und 1:0,5 auf ein Deckglas gesetzt, welches umgedreht über 500 µL Reservoirlösung platziert wurde. Alternativ wurden zur Optimierung 48-*well* Platten im *Sitting Drop* Verfahren verwendet, wobei Tropfen mit einem Volumen von bis zu 10 µL angesetzt wurden. Eine regelmäßige Bewertung der bei 18 °C gelagerten Platten fand unter dem Mikroskop statt.

### 5.10.3 Das Konzept der kleinen Amphiphile

Zu große, nicht in das Kristallgitter des Proteins passende Detergenzmizellen können die Kristallisation eines Membranproteins behindern. Einige dieser Detergenzmoleküle sollen durch kleine amphiphile Moleküle ersetzt werden, um kleinere Mizellen zu erzielen (Michel, 1983) und um die Abtrennung koeluvierender Detergenzmizellen bei der Größenausschlusschromatographie zu erreichen. Zur Kristallisation von mFI-StreptII wurde das Protein entweder mit 3 % 1,2,3-Heptantriol oder 2 mM Benzamidin für 30 min inkubiert und anschließend kristallisiert.

### 5.10.4 Limitierte Proteolyse zur Abspaltung flexibler Bereiche

Die limitierte Proteolyse entfernt mögliche flexible Bereiche im Protein, um eine höhere Proteinstabilität für die Kristallisation zu erreichen (Dong et al., 2007; Wernimont et al., 2009). Für einen Testverdau wurden 5 µL mFI-StreptII (15 mg/mL, 75 µg) oder eine mFI-Variante mit 10 µL der Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin oder Papain in verschiedenen Verdünnungen (1 µg, 0,1 µg oder 0,01 µg) versetzt, für 30 min bei RT inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1xSDS-Probenpuffer abgestoppt. Unter Verwendung des FloppyChoppy-Kits von JenaBioscience wurde den Empfehlungen des Herstellers gefolgt. Die Proteolyse wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Für die Kristallisation von mFI-StreptII wurden 15 µg Subtilisin zu 1,8 mg mFI-StreptII (12 mg/mL) gegeben, sodass ein Verhältnis von 1:120 vorlag. Mit Hilfe des Kristallisationsroboters wurden im 96-*well*-Format unter Verwendung von *Sparse-Matrix Screens* Kristallisationsansätze hergestellt und die Platten bei 18 °C inkubiert.

### 5.10.5 Dampfdiffusions-Kristallisation von Membranproteinen *in meso*

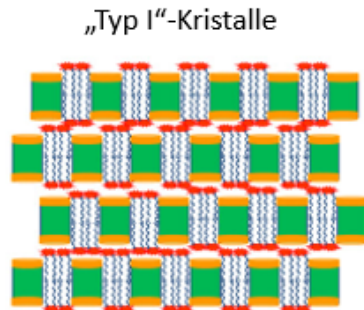
Die *Lipidic Cubic Phase* (kubische Lipidphasen, LCP) Kristallisation ist eine schwierig durchzuführende Methode zur *in meso* Kristallisation von Membranproteinen (Landau & Rosenbusch, 1996). Als schnellere, die LCP-Kristallisation und die Dampfdiffusion vereinende Technologie gilt die *controlled in meso phase* (CIMP) Kristallisation. Hierbei entfällt das kritische Vormischen von Protein und Monoolein und das Screenen im 96-*well*-Format mit Hilfe des Kristallisationsroboters wird möglich. Mit diesem Verfahren können „Typ I“-Kristalle (Abbildung 5.8) entstehen (Kubicek et al., 2012).

Zur CIMP-Kristallisation von mFI-StreptII wurden bereits mit Monoolein beschichtete Platten (CubeBiotech) in Kombination mit einer 1:4 und einer 1:8 Verdünnung der Screens PEG/Ion und PEG/Ion2 von Hampton Research bei einer Tropfengröße von 0,2 µL verwendet. Die Lagerung der Platten erfolgte bei Raumtemperatur, um eine Temperatur über 18 °C sicherzustellen (Kubicek et al., 2012).

### 5.10.6 High Lipid Detergent (HiLiDe) Kristallisation

Mit Hilfe der *High Lipid Detergent* Kristallisation bilden sich ebenfalls „Typ I“-Kristalle (Abbildung 5.8). Diese sind durch kontinuierliche Doppelschichten der Membran-spannenden

Segmente und Lipide gekennzeichnet, wobei die hydrophoben Oberflächen der Lipide Kristallkontakte liefern. Im Gegensatz dazu werden die Kristallkontakte bei „Typ II“-Kristallen nur durch polare Kopfgruppen des Detergenz hergestellt (Gourdon et al., 2011; Krauss et al., 2013).



**Abbildung 5.8: "Typ I"-Kristalle.** Zweidimensionale Schichten von Seite an Seite liegenden Membranproteinen werden übereinandergestapelt. Hydrophobe Oberflächen der Lipide (rot) sorgen dabei für Kristallkontakte (Krauss et al., 2013).

Die Methode basiert auf einem dem Kristallisationsprozess vorangehenden Relipidationsschritt mit hohen Lipid- und Detergenzkonzentrationen. Dazu wurden verschiedene Mengen in Chloroform gelöstes Lipid getrocknet. Anschließend wurden Protein und verschiedene Mengen Detergenz hinzugegeben, sodass Proben mit verschiedenen Lipid/Detergenz/Protein-Verhältnissen vorlagen. Nach einer Inkubation wurden in einem Zentrifugationsschritt Aggregate und überschüssiges Lipid entfernt.

100  $\mu\text{L}$  mFI-StreptII (10 mg/mL) mit 0, 0,75 und 1,5 mg Fos12 (0, 0,75 und 1,5 %) wurden auf einen Dioleoylphosphatidylcholin-(DOPC)-Film aus 0,15, 0,3 oder 0,6 mg Lipid gegeben und über Nacht bei 4 °C rotiert. Nach zweistündiger Zentrifugation bei 21000  $\times g$  und 4 °C wurden mit Hilfe des Kristallisationsroboters Kristallisationsansätze mit verschiedenen *Sparse-Matrix*-Screens hergestellt. Die verwendeten MRC3-Platten wurden mit 0,2  $\mu\text{L}$  Proteinlösung und 0,2 oder 0,4  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung beladen, wobei im dritten *well* Puffer statt Proteinlösung als Kontrolle verwendet wurde. Die Platten wurden bei 18 °C inkubiert.

#### 5.10.7 Kokristallisation von Calmodulin-mFI-Peptid-Komplexen

Für die Kristallisation von Calmodulin-mFI-Peptid-Komplexen wurde der durch eine SEC gereinigte und anschließend aufkonzentrierte Komplex kristallisiert. Damit das Peptid gesichert in der Lösung vorlag, wurde zusätzlich ein fünffach molarer Peptidüberschuss zu dem gereinigten Komplex gegeben. Nach 15-minütiger Zentrifugation der Proteinlösung bei 20000  $\times g$  und 4 °C wurden mit Hilfe des Kristallisationsroboters 0,2  $\mu\text{L}$  einer 12,5 mg/mL Proteinlösung im Verhältnis 1:1 mit Reservoirlösung gemischt. Das Reservoir enthielt 50  $\mu\text{L}$  Präzipitatlösung der *Sparse-Matrix*-Screens PEG/Ion 1+2, ProPlex und Wizard1+2. Die Platten wurden bei 18 °C gelagert.

### 5.10.8 Kokristallisation von mFI-StreptII und Calmodulin

Für die Kokristallisation von mFI-StreptII und Calmodulin wurden 600  $\mu\text{M}$  mFI-StreptII mit 450  $\mu\text{M}$  Calmodulin, 450  $\mu\text{M}$  mFI mit 450  $\mu\text{M}$  Calmodulin und 450  $\mu\text{M}$  Calmodulin mit 600  $\mu\text{M}$  mFI-StreptII inkubiert und anschließend die Kristallisationsansätze mit Hilfe des Kristallisationsroboters hergestellt. 0,4  $\mu\text{L}$  Proteinlösung wurden mit 0,2  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung unter Verwendung verschiedener 96-well Screens gemischt (ProPlex, MemGold, PEG/Ion 1+2, Memstart/MemSys, Morpheus II, Tabelle 4.18) und die Platten bei 4, 10 oder 18 °C inkubiert.

### 5.10.9 Nanobodies als Kristallisationschaperone

Die etwa 15 kDa schweren, nur im Serum von Kameliden vorkommenden Nanobodies stellen eine Ausnahme zu konventionellem Immunglobulin G (IgG) aus Säugern dar. Sie werden auch als VHH (*antigen-binding variable domain of heavy-chain antibodies*) bezeichnet und sind das strukturelle und funktionelle Äquivalent des Fab-Fragments (Antigen-bindendes Fragment) konventioneller Antikörper (Muyldermans, 2013). Nanobodies können als Kristallisationschaperone zur Stabilisierung von Proteinen oder, insbesondere bei Membranproteinen, zur Herstellung von Kristallkontakten genutzt werden (Pardon et al., 2014). Sie besitzen drei komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementary determining regions*, CDRs), welche die Spezifität vermitteln (Bannas et al., 2017)

Den Arbeitsgruppen Flockerzi (Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UdS) und Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM, UdS) wurde gereinigtes mFI-StreptII zur Verfügung gestellt, woraufhin die Immunisierung des Lamas, die Erstellung einer Nanobody-Bibliothek, die Selektion der Nanobodies und das Screenen nach bindenden Nanobodies von Elisabeth Ludes und Silke Bruns-Engers (AG Rettig) durchgeführt wurde. Aus zur Verfügung gestellten Glycerinkulturen erfolgreicher Klone wurden die anschließenden Schritte, welche die Expression, Reinigung, Charakterisierung und Kristallisation der Nanobodies umfasste, selbst durchgeführt.

### 5.10.10 Kristallisation von Nanobody-mFI-Peptid-Komplexen

Nanobody Klon 14 (NB14) wurde mit dem Flower-Peptid mFI-P4 im molaren Verhältnis 1:1,2 für 30 min bei 4 °C im Rotator inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Lösung zum Entfernen von Aggregaten und Verunreinigungen für 15 min bei 20000 x g und 4°C wurden initiale Kristallisationsbedingungen mit Hilfe des Kristallisationsroboters angesetzt. Erfolgreiche Bedingungen wurden später im 24-well-Format optimiert.

### 5.10.11 Ernte von Kristallen

Im Fall schwer zu erntender Kristalle wurde die jeweilige Reservoirlösung in Anlehnung an McFerrin und Snell (McFerrin & Snell, 2002) 1:1 mit 100% PEG400 als Kryoprotektivum gemischt und anschließend auf den Tropfen zum Erlangen einer Kryo-Bedingung gegeben,



sofern nicht bereits eine vorhanden war. Alternativ wurde der Kristall in einen neu angesetzten, mit Kryolösung (PEG400, PEG3350 oder Glycerin) versetzten Tropfen überführt. Die Wahl des Kryoprotektivums erfolgte in Anlehnung an bekannte Bedingungen (Garman & Mitchell, 1996; McFerrin & Snell, 2002). Für Detergenz enthaltende mFI-Kristalle wurde die Kryolösung mit 0,05 % Fos12 angesetzt.

Wird der Kristall zum Schutz vor Austrocknen, zur Verbesserung der Datenqualität und zur Reduktion von Strahlungsschäden in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Henderson, 1990; Macchi, 2011), verhindert die Kryolösung eine den Kristall schädigende Eisbildung (Garman & Owen, 2006).

Die Ernte erfolgte mit einer entsprechend großen Nylonschleife, die den Kristall aus dem Tropfen isolierte (fischte).

#### **5.10.12 Röntgenbeugung und Datensammlung**

Röntgenstrahlen sind hochenergetische, elektromagnetische Strahlen, während Röntgenbeugung das Ergebnis der Interaktion elektromagnetischer Strahlung mit den Elektronen der Atome im Kristall ist. Die Wellenlänge der Röntgenstrahlen sollte im Bereich interatomischer Abstände in Molekülen liegen, weshalb Wellenlängen von etwa 1 Å verwendet werden. Die genaue Theorie der Röntgenbeugung kann in zahlreichen Lehrbüchern nachgelesen werden (Rupp, 2010; Ladd & Palmer, 2013) und wird im Folgenden vereinfacht beschrieben.

##### **5.10.12.1 Aufbau von Proteinkristallen**

Ein Kristall ist eine translational periodische, endliche Anordnung von Einheitszellen, welche durch die Kantenlängen  $a$ ,  $b$  und  $c$  sowie die Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  beschrieben werden. Die asymmetrische Einheit einer Einheitszelle enthält alle nötigen Informationen zur Erzeugung einer vollständigen Einheitszelle einer Kristallstruktur durch Anwendung von Symmetrioperationen an der asymmetrischen Einheit. Im Kristall werden die Einheitszellen dreidimensional gestapelt, wobei der Ursprung jeder Einheitszelle das Kristallgitter bildet. Durch Kombination der Symmetrioperationen Translation und Rotation ergeben sich 65 mögliche Raumgruppen. Jede Raumgruppe ist mit einem von 14 Bravais-Gittern (Kristallgitter im realen Raum) assoziiert, die in die sieben Kristallsysteme triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, hexagonal und kubisch gruppiert sind (Bravais, 1897; Rupp, 2010; Moss et al., 2013).

##### **5.10.12.2 Diffraktion an Proteinkristallen**

Das reziproke Gitter als mathematisches, imaginäres Konstrukt dient zur Beschreibung der Röntgendiffraktion. Für jedes Kristallgitter im realen Raum  $R$  kann ein entsprechendes reziprokes Gitter im reziproken Raum  $R^*$  erzeugt werden. Die Millerschen Indizes  $hkl$  definieren parallele und äquidistante Gitterebenen. Hierbei handelt es sich um ganze Zahlen,

die den Kehrwert der Anzahl der Schnittpunkte einer Gitterebenschar mit den Einheitszellachsen angeben. Je enger der Gitterebenenabstand und somit je größer die Indizes  $hkl$  sind, desto dichter tasten die Ebenen die Einheitszelle ab. Daher liefern höhere  $hkl$ -Werte mehr Details über die Struktur (Rupp, 2010).

Die Intensität der Streufunktion und der Streuwinkel beschreiben die Röntgenbeugung an einem Kristall. Wird ein Kristall Röntgenstrahlen ausgesetzt, verstärkt sich das Röntgenbeugungssignal durch die periodische Anordnung der einzelnen Moleküle und kann detektiert werden (Ladd & Palmer, 2013).

Dies veranschaulicht das Bragg'sche Gesetz (Formel 11) (Bragg & Bragg, 1913), wozu man sich die Beugung als Reflektion von Röntgenstrahlen auf der Oberfläche imaginärer „Spiegel“ vorstellen muss, welche durch die Ebenen im Kristallgitter gebildet werden. So werden aufgrund der periodischen Anordnung der Moleküle die Ebenen durch einen konstanten Abstand  $d$  getrennt.

11

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$

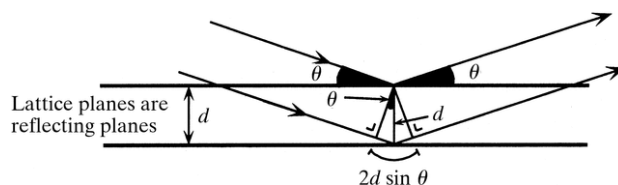
$n$  = ganze Zahl

$\lambda$  = Wellenlänge

$d_{hkl}$  = Abstand zwischen Gitterebenen

$\theta$  = Winkel zwischen einfallendem Strahl und Gitterebene

In Abbildung 5.9 ist die Bragg-Gleichung mit eintreffenden und reflektierten Röntgenstrahlen an zwei Beugungsebenen dargestellt.



**Abbildung 5.9: Schematische Darstellung des Bragg'schen Gesetzes.** Dargestellt sind der Gitterabstand  $d$  und der halbe Streuwinkel  $\theta$  (Drenth, 2006).

Befinden sich die Wellen in der gleichen Phase und treten in ganzzahligen Vielfachen des Einheitszellvektors auf ( $2d\sin\theta = \lambda, 2\lambda, 3\lambda$  usw.), kommt es zur konstruktiven oder positiven Interferenz, sodass sich die Beugung proportional mit einer steigenden Anzahl an sich wiederholenden Einheitszellen verstärkt. Dementsprechend tritt in nicht ganzzahligen  $hkl$  Werten entsprechenden Richtungen keine Beugung auf, wobei man von destruktiver Interferenz spricht. Daher verstärken sich in einem periodischen Kristallgitter die einzelnen Streubeiträge und die Gesamtstreuung eines Kristalls ist proportional zur Summe aller Streubeiträge in der Einheitszelle. Jedes Atom in der Einheitszelle trägt zu jeder Reflektion einer Teilwelle bei, weshalb jedem Reflex ein Strukturfaktor  $F$  zugeordnet werden kann (Rupp, 2010), der durch seine Amplitude  $|F_{hkl}|$  und Phase  $e^{i\alpha(hkl)}$  definiert wird. Die Elektronendichteverteilung  $\rho(x, y, z)$  im realen Raum kann unter Berücksichtigung des

Volumens der Einheitszelle  $V$  mit Gleichung 12, einer inversen Fourier-Transformation, beschrieben werden.

12

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F_{hkl}| \cdot \exp[2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

Allerdings bleibt wegen fehlender Echtzeitmessungen lediglich die Amplitude aus den gemessenen Intensitäten erhalten, was zum sogenannten „Phasenproblem“ führt, da zur Berechnung der Elektronendichtekarte auch die Phase aller Strukturfaktoren benötigt wird. Zu den indirekten Methoden zur Phasenbestimmung gehören der isomorphe und der molekulare Ersatz sowie die anomale Dispersion (Drenth, 2006; Wlodawer et al., 2013).

### 5.10.12.3 Datensammlung

Die Daten wurden an der Beamline ID23-1 (Nurizzo et al., 2006) am ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) in Grénoble unter Verwendung eines Pilatus 6M Detektors bei einer Wellenlänge von 0,979 Å, an der ID30A-3 (Theveneau et al., 2013; Von Stetten et al., 2020) am ESRF unter Verwendung eines Eiger X 4M Detektors bei einer Wellenlänge von 0,9677 Å oder an der X06DA (PXIII) am SLS (*Swiss Light Source*, Paul-Scherrer-Institut, Villigen) unter Verwendung eines PILATUS 2M-F Detektors bei einer Wellenlänge von 1 Å gesammelt.

Die bei 100 K durchgeführten Messungen (Garman & Owen, 2006) erfolgten am ESRF mit Hilfe der Software MxCuBE (Gabadinho et al., 2010) oder wurden am SLS mit Hilfe der DA+ GUI-Software (Wojdyla et al., 2016; 2018) gesteuert.

### 5.10.13 Datenprozessierung

Die Daten wurden mit der Software iMOSFLM (Leslie, 2006; Battye et al., 2011) indiziert, integriert und anschließend mit dem die Programme POINTLESS und CTRUNCATE enthaltenen AIMLESS skaliert (Evans, 2006; 2011; Evans & Murshudov, 2013). Der molekulare Ersatz, bei dem ein Strukturmodell an die Elektronendichte angepasst wird, wurde mit MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) für CaM-Strukturen unter Verwendung einer Calcium-Calmodulin-TRPV1-Peptid-Struktur (PDB: 3SUI) durchgeführt, für den molekularen Ersatz der NB14-Struktur wurde eine Strukturvorhersage von SWISS-MODEL (Guex et al., 2009; Waterhouse et al., 2018) verwendet. Das Modell wurde schrittweise in mehreren Zyklen mit Hilfe von REFMAC und WinCoot (Emsley & Cowtan, 2004) gebaut und verfeinert. Die genannten Programme stammen aus der CCP4 Software (Winn et al., 2011). Der Fortschritt der Verfeinerung wurde durch die Abnahme des freien R-Wertes überprüft (Adams et al., 1999). Die Abbildungen der Strukturen wurden mit PyMOL (Lilko, 2015), Chimera (Pettersen et al., 2004) oder ChimeraX (Goddard et al., 2018; Pettersen et al., 2021) erstellt.

#### 5.10.14 Beurteilung der Datenqualität

Die Auflösung von Beugungsdaten entspricht dem minimalen Abstand  $d$  von Kristallgitterebenen, der messbare Beugung von Röntgenstrahlen liefert, wobei eine hohe Auflösung einem kleinen Abstand entspricht (Wlodawer et al., 2008). Die volle atomare Auflösung ist bei 1,2 Å erreicht, was dem Abstand einer C=O-Gruppe entspricht (Morris & Bricogne, 2003). Neben der unter 2,5 Å liegenden Auflösung zur Identifizierung der Seitenketten von Aminosäuren ist die Vollständigkeit (*completeness*) des Datensatzes von Bedeutung, da bei der Fourier-Transformation jeder Wert der Elektronendichtekarte nur mit dem Beitrag aller Reflexe korrekt berechnet wird (Wlodawer et al., 2008).

Der die Intensitäten des zufällig in zwei Hälften geteilten Datensatzes vergleichende Korrelationskoeffizient  $CC_{1/2}$  (*half data set correlation coefficient*) gilt als wichtigster Indikator für eine gute Datenqualität (Karplus & Diederichs, 2015).

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ( $I/\sigma(I)$ ) gibt das Verhältnis der Intensität der Reflexe zum geschätzten Fehler an und sollte bei etwa 2 liegen (Wlodawer et al., 2013).

Weil die meisten Reflexe und ihre Symmetrieäquivalente mehrfach gemessen werden, müssen ihre Intensitäten gemittelt werden (*merging*). Die durchschnittliche Anzahl einzigartiger Reflexe nennt sich Redundanz oder Multiplizität. Eine hohe Multiplizität verbessert die Qualität der gemittelten Daten in Bezug auf Intensität und deren Fehler. Die Verteilung der individuellen Intensitäten aller Symmetrie-verwandten Reflexe, die zu dem gleichen einzigartigen Reflex beitragen, wird durch den  $R_{\text{merge}}$  oder  $R_{\text{sym}}$  angegeben (Wlodawer et al., 2008). Beide Werte geben den Fehler der Intensitäten unabhängig von der Multiplizität an, weshalb sie als Indikator für die Datenqualität ungeeignet sind. Der  $R_{\text{meas}}$  berücksichtigt zusätzlich die Multiplizität (Karplus & Diederichs, 2015).

Diese R-Faktoren messen die Diskrepanz zwischen den erhaltenen Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{obs}}$  und den berechneten Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{calc}}$  des erhaltenen Modells und sollten optimalerweise unter 20 % liegen. Der  $R_{\text{free}}$  berücksichtigt nur eine kleine Teilmenge an Reflexen, die nicht während der Verfeinerung benutzt wurden, während der R-Faktor für die verwendeten Reflexe als  $R_{\text{work}}$  bezeichnet wird (Wlodawer et al., 2008).

Im Ramachandran-Plot (Ramakrishnan & Ramachandran, 1965) ist auf der x-Achse der Winkel N-C $_{\alpha}$  des Polypeptidrückgrats von -180° bis 180° ( $\Phi$ ) und auf der y-Achse der Winkel C $_{\alpha}$ -C von -180° bis 180° ( $\Psi$ ) aufgetragen. Nicht erlaubte Torsionswinkel werden als *Outlier* angezeigt (Wlodawer et al., 2008).

Auch als Temperaturfaktoren bezeichnete B-Faktoren sind ein Maß für die Verschiebung eines Atoms durch thermische Bewegungen oder Ungleichmäßigkeiten in der Konformation von Aminosäuren oder im Kristallgitter (Arkhipova et al., 2017). Je höher der B-Faktor, umso größer ist die räumliche Ausdehnung der Elektronenwolke, wobei B-Faktoren über 40 Å<sup>2</sup> auf schlecht definierte Bereiche in der Struktur hindeuten (Wlodawer et al., 2008).

## 5.11 Kryo-Elektronenmikroskopie

Die kryogene Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) ermöglicht die Strukturbestimmung monodisperser, makromolekularer Anordnungen, die bei kryogenen Temperaturen in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) abgebildet werden.

Bei der Lichtmikroskopie dienen sichtbare Photonen als Strahlungsquelle. Sobald sie die Probe passieren, werden die Photonen durch optische Glaslinsen gebrochen und erzeugen ein Bild. Bei der Elektronenmikroskopie besteht diese Strahlung aus Elektronen, die von einer sich im Hochvakuum befindenden Quelle emittiert werden und mit Spannungen von 80-300 keV entlang der Säule des Mikroskops beschleunigt werden. Nach Durchdringen der Probe werden gestreute Elektronen durch die elektromagnetischen Linsen des Mikroskops fokussiert (Milne et al., 2013).

### 5.11.1 Negative Kontrastierung

Zur Überprüfung der Qualität der Proben vor Sammlung der Daten im Kryo-EM werden im Elektronenmikroskop Bilder negativ kontrastierter Proben aufgenommen.

Bei der negativen Kontrastierung (*negative Staining*) wird eine dünne Schicht aus biologischem Material von einer getrockneten amorphen Schicht aus schwermetallhaltigen Kationen oder anionischem Salz umgeben. Ein Elektronenbild wird durch die differentielle Elektronenstreuung aufgrund der Massendicke (Dichte x Dicke) erzeugt (Brenner & Horne, 1959; de Carlo & Harris, 2011). Die Proteine werden in ein sehr elektronendichtes Material (z.B. Uranylacetat) eingebettet, welches sich aufgrund seiner Größe nur um die Proteine herumlagert. Deshalb erscheinen die Proteine heller und man spricht von negativer Kontrastierung. Aufgrund dieses hohen Kontrastes können kleinere Moleküle besser visualisiert werden als nach Vitrifizierung der Proben (Ohi et al., 2004).

Die Probe wurde so verdünnt, dass die Absorption bei 280 nm etwa 20 mAU entsprach. 3,5 µL Probe wurden auf ein glimmentladenes Kohlenstoff-beschichtetes Netz (*Grid*) (300 oder 400 mesh 3,05 mm Kupfergrid, Plano GmbH) pipettiert und für 30 s inkubiert. Ein Filterpapier entfernte überschüssige Flüssigkeit. Das *Grid* wurde zwei Mal mit 3,5 µL 2 %-igem Uranylacetat gewaschen. Für die Kontrastierung wurde das *Grid* mit 3,5 µL 2 %-igem Uranylacetat für 1 min inkubiert. Überschüssige Lösung wurde bei den einzelnen Schritten mit einem Filterpapier entfernt.

### 5.11.2 Kryo-Grid-Vorbereitung

Zur Vitrifizierung der Kryo-Elektronenmikroskopie (Adrian et al., 1984) wird die Probe auf ein glimmentladenes mit Gold, Kupfer, Kohlenstoff oder Graphenoxid beschichtetes *Grid* gegeben und schnell durch Eintauchen in flüssiges Ethan gefroren. Das schnelle Frieren verhindert die Bildung von Eiskristallen und bewahrt die Probe in einer fast nativen Umgebung. Nachteilig ist besonders für kleine Proteine das geringe Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Ohi et al., 2004).

Ein in einem Plasma-Cleaner für 1 min glimmentladenes *Grid* wurde mit einer Pinzette in den Vitrobot IV (ThermoFisher) eingeklemmt. 3,5  $\mu\text{L}$  Probe werden seitlich auf das *Grid* aufgetragen. Ein Filterpapier entfernt überschüssige Lösung durch *Blotting* für 5-6 s, wobei die *Blotting*-Zeit entscheidend für die Dicke des Eises ist. Sofort wird die Probe in flüssiges Ethan getaucht und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert (Koning et al., 2022).

### 5.11.3 Datensammlung

Datensätze nach negativer Kontrastierung wurden an einem JEM-2100F (Jeol) Transmissionselektronenmikroskop, das bei 200 keV betrieben wird, gesammelt. Alle Datensätze (Tabelle 5.9) wurden von Dr. M. G. Madej gesammelt (Biophysik II, Universität Regensburg). Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 40000-60000 mit einer 4k x 4k F416 Kamera mit einem CMOS-Chip/ Detektor (TVIPS) aufgenommen, was einer kalibrierten Pixelgröße von 2,843 Å entspricht.

Die Cryo-EM Datensammlung erfolgte an einem JEM-Z200FSC CRYO ARM 200 (Jeol) Transmissionselektronenmikroskop, das bei 200 keV arbeitet. Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 60000-75000 mit einer K2 Summit Direct Detection Kamera (Gatan) aufgenommen, was einer kalibrierten Pixelgröße von 0,7891 Å entspricht.

**Tabelle 5.9: Auflistung der gesammelten Cryo-EM Datensätze.**

Datensatz	Movies	Aufnahmen/Movie	Elektronendosis
mFl in PMAL-C8	1644	40	$1 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$
mFl mit $\text{Ba}^{2+}$ und $\text{PiP}_2$	3366	50	$0,8 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$
mFl in Soy PC ND mit NB14	8781	25	$2 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$
mFl in <i>E. coli</i> PC ND mit NB14	1134	50	$0,8 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$

### 5.11.3 Datenprozessierung

Die Daten wurden in RELION 3.1 oder cryoSPARC importiert, mit MotionCor2 korrigiert und die *Contrast Transfer Function* (CTF) mit CTFFIND4 geschätzt. Die Partikel wurden automatisch gepickt, extrahiert und klassifiziert. Nach mehreren Runden der 2D Klassifizierung wurden gute Partikel für die weitere Prozessierung selektiert. Initiale Modelle wurden mit RELION 3.1 oder CryoSPARC erstellt und verfeinert.

## 5.12 Produktion und Reinigung von Calmodulin

### 5.12.1 Produktion von Calmodulin

50  $\mu\text{L}$  chemisch Kompetente BL21(DE3) Zellen wurden mit 50 ng pET28a\_Calmodulin transformiert. Die Anzucht der Vorkulturen und anschließende Großexpression erfolgte wie in 3.3.1.2 beschrieben. Nach Induktion bei einer OD von 0,8 mit 0,5 mM IPTG wurden die Zellen nach 4 Stunden durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 x g und 12 °C geerntet.

### 5.12.2 Reinigung von Calmodulin

Die Reinigung erfolgte in Anlehnung an Gopalakrishna & Anderson (Gopalakrishna & Anderson, 1982) und Hayashi (Hayashi et al., 1998) nach dem Prinzip der hydrophoben

Interaktionschromatographie (HIC). 15 g Zellen wurden lysiert, mittels Avestin homogenisiert und anschließend eine Stunde bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Lysat mit der zuvor in Äquilibrationpuffer äquilibrierten Phenyl-Sepharose-Matrix und 5 mM CaCl<sub>2</sub> eine Stunde inkubiert. Das Waschen erfolgte mit CWP1 (Niedrigsalzpuffer) und darauf mit CWP2 (Hochsalzpuffer), welche beide CaCl<sub>2</sub> enthielten. Die Bindung von Calcium verursacht eine Konformationsänderung, die zur Exponierung hydrophober Bereiche führt, welche an die Matrix binden (Gopalakrishna & Anderson, 1982). Die Elution erfolgte durch EGTA-haltigen Puffer, durch den die hydrophoben Bereiche infolge einer erneuten Konformationsänderung wieder verdeckt werden. Nach einer Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 16/60 pg-Säule, die mit 20 mM Tris pH 7,4, 75 mM NaCl und 5 mM CaCl<sub>2</sub> äquilibriert war, wurde das Protein kurzfristig bei 4 °C gelagert oder in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 5.12.3 Produktion von GST-Calmodulin

Die Expression von GST-(Glutathion S-Transferase)-Calmodulin erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die mit dem pGEX4T3-GST-Thrombin-Calmodulin-Plasmid (AG Flockerzi, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UdS) transformiert wurden. Die Großexpression fand im 9 L-Maßstab nach Zugabe von 0,4 mM IPTG bei 30 °C für 4 h (Tabelle 5.7) statt. Die Zellen wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 x g geerntet und nach dem Schockfrieren bei -80 °C gelagert.

### 5.12.4 Reinigung von GST-Calmodulin

Die Reinigung von GST-Calmodulin erfolgte über eine GSH-Säule (Smith & Johnson, 1988). Nach der Zellyse von 10 g Zellen in 1xPBS mit 1 mM PMSF, 1 mM e-Aminocapronsäure, 1 mM Benzamidin und DNase wurde der Überstand nach einstündiger Ultrazentrifugation bei 100000 x g und 4 °C über Nacht auf die Säule aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS erfolgte die Elution mit 10 mM Glutathion in 1xPBS.

## 5.13 Produktion und Reinigung von Nanobodies

### 5.13.1 Produktion der Nanobodies

Die Arbeitsgruppe Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM, UdS) stellte *E. coli* WK6-Glycerinkulturen der Nanobodies zur Verfügung. Zur Vermehrung wurden 2 mL TB-Medium, dem 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Glucose (v/v) und 0,1 mg/mL Ampicillin zugefügt wurden, mithilfe einer durch Abflammen sterilen Impfloße mit gefrorener Glycerinkultur angeimpft und für 8-16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Für eine weitere Vorkultur wurden 200 mL mit 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Glucose und 0,1 mg/mL Ampicillin versetztes TB-Medium mit 200 µL der ersten Vorkultur angeimpft und für 8-16 h bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Die Großexpression erfolgte in 1 L. Vor Induktion mit 1 mM IPTG bei einer OD von 0,7 wurde die

Temperatur auf 28 °C herabgesenkt, woraufhin die Expression über Nacht erfolgte. Die Zellen wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 x g bei 8 °C geerntet.

### 5.13.2 Reinigung der Nanobodies

Ein osmotischer Schock wurde zur Freisetzung der Nanobodies aus dem Periplasma der *E. coli* WK6-Zellen verwendet. Die Sekretion der Proteine ins Periplasma wird durch eine pelB-Leadersequenz ermöglicht. Ein Zellpellet aus 1 L Expressionskultur wurde in 15 mL TES-Puffer resuspendiert und für mindestens eine Stunde unter leichtem Schütteln zur Verhinderung von Sedimentation bei 4 °C inkubiert. Das Pellet wurde bei 8000 x g für 10 min bei 4 °C zur Sedimentation in Sucrose abzentrifugiert. Der Überstand wurde separat gesammelt. Das Pellet wurde schnell in 35 mL hypotonischer Lösung (10 mM Tris pH 7, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF) resuspendiert. Die Lösung wurde für mindestens 30 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, bevor durch 30-minütige Zentrifugation bei 23000 x g bei 4 °C Zelltrümmer entfernt wurden. Bei diesem Schritt werden die Proteine aus dem periplasmatischen Raum freigelassen (Pardon et al., 2014; Ghamghami et al., 2020). Die Proteinlösung wurde vor der Reinigung mit 150 mM NaCl versetzt. Die Reinigung erfolgte mittels IMAC über das 6xHis-Anhängsel der Nanobodies. Vor der Kristallisation des Nanobodies wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt.

## 5.14 Produktion und Reinigung der SUMO-Protease

### 5.14.1 Produktion der katalytischen Domäne der SUMO-Protease Ulp1p

Zur Produktion der katalytischen Domäne der SUMO-Protease Ulp1p aus *Saccharomyces cerevisiae*, die mit einem N-terminalen 6xHis-Affinitätsanhängsel fusioniert wurde, wurden chemisch kompetente *E. coli* Rosetta2(DE3) Zellen mit einem p6xHis-Ulp1p(403-632) Plasmid transformiert (AG Flockerzi, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Homburg). Nach Anzucht der Vorkulturen wurden die Zellen zur Großexpression bis zu einer OD von 0,7 bei 37 °C kultiviert. Anschließend erfolgte die Temperatursenkung auf 20 °C und die Expression über vier Stunden.

### 5.14.2 Reinigung der SUMO Protease Ulp1p

Ein Zellpellet wurde nach Zugabe von 200 mL Lysepuffer (Ulp1-LP) mittels Ultraturrax resuspendiert und nach Zugabe von 20 µL DNase und 1 mM PMSF im Avestin lysiert. Die lysierten Zellen wurden anschließend für eine Stunde bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Protein wurde über eine IMAC im *batch*-Verfahren gereinigt und die das reine Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt. Nach Zusatz von 2 mM DTT wurden sie 1:2 (v/v) mit Ulp1-VP verdünnt. Das anschließend konzentrierte Protein wurde 1:1 (v/v) mit 100 % Glycerin gemischt, aliquotiert und nach Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.



## Kapitel 6 Ergebnisse

### 6.1 Bioinformatische Analysen

Zur Bestimmung des Homologiegrades zwischen den Flower-Proteinen aus *D. melanogaster* (dFwe), der Maus (mFwe) und dem Menschen (hFWE) wurde eine Alinierung der Aminosäuresequenzen ausgewählter Isoformen durchgeführt (Abbildung 6.1).

mFweA	-MSGSGAAGAAAGPA-PPAQEEGMTWWYRWLCRLAGVLGAVSCAISGLFNCVTIHPL---	55
hFwe4	MSSSGGAPGASASSA-PPAQEEGMTWWYRWLCRLSGVLGAVSCAISGLFNCITIHPL---	56
dFweUbi	MSFAEKITGLLARPNQDPIGPEQPWYLKYSRLLGIVAAFFAILFGLWNVFSIITLSVS	60
	. * * *: : . ** * : : . * . : * : * . : * *	
mFweA	NIAAGVWMIMNAFILLLCEAPFCCQFVEFANTVAEKVDRLRSWQKAVFYCGMAIVPIVMS	115
hFwe4	NIAAGVWMIMNAFILLLCEAPFCCQFIEFANTVAEKVDRLRSWQKAVFYCGMAVVPVIS	116
dFweUbi	CLVAGILQMVAGFVVMLEAPCCFVCFGQVNEIAEKVESKPLYFRAGLYIAMAIPPIILC	120
	: . ** : : . * : : * * * * . . * : * * * : : * : * . ** : * : .	
mFweA	LTLTLLGNIAIFATGVLYGLSALGKKGDAISYARIQQRQQADEEKLAE-----	166
hFwe4	LTLTLLGNIAIFATGVLYGLSALGKKGDAISYARIQQRQQADEEKLAE-----	167
dFweUbi	FGLASLFGSGLIFGTGVVYGMALGKKKASAEDMRAAAQQTFGGNTPAQTNDRAGIVNNAQ	180
	: * : : * . : * . * * : * : * * * . . * . * * : : : :	
mFweA	---FEGEL-----	171
hFwe4	---LEGEL-----	172
dFweUbi	PFSFTGAVGTDENV	194
	: * :	

**Abbildung 6.1: Sequenzalinierung der Flower-Isoformen mFweA, hFWE4 und dFweUbi.** Die Alinierung wurde mit dem Programm ClustalW (Thompson et al., 1994) durchgeführt. Identische Aminosäuren sind grün markiert. MFweA und hFWE4 haben eine Sequenzidentität von 91,9 %, mFweA und dFweUbi eine Sequenzidentität von 26,8 %.

Die Untersuchung des humanen Flower-Proteins mit einer ersten Veröffentlichung 2019 (Madan et al., 2019) ist von höchster klinischer Relevanz.

Wegen der Sequenzidentität von mFweA zur humanen Isoform hFWE4 von 92 % geht man von einer ähnlichen Struktur und Funktion beider Proteine aus, während mFweA aus der Maus zu dFweUbi aus *D. melanogaster* nur eine Sequenzidentität von 27 % aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der aus 171 Aminosäuren bestehenden längsten Isoform mFweA, hier mFI genannt, gearbeitet. Die Aufklärung der Struktur dieser Isoform sollte die meisten Informationen zur Struktur und Funktion aller Isoformen liefern.

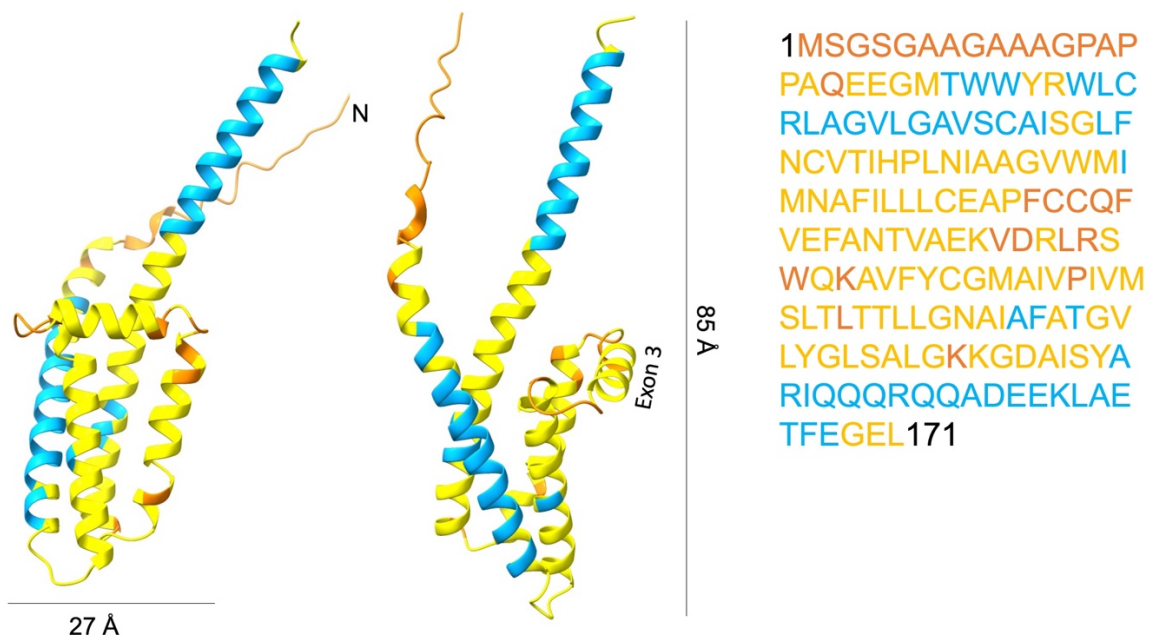
Von mFI fehlt bislang eine atomare Struktur. Die Vorhersage einer Struktur ist schwierig, weil keine homologen Proteine bekannt sind und die Ergebnisse verschiedener Server für Strukturvorhersagen stark variieren. In Tabelle 6.1 sind die Ergebnisse einiger Server zur Vorhersage von Transmembrandomänen aufgelistet, bei denen sich Ähnlichkeiten der Ergebnisse für Transmembrandomäne (TM) 1 und 2 zeigen, während sie für TM 3 und 4 stärker variieren.

## Ergebnisse

**Tabelle 6.1: Anwendung verschiedener Algorithmen zur Vorhersage von Transmembrandomänen in mFl.** Zahlen entsprechen der Aminosäurenummer des 171 Aminosäuren langen mFl. Referenzen der Server sind in Tabelle 4.21 angegeben.

Server	TM1	TM2	TM3	TM4
TMPred	32-50	58-79	107-136	-
PsiPred	27-56	60-82	99-115	119-137
TMHMM	32-54	59-81	101-123	-
HMMTOP	34-50	55-72	101-118	123-140
MEMSAT	28-47	57-73	101-118	125-141
PredictProtein	29-50	57-78	101-119	121-140
PredTMR	31-53	57-81	102-135	-
Proteus2	34-54	61-81	103-123	-
XtalPred	32-54	59-81	101-123	-
DAS	32-52	57-75	104-136	-
TOPCONS	32-51	61-81	98-118	120-140
OCTOPUS	29-47	51-81	103-118	120-134
Philius	28-52	61-82	101-128	-
Poly-Phobius	29-53	56-84	101-117	119-139
SCAMPI	32-52	61-81	98-118	120-140
SPOCTOPUS	29-49	51-81	104-118	120-134
Phobius	28-47	59-82	102-129	-
MemBrain	24-50	54-93	99-115	119-139

Auch der Algorithmus von AlphaFold (Varadi et al., 2022; Jumper et al., 2021) hat bei der Vorhersage einer eindeutigen Struktur Schwierigkeiten, dargestellt durch die gelben und orangen Bereiche mit niedriger Sicherheit in Abbildung 6.2.



**Abbildung 6.2: Strukturvorhersage für mFl von AlphaFold (AF-Q8BG21-F1).** Hellblau entspricht einem sicheren *per-residue confidence score* (pLDDT) von 70-90, gelb einem niedrigem pLDDT von 50-70 und orange einem sehr niedrigem pLDDT von unter 50. Das Modell hat eine Länge von 85 Å und eine Breite von 27 Å. Exon 3 besteht aus den Aminosäuren 68-111, wobei es sich bei den Aminosäuren 75-100 um eine aliphatische Helix handelt (MemBrain, Yin et al., 2018).

Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer experimentell bestimmten, hochaufgelösten Struktur.

## 6.2 6xHis-SUMO-mFI-StrepII und mFI-StrepII

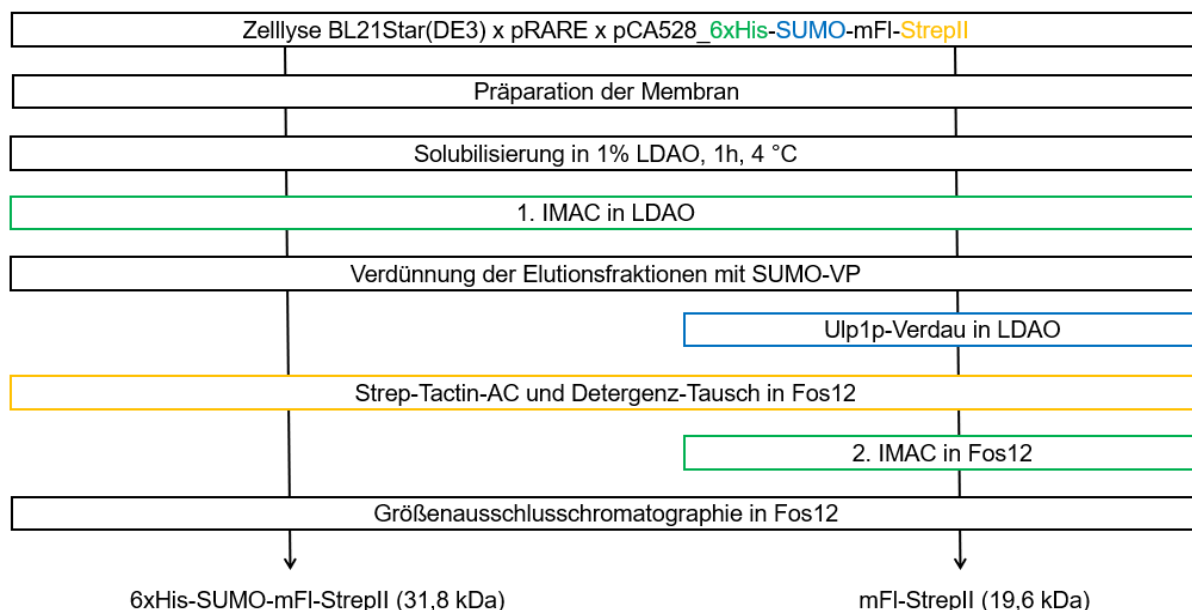
Da das StrepII-Anhängsel in keinem Fall abgespalten wird, wird mFI-StrepII zur Vereinfachung im Text mFI genannt. In den folgenden Kapiteln wird die Produktion, Reinigung und Charakterisierung von mFI beschrieben.

### 6.2.1 Produktion von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII in *E. coli*

Die Produktion von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII erfolgte, wie in Kapitel 5.4.2.2 beschrieben, unter Verwendung des Autoinduktionssystems im *E. coli*-Stamm BL21Star(DE3) x pRARE, der mit dem Plasmid pCA528\_6xHis-SUMO-mFI-StrepII transformiert wurde (Lafontaine, 2017). Die dabei erreichten Ausbeuten von 10-15 g Zellen pro Liter Zellkultur wurden als etwa 60 g schwere Pellets schockgefroren und bis zur Lyse bei -80 °C gelagert.

### 6.2.2 Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII und mFI-StrepII in LDAO und Fos12

Abbildung 6.3 zeigt ein Schema des Ablaufs der Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII. Durch thermische Stabilitätsmessungen mit verschiedenen Pufferionen, pH-Werten, Additiven und Detergenzien konnte bei mFI in Fos12 in NaAcetat-Puffer mit einem pH-Wert von 4,6 die höchste Stabilität festgestellt werden (Lafontaine, 2017). Zur Rekonstitution von mFI oder zur Durchführung von Interaktionsstudien wurde ein Puffer mit 50 mM Tris mit einem pH-Wert von 8 verwendet. Aufgrund der durch Microscale-Thermophorese nachgewiesenen Affinität von mFI für Calcium wurden die Reinigungen in Anwesenheit von 20 mM  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt (Lafontaine, 2017).



**Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der Reinigungsstrategie für 6xHis-SUMO-mFI-StrepII in LDAO und Fos12 nach einem von Dr. Michael Lafontaine etablierten Reinigungsprotokoll** (Lafontaine, 2017). Nach Zelllyse und Präparation der Membran erfolgte die Solubilisierung in LDAO. Der erste Reinigungsschritt erfolgte über das 6xHis-Anhängsel durch eine IMAC. Nach Verdünnen der Elutionsfraktionen wurde das 6xHis-SUMO-Anhängsel abgespalten. Während der Reinigung über den StrepII-Tag erfolgte der Detergenztausch zu Fos12. Die zweite IMAC dient dem Abtrennen von ungeschnittenem Protein. Nach einer Größenausschlusschromatographie sollte gereinigtes mFI oder bei ausbleibendem Ulp1-Verdau 6xHis-SUMO-mFI-StrepII vorliegen.

Starkes Aufkonzentrieren von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII führt zum Ausfallen des Proteins. Da nicht geklärt ist, inwieweit das SUMO-Anhängsel die Struktur und somit die Aktivität von mFI verändert oder ob es bei der Kristallisation stört, wurde es in der Regel abgespalten. Die Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII ist in Kapitel 12.3 (Abbildung 12.3) aufgeführt.

### **Zellyse und Solubilisierung**

Nach der Beschreibung in Kapitel 5.5 erfolgten zunächst Zellaufschluss und Lyse von 40-70 g Zellen. Nach Präparation der Membranfraktion durch Ultrazentrifugation fand die Solubilisierung für eine Stunde bei 4 °C mit 1 % LDAO statt. Anschließende Ultrazentrifugation bei 100000 x g trennte Zelltrümmer und nicht solubilisiertes Material ab. Aus einem 60 g Zellpellet wurden etwa 25 g Membran gewonnen.

### **Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie**

Der erste Reinigungsschritt erfolgte durch eine wie in Kapitel 5.7.1 beschriebene Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie (IMAC) in LDAO im *batch*-Verfahren mit erneutem Auftragen des Durchflusses, um möglichst wenig Protein zu verlieren. Proben von Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden in einer SDS-PAGE zur Überprüfung des Reinigungsschrittes untersucht. In den Elutionsfraktionen (Abbildung 6.4, Spur 3 und 6) sind zwei deutliche Banden bei 20 und 40 kDa erkennbar, wobei keine zu dem theoretischen Molekulargewicht von 31,8 kDa von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII passt. Daher gilt die Annahme, dass es sich um ein höher laufendes Monomer und abgebautes Protein handelt, als bei ihrem Molekulargewicht zu erwarten wäre. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit einem 50 kDa-Konzentrator eingengt.

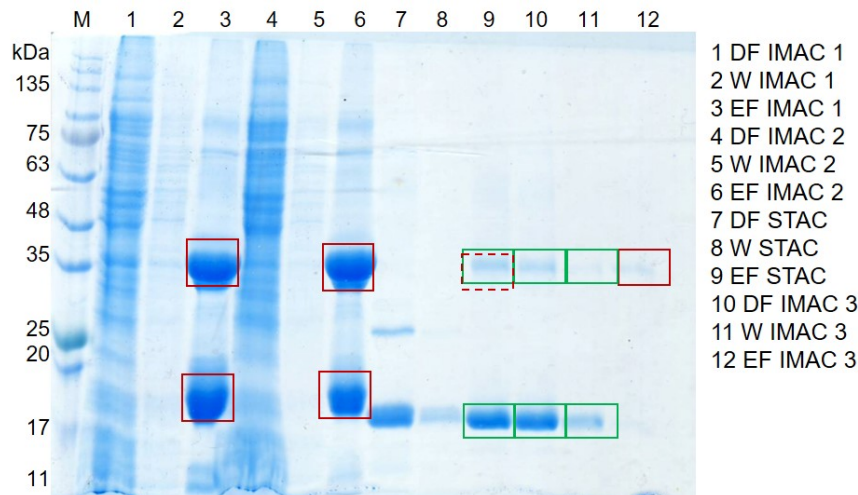
### **StrepII-Tactin-Affinitätschromatographie und Ulp1p-Verdau**

Nach Verdünnen der IMAC-Elutionsfraktionen zur Reduktion der Imidazolkonzentration erfolgte die in Kapitel 5.7.3 beschriebene Abspaltung des 6xHis-SUMO-Anhängsels über Nacht, gefolgt von einer StrepII-Tactin-Affinitätschromatographie (STAC) mit gleichzeitigem Tausch des Detergenz zu Fos12. Die STAC wurde gegebenenfalls beim Nachweis größerer Proteinmengen im Durchfluss wiederholt. Im SDS-Gel (Abbildung 6.4) ist im Durchfluss und den Waschfraktionen (Spur 7 und 8) bei etwa 18 kDa abgespaltenes 6xHis-SUMO-Anhängsel angefärbt, ebenso wie die etwa 26 kDa schwere SUMO-Protease bei 25 kDa. In der Elutionsfraktion (Spur 9) sind zwei Banden erkennbar, wobei die untere bei etwa 20 kDa mFI mit einem theoretischen Molekulargewicht von 19,6 kDa repräsentiert. Bei der oberen Bande bei etwa 40 kDa handelt es sich um ein SDS-resistentes Dimer des Proteins und um auf gleicher Höhe laufendes ungeschnittenes Protein.

### **Zweite Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie**

Zur Abtrennung von ungeschnittenem Protein wurde eine zweite IMAC in Fos12 durchgeführt, bei der sich mFI im Durchfluss befinden sollte. Sowohl im Durchfluss als auch in der

Waschfraktion (Spur 10 und 11, Abbildung 6.4) sind Banden von mFI sichtbar, wobei es sich bei der unteren bei 17 kDa um ein Monomer und bei der Bande bei 35 kDa um ein SDS-resistentes Dimer handelt. In der Elutionsfraktion in Spur 12 fällt das Vorliegen von ungeschnittenem Protein auf. Das in Abbildung 6.4 abgebildete SDS-Gel zeigt die erfolgreiche Reinigung von mFI.



**Abbildung 6.4:** 12 %-iges SDS-Gel der Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII nach Coomassie-Blau-Färbung. DF = Durchfluss, W = Waschfraktion, EF = Elutionsfraktion. Rot umrandet sind Banden von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII, grün umrandet sind Banden von mFI-StrepII.

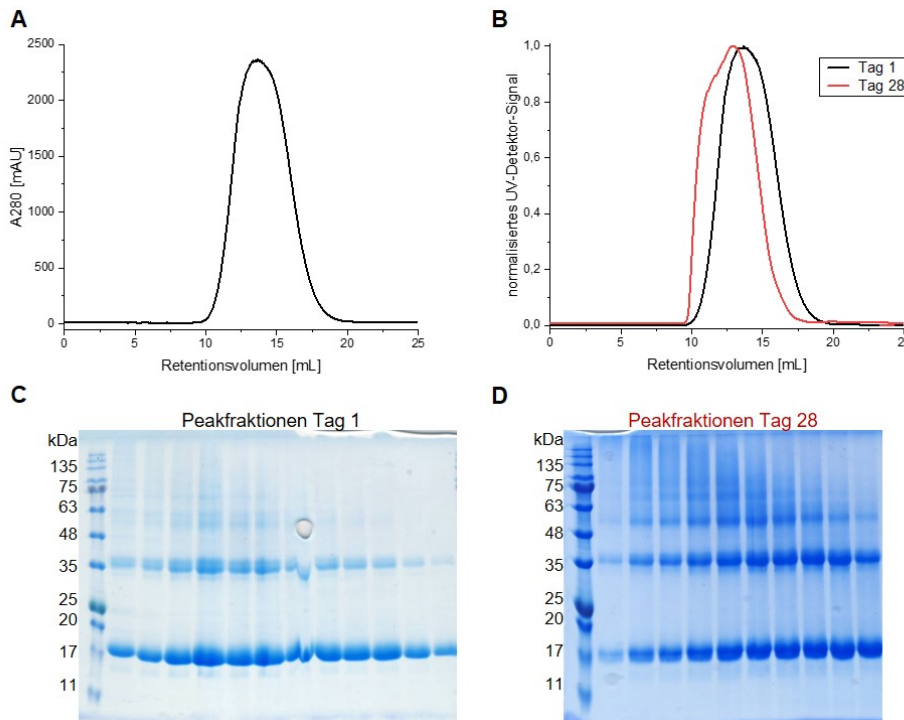
### Größenausschluss-Chromatographie

Der abschließende Reinigungsschritt bestand aus einer präparativen Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) mit dem Ziel der Auftrennung der im SDS-Gel der Reinigung identifizierten Oligomere. Die Säule wurde zuerst mit Gelfiltrations-(GF)-Puffer äquilibriert. Die vereinigten Durchfluss- und Waschfraktionen der zweiten IMAC wurden mit einem 50 kDa Konzentrator aufkonzentriert und auf eine der in Tabelle 4.8 angegebenen Gelfiltrationssäulen injiziert.

In Abbildung 6.5A ist das Elutionsprofil einer Gelfiltration in GF1-Puffer (50 mM Tris pH 8, 75 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 0,1 % Fos12) mit dem entsprechenden SDS-Gel der einzelnen Fraktionen dargestellt. Während das Totvolumen der Säule 8 mL beträgt, eluierte das Protein als einzelner symmetrischer Peak ab einem Retentionsvolumen von etwa 10 mL mit einem Absorptionsmaximum bei 13,5 mL. Dieses Laufverhalten entspricht laut Herstellerangaben dem eines löslichen Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 160-200 kDa.



## Ergebnisse



**Abbildung 6.5: Größenausschluss-Chromatographie von mFI in Fos12.** **A** Analytische SEC (Superdex 200, 10/300 pg) in GF1-Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 75 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 0,1 % Fos12). In schwarz ist die Proteinabsorption bei 280 nm dargestellt, die gegen das Retentionsvolumen aufgetragen wurde. **B** Mit derselben Probe wurde unter gleichen Bedingungen nach 28 Tagen Inkubation bei 4 °C eine SEC durchgeführt. Das Auftragen der normalisierten Absorption gegen das Retentionsvolumen verdeutlicht eine Linksverschiebung des Peaks nach 28 Tagen. **C, D** SDS-Gele (12 %-ig) der gesammelten Fraktionen nach Coomassie-Färbung. Die Proteinkonzentration der Proben wurde vor dem Auftragen auf 2 mg/mL eingestellt.

Aufgrund der SDS-resistenten Oligomere lässt sich ein Vorliegen von mFI in verschiedenen Oligomierzuständen vermuten, was die Banden bei 17, 35 und 60 kDa andeuten (Abbildung 6.5C). Zur Überprüfung der für die Kristallisation wichtigen Stabilität des Proteins wurde mit einer mFI-Probe nach einer Inkubationszeit von 28 Tagen bei 4 °C eine erneute SEC durchgeführt. Der Vergleich mit der frischen Probe (Tag 1) zeigt bei gleichem Elutionsvolumen eine Verlagerung des Peaks nach links. Das SDS-Gel in Abbildung 6.5D zeigt weiterhin klare Banden bei 17, 35 und 60 kDa, was die hohe Stabilität des Proteins über einen längeren Zeitraum beweist, jedoch zeigen sich stärker undefinierte Banden von höherem Molekulargewicht, die auf eine leichte Aggregation des Proteins zurückzuführen sind. Das gereinigte Protein wurde entweder direkt verwendet oder bei 4 °C gelagert. Das Schockfrieren und die Lagerung bei -80°C wurde wegen der Unklarheit, ob der Prozess des Einfrierens dem Protein schadet, vermieden.

Trotz der teilweisen Koelution der verschiedenen Oligomere wurden sie möglichst getrennt, sodass in der Regel der vordere und der hintere Teil des Peaks separat aufkonzentriert wurde. Ein 60 g Zellpellet erbrachte eine Proteinausbeute zwischen 12 und 20 mg, was einer Ausbeute von etwa 2,6-4,4 mg/L Expressionskultur entspricht.

Durch Änderung der Pufferzusammensetzung, insbesondere durch Änderung des pH-Wertes, der Salzkonzentration und -Art, der Detergenzkonzentration und -Art, der Konzentration und Art des Reduktionsmittels und durch Zugabe verschiedener Additive sollte die Oligomerbildung

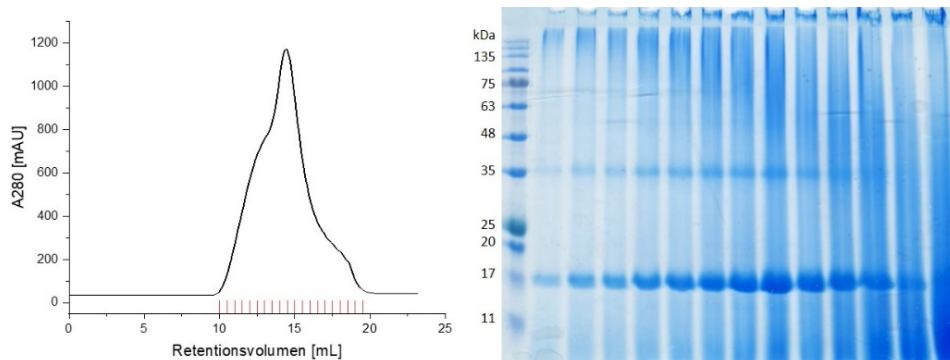
verhindert oder ein Oligomierzustand erhalten werden. Jedoch änderte sich weder das Elutionsprofil der SEC noch das Laufverhalten im SDS-Gel. Beispiele hierzu finden sich in Kapitel 12.6 (Abbildung 12.7).

Grundsätzlich lässt sich 6xHis-SUMO-mFI-StrepII ebenfalls gut reinigen, weist aber besonders im für die Kristallisation notwendigen aufkonzentrierten Zustand eine geringe Stabilität auf, was sich durch rasches Ausfallen des Proteins zeigt. Die Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII ist in Abbildung 12.3 gezeigt.

### 6.2.3 Rekonstitution von mFI-StrepII in PMAL-C8

Die Membrenumgebung spielt eine essenzielle Rolle für Membranproteine, weshalb die Untersuchung der Proteine in ihrer nativen Umgebung bevorzugt wird (Wang & Tonggu, 2015). Zur Rekonstitution von Membranproteinen gibt es verschiedene Strategien. Für mFI erfolgte die Rekonstitution testweise in Diisobutylmaleinsäure (DIBMA) (siehe Kapitel 12.5), Poly-(maleinsäureanhydrid-alt-1-decen) substituiert mit 3-(Dimethylamino) Propylamin (PMAL-C8), in Proteoliposomen und Nanodiscs.

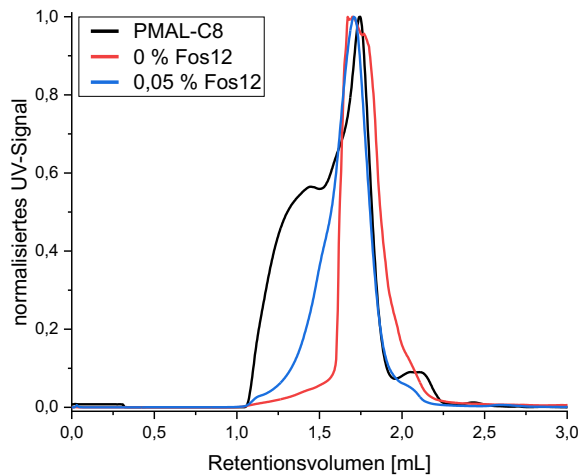
Die Rekonstitution in Amphipol erfolgte, wie in Kapitel 5.6.1 beschrieben. In der nach der Rekonstitution durchgeführten SEC sollte eventuell vorhandenes PMAL-C8 oder Fos12 aus der Probe entfernt werden. Proben der Peakfraktionen wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt (Abbildung 6.6). Die Methanol-Chloroform-Extraktion sollte das Schmieren der Banden verhindern, weshalb sich klar definierte Banden von mFI bei 17 kDa und 35 kDa zeigen.



**Abbildung 6.6: SEC von mFI rekonstituiert in PMAL-C8.** Analytische Größenausschluss-Chromatographie (Superdex 200, 10/300 pg) in GF-Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 75 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP). In schwarz ist die Proteinabsorption bei 280 nm dargestellt, die gegen das Retentionsvolumen aufgetragen wurde. Die gesammelten Fraktionen sind rot markiert. Rechts ist das 12 %-ige SDS-Gel der gesammelten Fraktionen nach Methanol-Chloroform-Extraktion nach Coomassie-Färbung abgebildet.

Abbildung 6.7 zeigt eine Übereinstimmung des klaren Peaks beim Elutionsprofil von mFI in PMAL-C8 mit dem Peak von mFI in 0,05 % Detergenz sowie von mFI ohne Detergenz. Somit handelt es sich bei diesem Peak um nicht rekonstituiertes Protein, bei dem unklar ist, ob dieses in Detergenz solubilisiert oder frei vorliegt. Im Bereich der Schulter handelt es sich eher um Aggregate. Die Rekonstitution in Amphipol war demnach wahrscheinlich nicht erfolgreich.

## Ergebnisse



**Abbildung 6.7: Analytische SEC von mFI auf einer Superdex 200, 5/150 pg-Säule.** In schwarz ist das Elutionsprofil von mFI in PMAL-C8 in 25 mM NaAc pH 4,5, 75 mM KCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM TCEP dargestellt, in blau das Elutionsprofil von mFI in 25 mM NaAc pH 4,5, 75 mM KCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM TCEP ohne Detergenz und in rot das Elutionsprofil in 25 mM NaAc pH 4,5, 75 mM KCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,05 % Fos12 und 1 mM TCEP. Es wurde die normalisierte Absorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen.

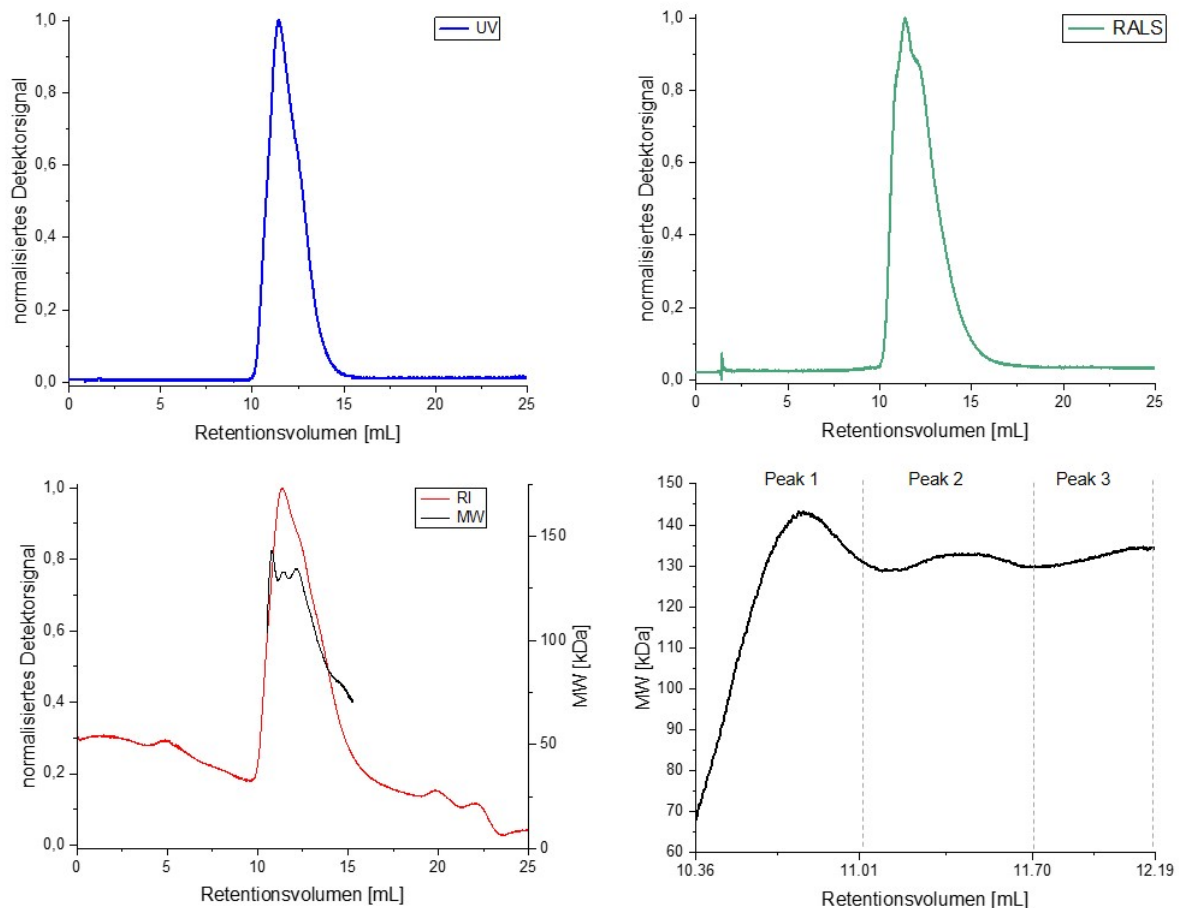
### 6.2.4 Molekulargewichtsbestimmung von mFI

mFI eluiert bei der SEC deutlich früher als es bei einer Größe von 19,3 kDa zu erwarten wäre und bildet zudem SDS-resistente Oligomere, was darauf hinweist, dass auch das rekombinant hergestellte mFI-Protein wie dFwe (Yao et al., 2009) zur Bildung von Oligomeren in der Lage ist.

#### 6.2.4.1 Molekulargewichtsbestimmung von mFI in Fos12

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von mFI wurde eine analytische SEC in Kombination mit einer Rechtwinkel-Lichtstreuung (RALS)- und einer Brechungsindex (RI)-Messung durchgeführt. Die Probe wurde auf eine nur bis zu einem Molekulargewicht von 75 kDa auftrennende Superdex 75-Säule aufgetragen. Während der UV-Detektor einen einzelnen Peak aufzeichnete, zeigte das RALS-Signal das Vorhandensein von drei Peaks mit Maxima bei 10,67 mL, 11,36 mL und 11,94 mL (Abbildung 6.8). Für den mFI-Detergenz-Komplex konnte für den ersten Peak ein Molekulargewicht von 141 kDa, für den zweiten sowie den dritten ein Molekulargewicht von 133 kDa bestimmt werden. Wider Erwarten kam es nicht zur Elution von freien Fos12-Mizellen, wofür der Grund die Verwendung einer Fos12-Konzentration nur knapp oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) sein könnte. Das leicht abweichende Molekulargewicht in den einzelnen Peaks deutet auf unterschiedliche Mengen gebundenes Detergenz hin. Für die Fos12-Mizelle wurde ein Molekulargewicht von rund 12 kDa berechnet (Lafontaine, 2017). Somit liegt mFI in allen drei Peaks abzüglich des Molekulargewichts der Detergenzmizelle im Durchschnitt als Hexamer mit einem theoretischen Molekulargewicht von 117,6 kDa (nach ProtParam, Gasteiger et al., 2003) und in den einzelnen Peaks monodispers vor ( $M_w/M_n \sim 1$ ).



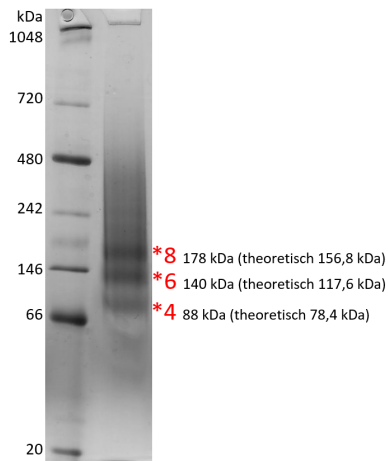


	mFI-StreptII in 0,05 % Fos12			
	gesamt	Peak 1	Peak 2	Peak 3
<b>Retentionsvolumen [mL]</b>	11,36	10,67	11,36	11,94
<b>Mn [kDa]</b>	134,37	140,58	133,31	132,72
<b>Mw [kDa]</b>	134,88	140,97	133,33	132,77
<b>Polydispersität [Mw/Mn]</b>	1,004	1,003	1,000	1,000
<b>MW Monomer</b>	19,6			

**Abbildung 6.8: Molekulargewichtsbestimmung von mFI in Fos12 in Anwesenheit von Calcium durch SEC mit RI- und RALS-Messung.** 25  $\mu$ L gereinigtes mFI (20 mg/mL) wurden auf eine Superdex 75, 10/300 pg-Säule, die mit GF-Puffer (25 mM NaAc pH 4,6, 75 mM KCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM DTT, 0,05 % Fos12) äquilibriert war, injiziert. Es wurden die normalisierten Detektorsignale gegen das Retentionsvolumen aufgetragen, wobei das Signal des UV-Detektors in blau, das Signal des RI-Detektors in rot und das Signal des RALS-Detektors in grün dargestellt ist. Die schwarze Linie repräsentiert das berechnete Molekulargewicht. In der Tabelle sind die Molekulargewichte der einzelnen Peaks aufgeführt. Das angegebene Retentionsvolumen entspricht der Mitte des Peaks.

Bei den berechneten Molekulargewichten handelt es sich um den Durchschnitt verschiedener Oligomere, was sich nach der Durchführung einer nativen Gelelektrophorese verdeutlichte (Abbildung 6.9). Es zeigen sich Banden bei 88, 140 und 178 kDa, woraus sich ein durchschnittliches Molekulargewicht von 135 kDa ergibt, was exakt dem mit durch SEC in Kombination mit RALS- und RI-Detektion berechnetem Molekulargewicht über den gesamten Peak übereinstimmt. Daraus ergibt sich, dass mFI in verschiedenen Oligomerzuständen vorliegt, wobei es sich um ein Tetramer, Hexamer und Oktamer handeln könnte.

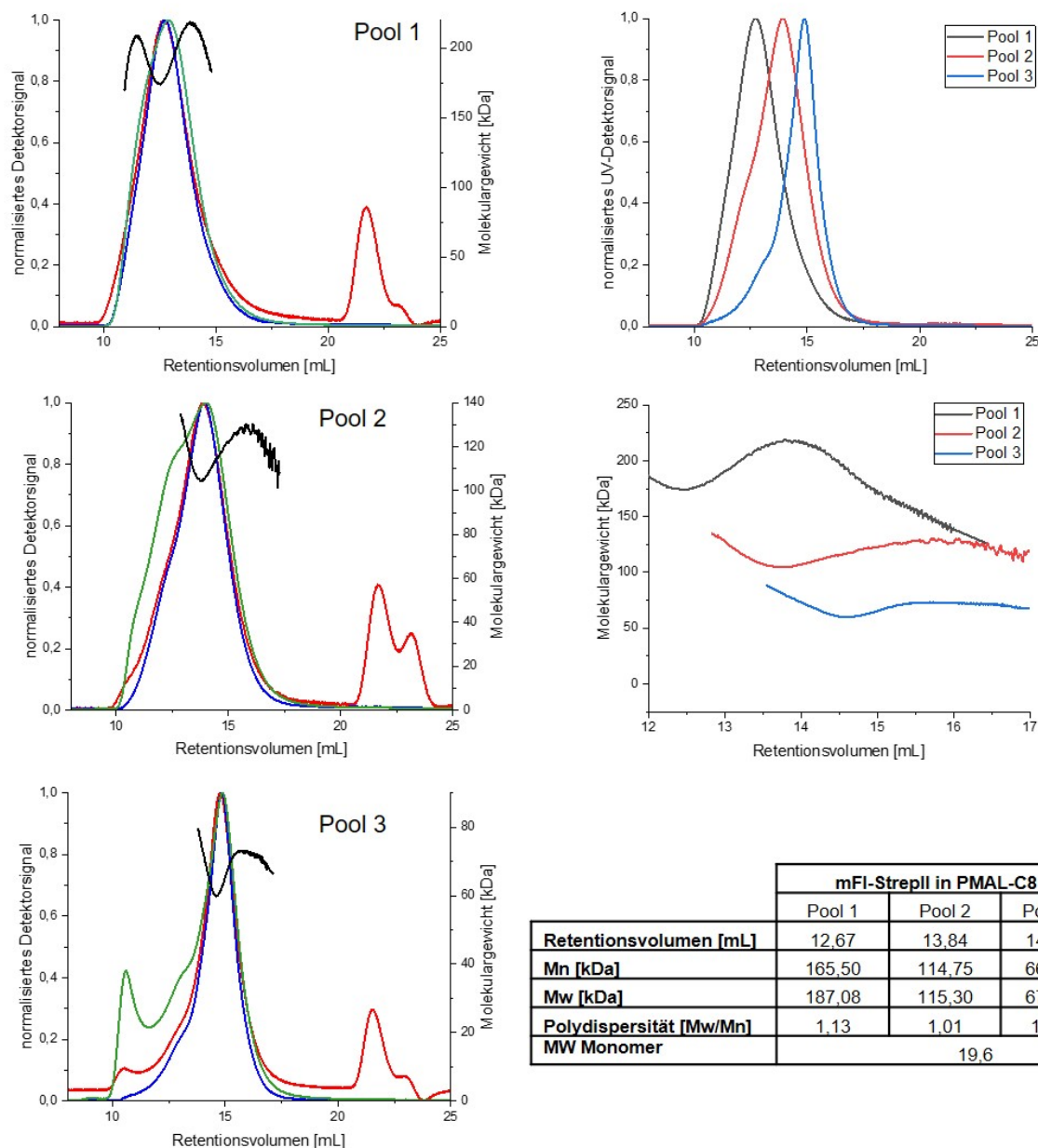
## Ergebnisse



**Abbildung 6.9: Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese von mFI in Fos12.** MFI wurde auf ein 4-16 %-iges Bis-Tris-Gradientengel aufgetragen, bei 150 Volt für etwa zwei Stunden aufgetrennt und nach dem Fixieren mit Coomassie-Blau gefärbt.

### 6.2.4.2 Molekulargewichtsbestimmung von mFI-StreptII in PMAL-C8

Zur Überprüfung des Oligomerisierungsgrades von in PMAL-C8 rekonstituiertem mFI wurde ebenfalls eine SEC in Kombination mit einer Rechtwinkel-Lichtstreuung (RALS)- und einer Brechungsindex (RI)-Messung durchgeführt. Da sich bei einer ersten präparativen SEC drei Peaks auftrennten (Abbildung 12.4), wurden diese jeweils vereinigt, aufkonzentriert und getrennt injiziert. Die aufkonzentrierten Peakfraktionen wurden nacheinander auf eine Superdex 200-Säule (10/300 pg) aufgetragen und eine SEC in Kombination mit einer RI- und RALS-Messung durchgeführt (Abbildung 6.10). Für Pool 1 aus dem vorderen Teil des Peaks wurde ein Molekulargewicht von 187 kDa berechnet, wobei rekonstituiertes Protein vorliegen sollte. PMAL-C8 hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 18,5 kDa, wobei unbekannt ist, wie viele Polymere sich um das Protein lagern. Für Pool 2 wurde ein Molekulargewicht von 115 kDa bestimmt, wobei es sich um ein Hexamer handeln könnte. Wie die Chromatogramme in Abbildung 6.7 zeigen, handelt es sich hierbei vermutlich um nicht-rekonstituiertes Protein. Das Protein in Pool 3 hat ein Molekulargewicht von 67 kDa und könnte einem Trimer entsprechen.

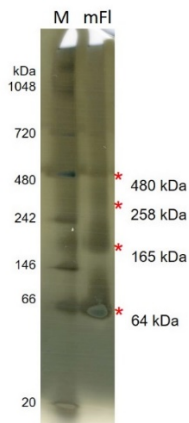


**Abbildung 6.10: Molekulargewichtsbestimmung von mFI in PMAL-C8 durch SEC mit RI- und RALS-Messung.** Vereinigte Peakfraktionen (Pools) von in PMAL-C8 rekonstituiertem mFI-StreptII (150  $\mu$ L, 10 mg/mL) wurden auf eine Superdex 200 10/300 pg-Säule, die mit GF-Puffer (50 mM Tris pH 8, 75 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP) äquilibriert war, injiziert. Es wurden die normalisierten Detektorsignale gegen das Retentionsvolumen aufgetragen, wobei das Signal des UV-Detektors in blau, das Signal des RI-Detektors in rot und das Signal des RALS-Detektors in grün dargestellt ist. Die schwarze Linie repräsentiert das berechnete Molekulargewicht. In der Tabelle sind die Molekulargewichte der einzelnen Peaks angegeben. Das angegebene Retentionsvolumen entspricht der Mitte des Peaks. Rechts dargestellt sind übereinander gelagert das normalisierte UV-Detektorsignal und das Molekulargewicht von Pool 1 bis 3.

Eine konzentrierte mFI-Probe in PMAL-C8 wurde vor der SEC in einer nativen PAGE aufgetrennt (Abbildung 6.11). MFI liegt wie in Fos12 in verschiedenen Oligomierzuständen vor, jedoch vorwiegend als Trimer mit 64 kDa und als Oktamer mit 165 kDa sowie in höheren Oligomeren. Trotz Methanol-Chloroform-Extraktion der Probe sind die Banden verschmiert, sodass sich die oberen Molekulargewichte nicht eindeutig zuordnen lassen. Eine weitere Bande bei 480 kDa ist erkennbar. Die aus der nativen PAGE abgelesenen Molekulargewichte

## Ergebnisse

von 64 und 165 kDa entsprechen den durch die Dreifach-Detektion berechneten Molekulargewichten für Pool 1 und 3, womit mFI hier als Trimer und Oktamer vorliegen könnte.



**Abbildung 6.11: Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese von mFI in PMAL-C8.** mFI wurde auf ein 4-16 %-iges Bis-Tris-Gradientengel aufgetragen, bei 150 Volt für etwa zwei Stunden aufgetrennt und nach dem Fixieren mit Silber gefärbt. M = Marker.

### 6.2.5 Bestimmung eines Oberflächenmodells von mFI-StreptII

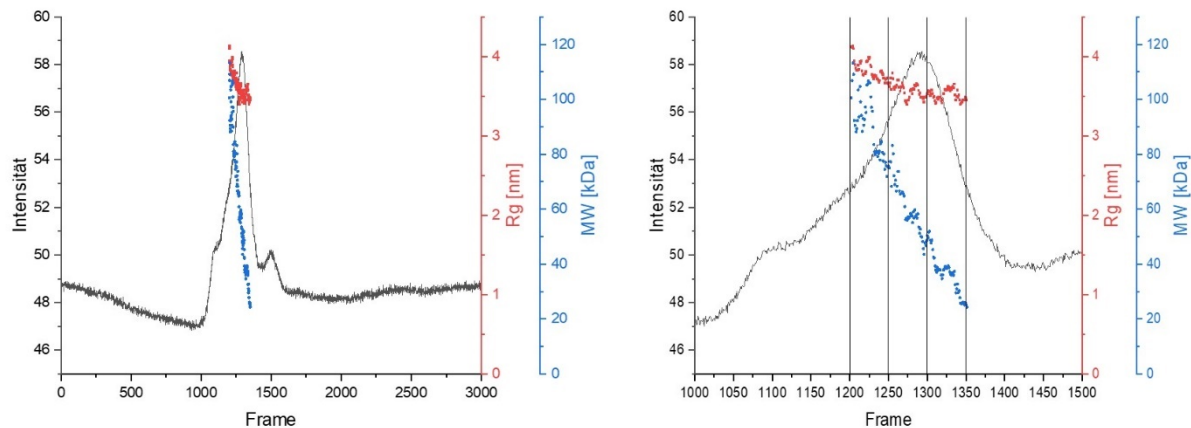
Zur weiteren Untersuchung des Oligomerezustandes von mFI sowie zum Erhalt struktureller Parameter und eines Oberflächenmodells wurden Kleinwinkelröntgenstreuungs-(SAXS)-Experimente in Kombination mit einer *High-Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) durchgeführt. Statische SAXS-Messungen sind aufgrund der verschiedenen Oligomerezustände von mFI und des Detergenz nicht möglich.

#### 6.2.5.1 HPLC-SAXS von mFI-StreptII in Fos12

Das im Folgenden dargestellte SAXS-Experiment wurden mit der gleichen mFI-Probe aus Kapitel 6.2.4.1 mit einem berechneten durchschnittlichen Molekulargewicht von 135 kDa durchgeführt.

90  $\mu$ L mFI (15 mg/mL) wurden auf eine Superdex 75 10/300 pg-Säule injiziert, die zuvor mit Puffer (25 mM NaAc pH 4,6, 75 mM KCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM DTT, 0,05 % Fos12) äquilibriert wurde. Die Flussrate betrug 1 mL/min bei einer Aufnahme von 3000 Frames (1 s/Frame). Die Auswertung erfolgte mit den Atsas-Versionen 2.8.4 und 3.1.1 (Franke et al., 2017; Manalastas-Cantos et al., 2021).

Der Gyrationsradius weist nach der Auswertung mit dem Programm CHROMIXS einen leicht U-förmigen Verlauf auf (Abbildung 6.12). Das Molekulargewicht fällt im Verlauf des Peaks stark von etwa 120 kDa auf 20 kDa ab, was erneut das Vorhandensein verschiedener Oligomerezustände zeigt.

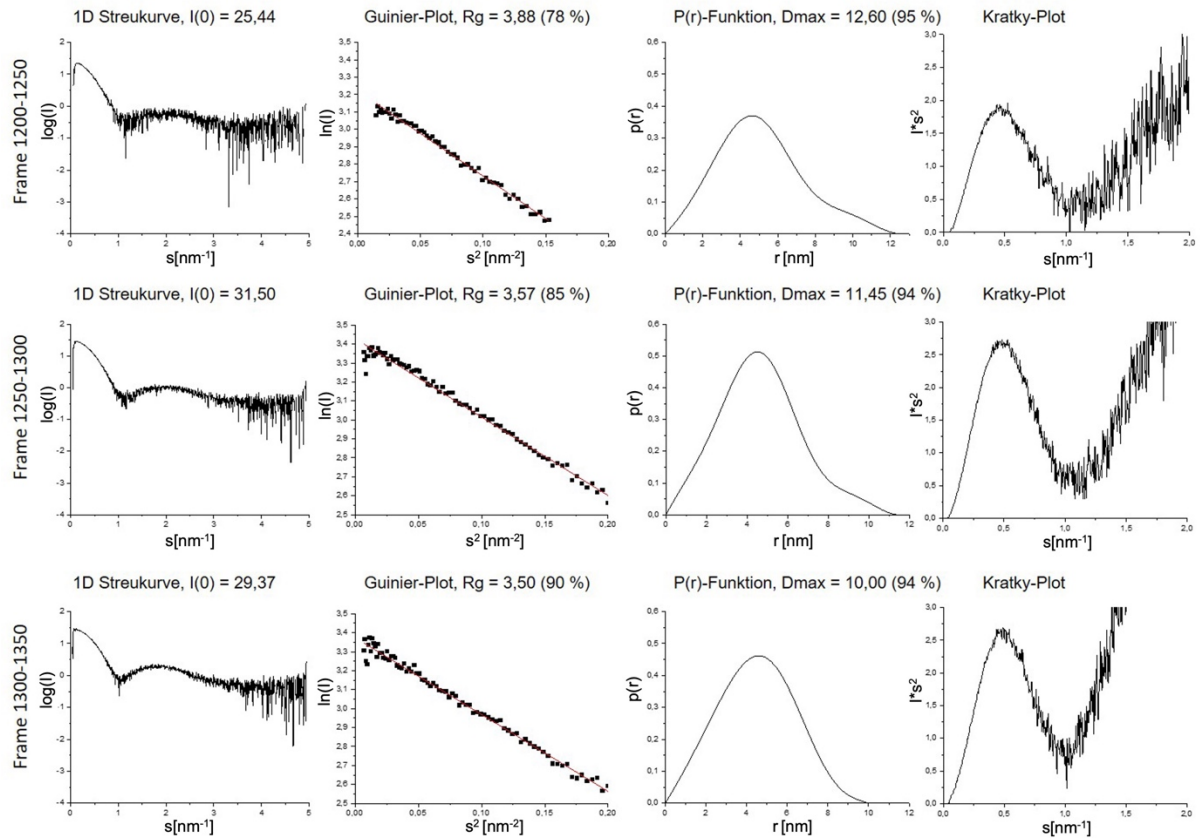


**Abbildung 6.12: Auswertung der HPLC-SAXS-Messung von mFI in Fos12 mit dem Programm CHROMXIS (Panjkovich & Svergun, 2018) der Atsas-Suite (Franke et al., 2017).** Auftragung der durchschnittlichen Streuintensität (willkürliche Einheit) gegen die Frame-Zahl. In schwarz ist die durchschnittliche Streuintensität gezeigt, in rot der Gyrationradius  $R_g$  und in blau das Molekulargewicht. Rechts ist eine vergrößerte Ansicht dargestellt und die zur Auswertung ausgewählten Frames sind durch senkrechte Linien markiert.

Für eine möglichst gute Trennung der Oligomere wurde der sehr scharfe Streuintensitätspeak unterteilt und der vordere (Frame 1200-1250), der mittlere (Frame 1250-1300) und der hintere Teil (Frame 1300-1350) getrennt ausgewertet. Nach Subtraktion der Puffer-Frames (Frame 600-782) wurden die entsprechenden Frames skaliert und gemittelt. Die daraus resultierenden Streukurven (Abbildung 6.13, linke Spalte) wurden für die weiteren Auswertungen verwendet. Zur Erstellung der  $P(r)$ -Funktion wurden die Daten bei etwa  $1,4 \text{ nm}^{-1}$  geschnitten, um den Einfluss des Detergenz zu minimieren und eine bessere Datenqualität zu erreichen.

In Abbildung 6.13 sind die aus PRIMUS (Konarev et al., 2003) erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Die Qualität der Daten ist sehr gut, wobei die Zuverlässigkeit für die  $P(r)$ -Funktion, aus der die initialen Modelle berechnet werden, mit 94-95 % angegeben wird. Die Guinier-Plots verlaufen linear und die  $P(r)$ -Funktionen nähern sich für  $r = D_{\text{max}}$  langsam 0 an. Der Gauß-ähnliche Verlauf der Kratky-Plots bei kleinen Winkeln bestätigt die Faltung des Proteins. Der Anstieg bei größeren Winkeln weist auf flexible Bereiche oder eine nicht optimale Subtraktion des Puffers hin.

## Ergebnisse



**Abbildung 6.13:** Streukurven, P(r)-Funktion, Guinier- und Kratky-Plot der HPLC-SAXS-Daten von mFI in Fos12 der Frames 1200-1250 (oben), 1250-1300 (mitte) und 1300-1350 (unten). Die Messungen erfolgten an der BM29 am ESRF. Die Auswertung erfolgte mit PRIMUS (Konarev et al., 2003). Für alle Guinier-Fits gilt  $R^2 > 0,99$ .

Die berechneten Parameter sind in Tabelle 6.2 aufgeführt. Die geringste Intensität weist der vordere Teil des Peaks (Frame 1200-1250) mit 25,44 auf. Es wurde ein  $R_g$  von 3,88 nm berechnet. Aus der Paarverteilungsfunktion ergab sich eine maximale Ausdehnung der Partikel  $D_{max}$  von 12,6 nm. In der Mitte des Peaks (Frame 1250-1300) betrug die mittlere Streuintensität 31,5. Der Gyrationradius liegt bei 3,57 nm und die maximale Ausdehnung der Partikel beträgt 11,45 nm. Im hinteren Teil des Peaks (Frame 1300-1350) beträgt die Streuintensität 29,37. Es wurde ein Gyrationradius von 3,5 nm und eine maximale Partikelausdehnung von 10 nm berechnet. Der  $R_g$  im reziproken und realen Raum weichen nur leicht voneinander ab.

**Tabelle 6.2: Guinier-Analyse, Paarverteilungs-Analyse und Berechnung des Molekulargewichtes.** Es wurde angenommen, dass  $V_p/1,6 = MW$  (Korasick & Tanner, 2018). Die Auswertung erfolgte mit PRIMUS (Konarev et al., 2003) und weiteren Programmen der Atsas Suite (Franke et al., 2017; Petoukhov et al., 2012).

	Frame 1200-1250	Frame 1250-1300	Frame 1300-1350
<b>Guinier-Analyse</b>			
I(0)	$25,4 \pm 0,15$	$31,5 \pm 0,13$	$29,4 \pm 0,13$
R <sub>g</sub> (nm)	$3,88 \pm 0,15$	$3,57 \pm 0,04$	$3,50 \pm 0,21$
qR <sub>g</sub> Bereich	0,57 - 1,30	0,47 - 1,30	0,36 - 1,29
Punkte	24 - 64	21 - 70	15 - 71
Qualität	78 %	85 %	90 %
V <sub>p</sub> (nm <sup>3</sup> )	215	102	51
Korrelationskoeffizient R <sup>2</sup>	0,9890	0,9928	0,9908
<b>P(r)-Analyse</b>			
I(0)	25,64	31,67	29,22
R <sub>g</sub> (nm)	3,95	3,61	3,45
D <sub>max</sub> (nm)	12,60	11,45	10,00
q Bereich (nm <sup>-1</sup> )	0,15 - 1,46	0,13 - 1,44	0,11 - 1,21
Qualität	0,95	0,94	0,94
V <sub>p</sub> (nm <sup>3</sup> )	336	261	276
<b>Molekulargewicht [kDa]</b>			
V <sub>p</sub> (R <sub>g</sub> )	134	64	32
V <sub>p</sub> (P(r)) (Datporod)	209	163	172
Size&Shape (Primus)	160	121	91
Datmow	171	146	151
Datvc	159	113	67
<b>Ambimeter</b>			
Ambiguitäts-Wert	0,6990	0,8451	1,3421
Anzahl kompatibler Form-Kategorien	5	7	22

Das Programm Ambimeter vergleicht basierend auf der durch GNOM (Svergun, 1999) geglätteten Streukurve Topologieformen aus einer Bibliothek normalisierter Streukurven, wählt den Kurven entsprechende Formen aus und liefert einen Ambiguitätswert (Petoukhov & Svergun, 2015). Ein Wert unter 1,5 garantiert eine einzigartige Bestimmung eines ab-initio Oberflächenmodells, was die vorliegenden Daten gewährleisten.

Die mit unterschiedlichen Programmen berechneten Molekulargewichte weichen stark voneinander ab, weshalb die Art der Oligomerformen nicht eindeutig ist. Zudem ist die durch das Protein gebundene Fos12-Menge unbekannt.

Da auch keine Informationen über die Symmetrie von mFI vorliegen, wurden zunächst ab-initio Modelle ohne Symmetrie (P1) mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) berechnet. Wegen der unbekannten Form wurden jeweils 20 längliche (*prolate*, p), flache (*oblate*, o) und Modelle ohne Anisometrie (*unknown*, u) berechnet (Tabelle 6.3), die anhand des ICP (*iterative closest point*) Algorithmus ausgewählt wurden (Besl & McKay, 1992). Chi<sup>2</sup> gibt die Diskrepanz zwischen den experimentellen und den berechneten Kurven an und soll zwischen 0,9 und 1,1 liegen. DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003) sortiert zueinander ähnliche Modelle in Cluster.



## Ergebnisse

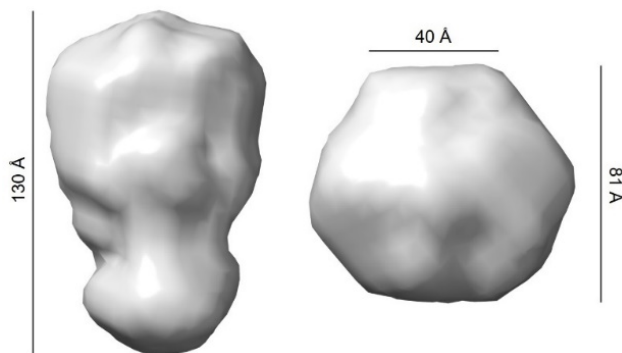
**Tabelle 6.3: DAMMIF-Ergebnisse (Atsas 3.1.1).** Es wurden jeweils 20 Modelle mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) berechnet. Unter der Spalte Cluster ist die Anzahl der Modelle im größten Cluster angegeben. Der  $\chi^2$ -Wert bezieht sich auf das repräsentativste Modell des größten Clusters und soll zwischen 0,9 und 1,1 liegen. Es sind die maximale Ausdehnung des repräsentativsten Modells und die Auflösung des größten Clusters angegeben. Der aus der Streukurve bestimmte  $D_{\max}$  liegt für Frame 1200-1250 bei 12,60 nm, für Frame 1250-1300 bei 11,45 nm und für Frame 1300-1350 bei 10,00 nm. Das Molekulargewicht in kDa entspricht dem DAM-Volumen durch den Faktor 2 geteilt (Manalastas-Cantos et al., 2021).

Frame	Symmetrie	Auflösung [Å]	Cluster	ICP	$\chi^2$	$D_{\max}$ [nm]	[kDa]
1200-1250	P1 u	19,8	14	11,48 (11,69)	0,980	13,65	188
	P1 o	19,8	18	7,62 (6,29)	0,980	13,60	187
	P1 p	18,6	16	6,95 (5,95)	0,979	13,40	191
1250-1300	P1 u	22,6	7	8,73 (3,58)	1,125	11,99	107
	P1 o	22,6	12	12,88 (9,60)	1,124	11,90	107
	P1 p	25,4	12	11,34 (5,21)	1,126	11,97	107
1300-1350	P1 u	17,3	4	3,49 (0,21)	1,015	10,25	163
	P1 o	17,5	5	3,44 (0,21)	1,015	10,26	163
	P1 p	19,5	7	4,12 (0,31)	1,015	10,27	161

Auch nach Berechnung von 20 Modellen in P1 kann keine Form eindeutig identifiziert werden. Für Frame 1200-1250 deutet es auf Grundlage der ICP-Werte auf eine längliche, prolata Form hin. Ein weiterer Hinweis ist, dass für Frame 1200-1250 der  $D_{\max}$  für die prolata Form am nächsten am durch die P(r)-Funktion bestimmten  $D_{\max}$  liegt.

### Ab-initio Modell Frame 1200-1250

Zuerst erfolgte die Verfeinerung des *damstart*-Modells in P1 prolata mit DAMMIN (Svergun, 1999). Dabei wurde das *damstart*-Modell aus dem durch DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003) bestimmten Cluster 1 mit 16 von 20 Modellen verwendet. Die Verfeinerung mit diesem Modell als Suchvolumen führte zu einem initialen Modell mit einem Volumen von 368416 Å<sup>3</sup> (184 kDa), was als Anhaltspunkt für die Bestimmung der Symmetrie verwendet wurde. Das  $\chi^2$  von 0,978 bestätigt eine Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem berechneten Modell. Das in Abbildung 6.14 dargestellte Oberflächenmodell hat eine Ausdehnung von 130 x 81 Å.



**Abbildung 6.14: Ab-initio Oberflächenmodell von mFI ohne Symmetrie für Frame 1200-1250.** Das Modell wurde mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) erstellt und mit DAMMIN (Svergun, 1999) verfeinert. Abgebildet ist die mit ChimeraX erstellte Dichtekarte, deren Auflösung 22 Å beträgt, was der Auflösung des Clusters entspricht

Die in Tabelle 6.2 angegebenen berechneten Molekulargewichte für Frame 1200-1250 liegen zwischen 160 und 200 kDa. Durch die an eine RI- und RALS-Messung gekoppelte SEC und eine native PAGE wurde ermittelt, dass Flower als Tetramer, Hexamer und Oktamer vorliegen



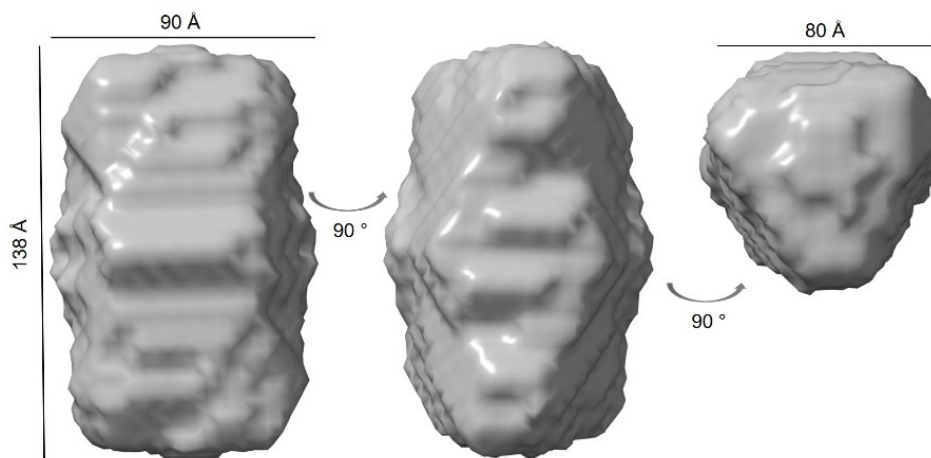
kann (Kapitel 6.2.4.1). Daher wurden anschließend mit den Symmetrien, die zu den berechneten Molekulargewichten, möglichen Oligomierzuständen oder möglichen Symmetrien passen, jeweils 20 DAMMIF Modelle (Franke & Svergun, 2009) mit ASTAS 3.1.1 (Manalastas-Cantos et al., 2021) berechnet (Tabelle 12.3). Tendenziell liefert die längliche Form (p) die besseren ICP-Werte. Es wurden die Modelle ausgewählt, welche die beste Statistik zeigten und aus dem größten durch DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003) bestimmten Cluster stammten. Die mit ChimeraX erstellten Dichtekarten dieser Modelle wurden untereinander und mit dem Modell ohne Symmetrie (P1) in ChimeraX (Pettersen et al., 2004) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.4 aufgeführt.

**Tabelle 6.4: Vergleich von ab-initio Modellen für Frame 1200-1250 mit verschiedenen Symmetrien.** Die Korrelation der Dichtekarten wurde in ChimeraX (Pettersen et al., 2004) untersucht, ausgehend von der P1 Dichtekarte ohne Symmetrie. Es ist das DAM-Volumen und der  $D_{\max}$  des repräsentativsten Modells des größten Clusters aus DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003) angegeben. Die beste Übereinstimmung mit der P1 p Dichtekarte liefern die Symmetrien P3 (grün markiert) und P32 (hellgrün markiert).

Dichte -karte	Korrelation							V [nm <sup>3</sup> ]	D <sub>max</sub> [nm]
	P1 p	P3 p	P4 p	P5 p	P32 p	P7 p	P8 p		
P1 p	1	0,9837	0,9049	0,9050	0,9505	0,9003	0,9111	381	13,35
P3 p	0,9845	1	0,9031	0,9798	0,9529	0,9831	0,9787	386	13,24
P4 p	0,8964	0,9003	1	0,9922	0,9720	0,9950	0,9946	409	13,24
P5 p	0,9035	0,9786	0,9920	1	0,9757	0,9951	0,9950	397	13,12
P32 p	0,9402	0,9450	0,9670	0,9701	1	0,9673	0,9755	379	13,59
P7 p	0,9006	0,9817	0,9949	0,9952	0,9742	1	0,9976	409	13,22
P8 p	0,9144	0,9785	0,9938	0,9939	0,9809	0,9968	1	416	14,18

Die Dichtekarten der Modelle in P32 und P3 stimmen am besten mit dem Modell ohne Symmetrie überein, weshalb von einem Hexamer mit zwei unterschiedlichen Konformationen ausgegangen wird.

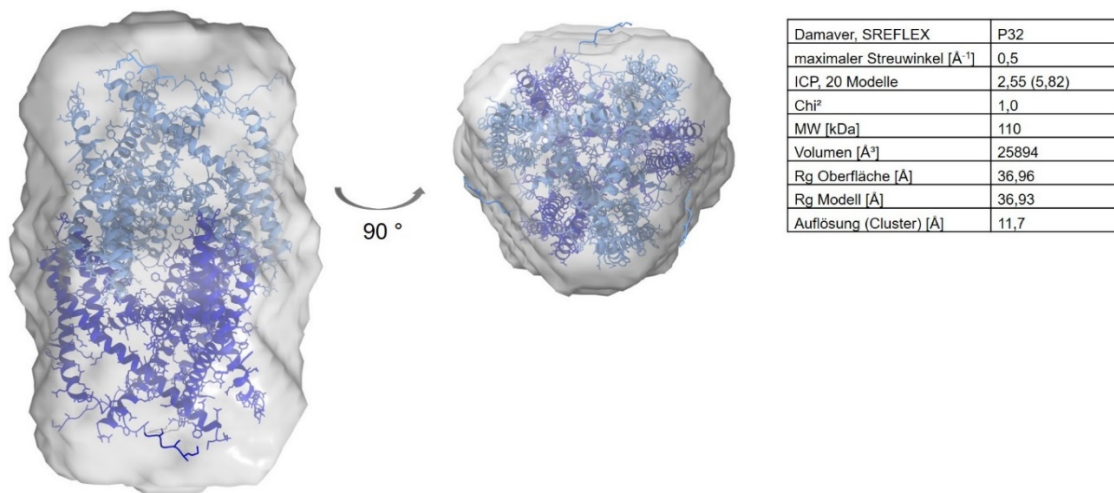
Das DAMMIF-Modell mit P32-Symmetrie mit einer Ausdehnung der Oberfläche von 138 x 90 Å ist in Abbildung 6.15 dargestellt. Die durch DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003) ermittelte Auflösung des Clusters beträgt 11,69 Å.



**Abbildung 6.15: Oberflächenmodell von mFI mit P32-Symmetrie in länglicher Form.** Es wurden 20 DAMMIF-Modelle berechnet (Astas 3.1.1, Franke & Svergun, 2009) und das *damaver*-Modell aus einem Cluster, welches 11 von 20 Modellen enthält, ausgewählt. Abgebildet ist die mit ChimeraX erstellte Dichtekarte, deren Auflösung 12 Å beträgt, was der Auflösung des Clusters entspricht.

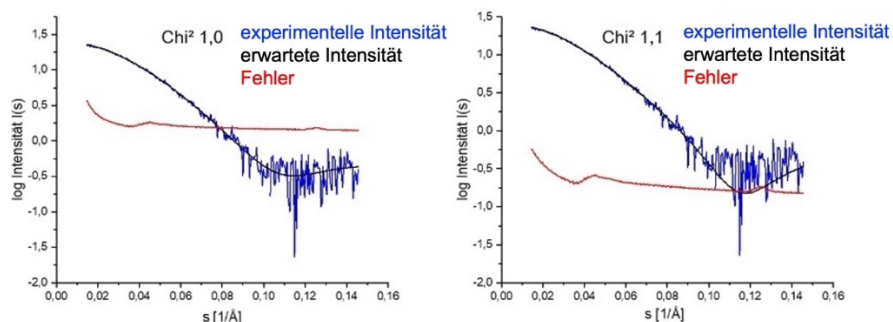
## Ergebnisse

Mit einem AlphaFold-Modell (Jumper et al., 2021) von mFI (AF-Q8BG21-F1) als Alternative zu einer eigentlich benötigten atomaren Struktur wurde ein Strukturmodell erstellt. Hierzu wurden die geschnittene Streukurve von GNOM (Svergun, 1992) und die Programme CORAL (Petoukhov et al., 2012) und SASREF (Petoukhov & Svergun, 2005) verwendet, wobei die Vorgabe einer P32-Symmetrie in SASREF die besten Modelle lieferte. Zur Auswahl kamen Modelle mit dem optimalsten  $\chi^2$ , die am besten in die Dichtekarte des Oberflächenmodells passten, was über die Anzahl an Atomen außerhalb der Kontur beurteilt wurde. Mit SREFLEX (Panjkovich & Svergun, 2016) wurde das beste Modell an die experimentellen Daten angepasst und verbessert. Es ist zu betonen, dass es sich lediglich um eine Strukturvorhersage von mFI handelt und nicht bekannt ist, wie die flexiblen N- und C-Termini und die einzelnen Monomere miteinander interagieren. 0,93 % der Atome liegen außerhalb der Dichtekarte. Das Modell und seine Parameter sind in Abbildung 6.16 dargestellt.



**Abbildung 6.16: Oberflächen- und Strukturmodell von mFI für Frame 1200-1250.** Ein mit SREFLEX verbessertes SASREF-Modell und das Oberflächenmodell aus DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) in P32-Symmetrie wurden mit SUPCOMB übereinandergelegt. Links ist die Vorderansicht gezeigt, rechts die Aufsicht. Das  $\chi^2$  beträgt 1,0. Drei der sechs Monomere sind zur besseren Unterscheidung hellblau gefärbt. In der Tabelle sind die aus CRY SOL und DAMMIF erhaltenen Parameter angegeben. Die Abbildung wurde mit ChimeraX erstellt.

Eine Evaluierung des Modells erfolgte mit CRY SOL (Franke et al., 2017; Svergun et al., 1995). Die Tabelle in Abbildung 6.16 gibt die erhaltenen Daten an. Die experimentell bestimmte Streukurve wurde mit dem erstellten Atommodell verglichen, wobei das  $\chi^2$  des Fits 1,0 beträgt. Mit dem FoXS-Server (Schneidman-Duhovny et al., 2013; 2016) wurde ebenfalls eine theoretische Streukurve des SREFLEX-Modells erstellt (Abbildung 6.17). Das  $\chi^2$  liegt bei 1,1 und der R<sub>g</sub> der theoretischen Streukurve bei 3,68, was leicht unter dem aus dem Guinier-Plot ermittelten R<sub>g</sub> von 3,88 liegt.



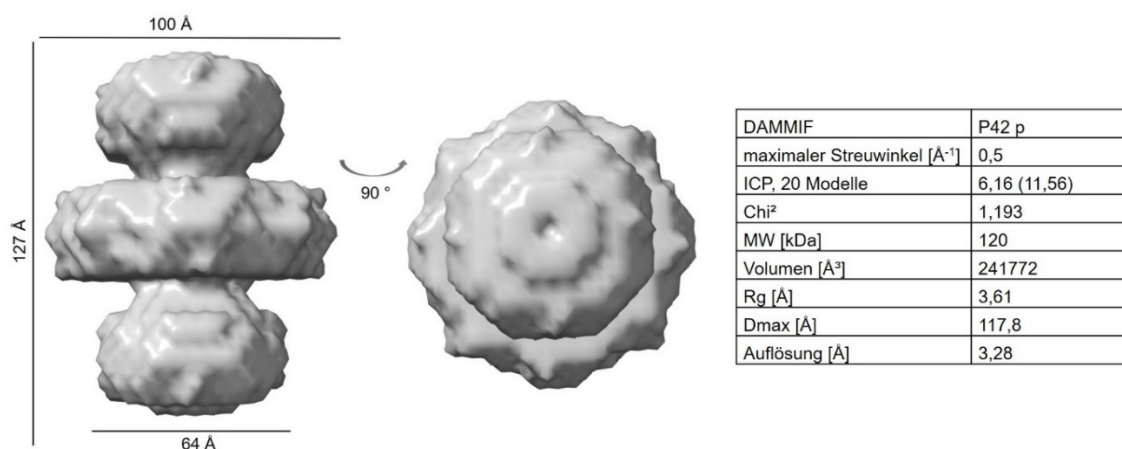
**Abbildung 6.17: Experimentell bestimmte und mit CRY SOL und dem FoXS-Server berechnete theoretische Streukurve des SREFLEX-Modells.** Die erwartete Intensität ist in schwarz dargestellt, die experimentell bestimmte in blau und der Fehler in rot. Die Berechnung mit CRY SOL (links) lieferte ein  $\chi^2$  von 1,0, die mit FoXS (rechts) ein  $\chi^2$  von 1,1.

### Ab-initio-Modell Frame 1250-1300

Zunächst wurden die *damstart*-Modelle der dominantesten Cluster in P1 in unbekannter, flacher und länglicher Form mit DAMMIN (Svergun, 1999) verfeinert, jedoch war anhand der Modelle kein Rückschluss auf eine bevorzugte Form möglich (Tabelle 12.4).

Von verschiedenen in DAMMIF (Atsas 2.8.1, Franke & Svergun, 2009) getesteten Symmetrien wiesen eine P1-, P4- und P42-Symmetrie die beste Statistik auf (Tabelle 12.5). Die Berechnung von 20 Oberflächenmodellen mit DAMMIN in P4- und P42-Symmetrie in länglicher Form führte ebenfalls zur besten Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Daten (Abbildung 12.11). In Abbildung 6.18 ist das aus 17 Modellen gemittelte *damaver*-Modell aus DAMMIF in P42-Symmetrie abgebildet. Das aus dem Volumen erhaltene Molekulargewicht beträgt 120 kDa bei einer maximalen Ausdehnung  $D_{\max}$  von 11,78 nm, was sehr gut zu den experimentell bestimmten Daten passt (Tabelle 6.2). Das Modell hat eine Ausdehnung von 127 x 100 Å.

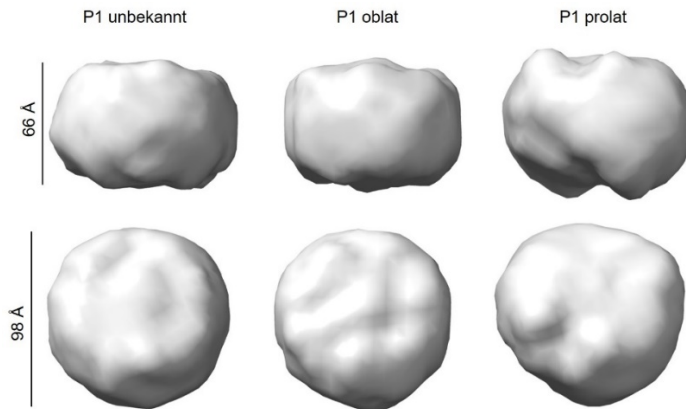
Der Fit von AlphaFold-Monomeren in das Oberflächenmodell ist nicht möglich und führt zu der Vermutung, dass mFI eine andere Topologie aufweist, als AlphaFold sowie andere Server (Tabelle 6.1) vorhersagen.



**Abbildung 6.18: Oberflächenmodell von mFI in P42-Symmetrie für Frame 1250-1300.** Das  $\chi^2$  des Oberflächenmodells beträgt 1,193 und der durchschnittliche ICP 6,16. Das Modell hat nach SASRES (Tuukkanen et al, 2016) eine Auflösung von 3,28 Å, wobei die Karte des Modells mit einer Auflösung von 10 Å abgebildet ist. Das aus dem Volumen berechnete Molekulargewicht beträgt 120 kDa.

### Ab-initio-Modell Frame 1300-1350

Mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) wurden jeweils 20 Modelle in unbekannter, flacher und länglicher Form ohne Symmetrie erstellt (Tabelle 6.3) und die repräsentativsten Modelle der dominantesten Cluster mit DAMMIN (Svergun, 1999) unter Verwendung des *damstart*-Modells verfeinert. Die in Abbildung 6.19 gezeigten Modelle weisen ein  $\chi^2$  von 1,019 und ein aus dem Volumen berechnetes Molekulargewicht von 164 kDa auf.



**Abbildung 6.19: Mit DAMMIN verfeinerte Modelle von mFI in P1 für Frame 1300-1350.** Das Modell wurde mit DAMMIN (Svergun, 1999) aus einem *damstart*-Modell von DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) erstellt. Es ist jeweils die Dichtekarte mit einer Auflösung von 15 Å abgebildet. Das Modell in unbekannter Form hat eine Ausdehnung von 98 x 66 Å, in oblater Form von 93 x 68 Å und in prolater Form von 97 x 76 Å. Die Abbildung wurde mit ChimeraX erstellt.

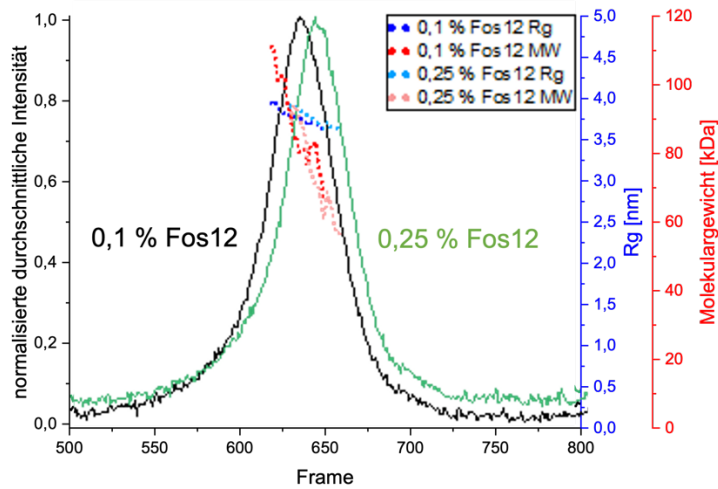
Da sich aus den Modellen ohne Symmetrie keine bevorzugte Anisometrie ablesen lässt, wurden verschiedene Symmetrien und Anisometrien mit DAMMIF (Atsas 2.8.1, 3.2.1, Franke & Svergun, 2009) getestet (Tabelle 12.6), die überwiegend gute Statistiken lieferten, wobei sich jedoch keine eindeutige Symmetrie herauskristallisierte.

#### **6.2.5.2 HPLC-SAXS-Messungen von mFI-StreptII in verschiedenen Fos12-Konzentrationen**

Die HPLC-SAXS-Messung von mFI in 0,05 % Fos12 zeigt eine Zunahme der Detergenzkonzentration mit dem Retentionsvolumen im Verlauf des Peaks, was anhand der 1D-Streukurven in Abbildung 6.13 an der Zunahme der Hügel bei etwa  $2 \text{ nm}^{-1}$  erkennbar ist. Da die aus verschiedenen Bereichen des Peaks stammenden Streukurven auch zu unterschiedlichen Oberflächenmodellen geführt haben, sollte der Einfluss der Fos12-Konzentration auf das Oligomerisierungsverhalten von mFI weiter untersucht werden. So erfolgten neben der Messung in 0,05 % Fos12 (einfache CMC) (Kapitel 6.2.5.1) Messungen in 0,1 % Fos12 (doppelte CMC) und 0,25 % Fos12 (fünffache CMC).

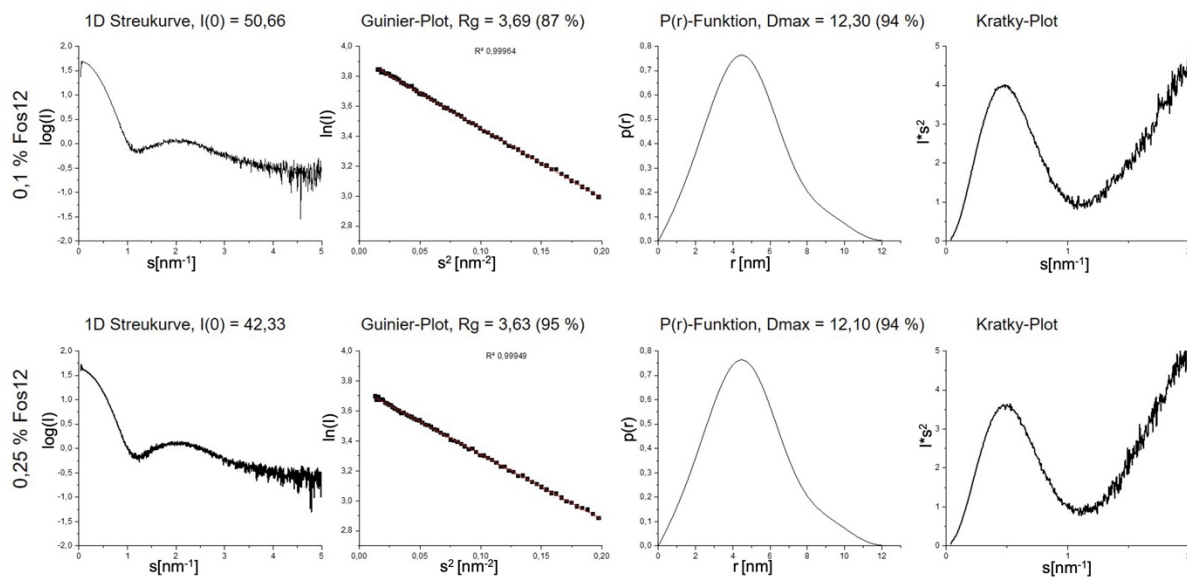
Auf eine mit Puffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM KCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM TCEP, 0,1 bzw. 0,25 % Fos12) äquilibrierte Superdex 200 Increase 5/150 pg-Säule wurden 50  $\mu\text{L}$  mFI (9 mg/mL) injiziert wurden. Bei einer Flussrate von 0,3 mL/min wurden 1100 Frames aufgenommen (1 s/Frame). Die Auswertung mit CHROMXIS zeigt eine leichte Rechtsverschiebung des Intensitätsprofils durch den Einsatz der höheren Fos12-

Konzentration (Abbildung 6.20). Ebenso erhöhten sich der  $R_g$  und das Molekulargewicht leicht. In beiden Peaks fällt das Molekulargewicht von etwa 110 auf 60 kDa ab, während der  $R_g$  relativ konstant zwischen 3,75 und 4 nm bleibt.



**Abbildung 6.20: HPLC-SAXS-Messung von mFI in 0,1 und 0,25 % Fos12.** Es ist die normalisierte durchschnittliche Intensität gegen die Frames sowie der  $R_g$  und das Molekulargewicht gegen die Frames der Messung in 0,1 % Fos12 in schwarz und der Messung in 0,25 % Fos12 in grün aufgetragen. Die Messungen wurden an der BM29 des ESRF durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit CHROMIXS (Panjkovich & Svergun, 2018). Die höhere Fos12-Konzentration führte zu einer leichten Rechtsverschiebung des Intensitätspeaks und einer leichten Erhöhung des  $R_g$  und des Molekulargewichtes.

Zur Auswertung der Messung in 0,1 % Fos12 wurden nach Subtraktion geeigneter Pufferframes die Kurven der Frames 625-650 skaliert und gemittelt, während die Messung in 0,25 % Fos12 mit den Frames 625-655 ausgewertet wurde. Nach Auswertung mit PRIMUS (Konarev et al., 2003) weisen die Daten eine sehr gute Qualität auf. Die Guinier-Plots verlaufen linear mit  $R^2 > 0,99$ . Die  $P(r)$ -Funktionen nähern sich für  $r = D_{\max}$  langsam 0 an bei einer Zuverlässigkeit der Daten von 89 bzw. 87 %. Der Gauß-ähnliche Verlauf des Kratky-Plots bei kleinen Winkeln bestätigt die Faltung des Proteins.



**Abbildung 6.21: Streukurven,  $P(r)$ -Funktion, Guinier- und Kratky-Plot der HPLC-SAXS-Läufe von mFI in 0,1 % und 0,25 % Fos12.** Die Auswertung erfolgte mit PRIMUS (Konarev et al., 2003). Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 6.5 angegeben.

## Ergebnisse

Die aus den Streukurven (Abbildung 6.21) berechneten Parameter sind in Tabelle 6.5 aufgeführt. Für die Messung in 0,1 % Fos12 beträgt die mittlere Streuintensität 50,66 und der  $R_g$  3,69 nm. Aus der Paarverteilungsfunktion ergibt sich eine maximale Ausdehnung  $D_{max}$  von 12,30 nm. Für die Messung in 0,25 % Fos12 beträgt die mittlere Streuintensität 42,33. Bei einem Gyrationradius von 3,63 nm beträgt die maximale Ausdehnung der Partikel 11,58 nm. Für beide Messungen stimmen der  $R_g$  im reziproken und im realen Raum gut überein.




**Tabelle 6.5: Guinier-Analyse, Paarverteilungs-Analyse und Berechnung des Molekulargewichtes.** Es wurde angenommen, dass  $V_p/1,6 = MW$  ist (Korasick & Tanner, 2018). Die Auswertung erfolgte mit PRIMUS (Konarev et al., 2003). Nach Ambimeter (Petoukhov & Svergun, 2015) ist die 3D-Rekonstruktion einzigartig. In Klammern sind die Parameter zu den geschnittenen Daten angegeben.

	0,1 % Fos12 Frame 625-650	0,25 % Fos12 Frame 625-655
<b>Guinier-Analyse</b>		
I(0)	50,66	42,43
$R_g$ (nm)	3,69	3,63
$qR_g$ Bereich	0,46-1,26	0,42-1,30
Punkte	18-60	16-63
Qualität	87 %	95 %
$R^2$	0,99	0,99
<b>P(r)-Analyse (geschnitten)</b>		
I(0)	50,71 (49,71)	42,33 (42,32)
$R_g$ (nm)	3,71 (3,71)	3,62 (3,63)
$D_{max}$ (nm)	12,30	11,58 (12,10)
$q$ Bereich ( $nm^{-1}$ )	0,139-2,147 (0,14-1,42)	0,115-2,120 (0,12-1,45)
Qualität	0,89 (0,94)	0,87 (0,94)
$V_p$ ( $nm^3$ )	212,49 (305,76)	167,04 (292,71)
<b>Molekulargewicht [kDa]</b>		
Datmow	37,06	29,61
Datvc	65,84	51,62
MW ( $V_p/1,6$ )	144,89	104,38
<b>Ambimeter</b>		
Ambiguitäts-Wert	0,7782	1,079
Anzahl kompatibler Form-Kategorien	6	12

Das Programm Ambimeter (Petoukhov & Svergun, 2015) ermittelte für die Messung in 0,1 % Fos12 einen Ambiguitätswert von 0,78 und für die Messung in 0,25 % Fos12 einen Wert von 1,08. Somit sollte die einzigartige Bestimmung eines Oberflächenmodells gewährleistet sein. Es folgte die Berechnung von Oberflächenmodellen mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009). Das Schneiden der Daten verbesserte die Statistik, weshalb Modelle aus P(r)-Funktionen berechnet wurden, die bei  $q = 1,14$  geschnitten wurden (Tabelle 6.5, Tabelle 12.1). Für beide Messungen lieferte eine vierfache Symmetrie die besten statistischen Daten. Es folgte ein Vergleich der berechneten Modelle ohne Symmetrievorgabe mit dem Modell aus der Messung in 0,05 % Fos12 (Frame 1200-1250) (Tabelle 6.6).



**Tabelle 6.6: Vergleich von Oberflächenmodellen berechnet nach HPLC-SAXS-Experimenten von mFI in 0,05 % Fos12, 0,1 % Fos12 und 0,25 % Fos12 unter Verwendung geschnittener Streukurven.** Es ist jeweils die Auflösung des größten mit DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003) berechneten Clusters und das DAM-Volumen, der  $D_{\max}$  und der  $R_g$  des repräsentativsten Modells des Clusters angegeben. Mit zunehmender Fos12-Konzentration verringert sich die Größe des Oberflächenmodells. Es sind die Oberflächen und Dichtekarten der *damaver*-Modelle mit einer Auflösung von 15 Å gezeigt. Die Abbildungen wurden mit ChimeraX erstellt.

	0,05 % Fos12	0,1 % Fos12	0,25 % Fos12
Symmetrie	P1 p	P1 p	P1 p
Auflösung [Å]	19	20	19
$\chi^2$	0,979	1,022	0,996
DAM-Volumen [nm <sup>3</sup> ]	381	342	325
$D_{\max}$ [nm]	13,40	12,97	12,74
$R_g$ [nm]	3,95	3,72	3,63
P1 p			
Ausdehnung	140 x 92 Å	134 x 92 Å	130 x 85 Å
Volumen [nm <sup>3</sup> ]	764	702	669

Obwohl die Modelle in P4-Symmetrie die niedrigsten  $\chi^2$ -Werte aufwiesen, war für die Messungen in 0,1 und 0,25 % Fos12 keine Berechnung von Strukturmodellen mit CORAL oder SASREF aufgrund einer mangelnden Übereinstimmung der mit dem FoXS-Server (Schneidman-Duhovny et al., 2013; 2016) ermittelten theoretischen Streukurven mit den experimentellen Streukurven möglich. Der Vergleich der Oberflächenmodelle zeigt mit zunehmender Fos12-Konzentration deutlich eine Abnahme des DAM-Volumens, des  $D_{\max}$  und des  $R_g$ .

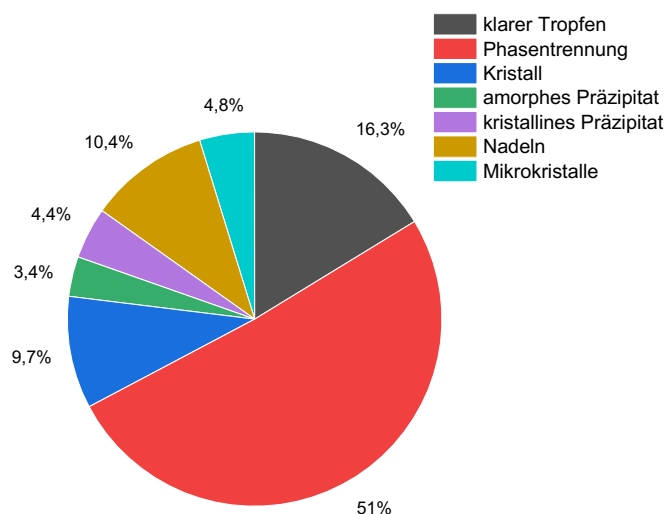
### 6.2.6 Kristallisation von mFI-StreptII

Nachdem durch SAXS-Experimente erste strukturelle Parameter ermittelt wurden, sollte die Kristallisation von mFI erfolgen. Zur Ermittlung initialer Bedingungen für die Kristallisation von mFI wurden zunächst Kristallisationsansätze mit kommerziell erhältlichen 96-well Kristallisations-Screens unter Verwendung des Kristallisationsroboters hergestellt. Vor jedem Ansatz von Kristallisationsbedingungen erfolgte eine SEC. Nach der Vereinigung zugehöriger Peakfraktionen wurde die Proteinlösung eingeengt und für 20 min bei 20000 x g und 4 °C zum Abtrennen von Verunreinigungen und Aggregaten zentrifugiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch einen BCA-Assay, wobei in der Regel mit einer Proteinkonzentration von 12 mg/mL kristallisiert wurde. Die zahlreichen kommerziell erhältlichen und selbst angesetzten *Screens* wurden mit verschiedenen mFI-Proben getestet, die sich im verwendeten Detergenz, der Detergenzkonzentration, der Salzkonzentration, im

## Ergebnisse

pH-Wert und Puffer unterschieden. Die Kristallisationsplatten wurden in der Regel bei 18 °C inkubiert, versuchsweise auch bei 4 °C und 10 °C. Zudem wurden verschiedene Proteinkonzentrationen und verschiedene Protein-zu-Reservoirlösungs-Verhältnisse getestet. Neben der klassischen Dampfdiffusionsmethode im *hanging* und *sitting drop*-Verfahren wurden andere Techniken wie die CIMP-(*controlled in meso phase*)- und die HiLiDe-(*high lipid detergent*)-Kristallisation durchgeführt. Insgesamt resultierte dies in mehr als 15500 getesteten Bedingungen.

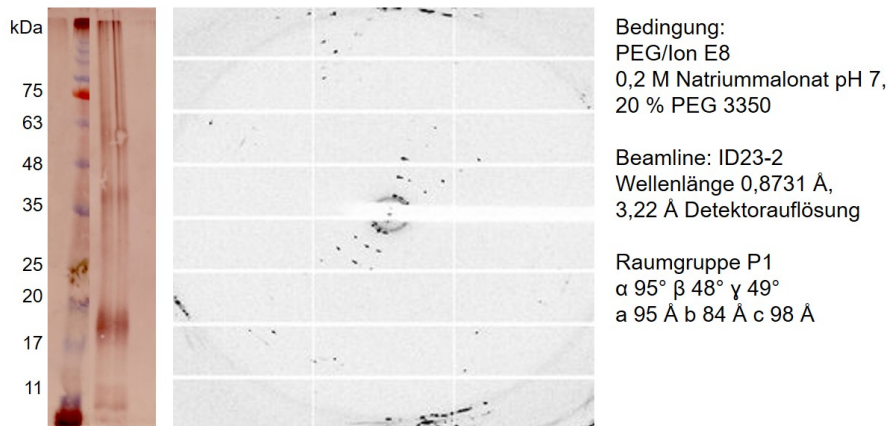
Aufgrund der Vielzahl an getesteten Bedingungen ist in Abbildung 6.22 beispielhaft die Bewertung der Kristallisationsansätze aus vier verschiedenen Kristallisationsscreens (MemGold2, Morpheus II, Memstart/Memsys, PEG/Ion, s. Tabelle 4.18) dargestellt. Angegeben sind die prozentualen Anteile möglicher Ereignisse, bei denen die Bewertung der 784 Bedingungen nach acht Wochen erfolgte. Während in über der Hälfte der Bedingungen eine Phasentrennung vorlag, befanden sich in 6,6 % der Tropfen Kristalle und in 4,6 % der Tropfen Nadelkristalle.



**Abbildung 6.22: Bewertung der Kristallisationsansätze von mFI in Fos12.** MFI wurde in Anwesenheit von 20 mM  $\text{CaCl}_2$  und 0,05-0,1 % Fos12 mit einer Konzentration von 12 mg/mL kristallisiert. Es sind die prozentualen Anteile möglicher Kristallisationsereignisse dargestellt, wobei die Bewertung nach 8 Wochen erfolgte.

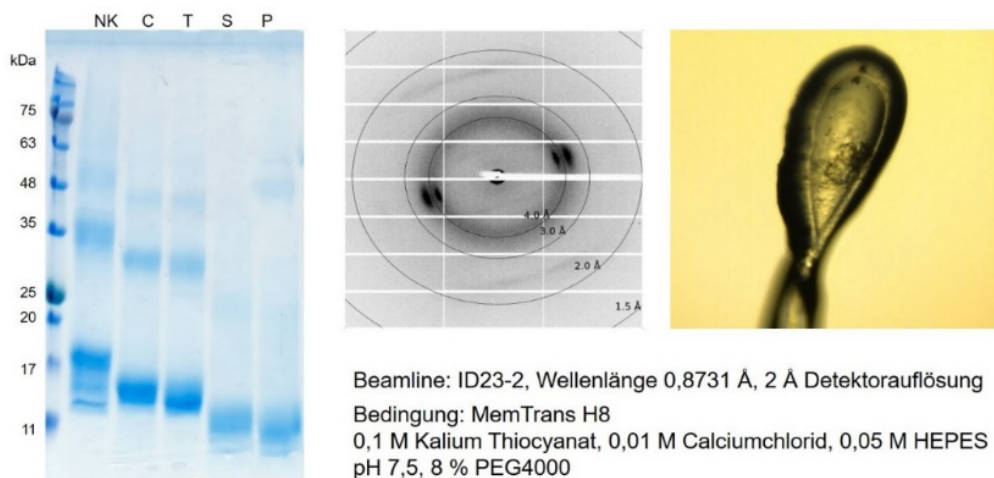
Von allen getesteten Bedingungen wurden einschließlich der Kristallisation von mFI in PMAL-C8 und mit den kleinen Amphiphilen Heptantriol und Benzamidin mit insgesamt über 2100 Kristallen Röntgendiffraktionsexperimente durchgeführt. Keiner dieser Kristalle führte zu einem Diffraktionsbild, das eine Strukturlösung ermöglichen würde und oft handelte es sich um Salzkristalle. Abbildung 6.23 zeigt ein Diffraktionsbild mit Spots, bei denen es sich im niedrigen Auflösungsbereich um Proteindiffraktion handeln könnte. Dabei wurde mFI im CIMP-Verfahren kristallisiert. Nach dem Röntgenexperiment wurde der Kristall in PBS gelöst und mittels Western-Blot auf das Vorhandensein von Protein überprüft. Eine deutliche Bande von mFI ist nachweisbar.





**Abbildung 6.23: Western-Blot und Diffraktionsbild eines mFI-Kristalls.** Nach erfolgtem Röntgenexperiment wurde der Kristall aufgetaut und in PBS gelöst. Die Detektion im Western-Blot erfolgte durch einen N- und C-Terminus spezifischen mFI-Antikörper.

Vielversprechende Bedingungen, in denen nicht streuende Kristalle oder Mikrokristalle beobachtet werden konnten, wurden im 24- oder 48-*well* Format durch Variation der jeweiligen Bedingung optimiert. Eine Reproduktion oder Optimierung der Kristalle gelang jedoch nicht. Wegen der laut Strukturvorhersagen flexiblen Bereiche am N- und C-Terminus von mFI wurde versucht, diese durch limitierte Proteolyse zu entfernen. Dazu wurde zunächst der Verdau durch die Proteasen Papain, Subtilisin, Trypsin und Chymotrypsin getestet und die Proben anschließend in einer SDS-PAGE analysiert (Abbildung 6.24).



**Abbildung 6.24: Limitierte Proteolyse von mFI und Diffraktionsbild.** Zur limitierten Proteolyse wurden die Proteasen Chymotrypsin (C), Trypsin (T), Subtilisin (S) und Papain (P) getestet. Reines mFI diente als Negativkontrolle (NK). In der Mitte ist das Diffraktionsbild des rechts abgebildeten Kristalls gezeigt.

Alle vier Proteasen verdauten das Protein, was die niedrigeren Banden im Vergleich zur Kontrolle ohne Protease zeigen. Da der Verdau mit Subtilisin in einer einzigen Bande im SDS-Gel resultierte, erfolgte die Kristallisation von mFI mit Subtilisin, wie in Kapitel 5.10.4 beschrieben, unter der Annahme der Entfernung flexibler Bereiche und der Verhinderung einer Oligomerisierung des Proteins. Dennoch blieb auch die Kristallisation von mit Subtilisin verdautem Protein erfolglos, da die Kristalle keine Diffraction aufwiesen oder es sich um Salzkristalle handelte (Abbildung 6.24).

## 6.2.7 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StreptII

Nachdem die Oligomerisierung von mFI bestätigt wurde und die Kristallisation nicht erfolgreich war, kam die Aufklärung der Struktur mittels Kryo-EM in Betracht, da eine ausreichende Größe des Proteins vorliegt.

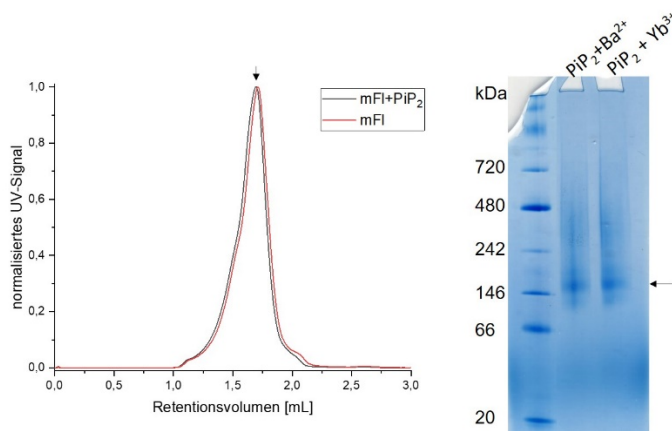
### 6.2.7.1 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StreptII in PMAL-C8

Mit gereinigtem, in PMAL-C8 rekonstituiertem mFI wurde eine SEC durchgeführt (Abbildung 12.34). Die Qualität der Probe wurde durch negative Kontrastierung überprüft und aus den gesammelten Daten ein zum SAXS-Modell in P32-Symmetrie ähnliches Modell erstellt (Abbildung 12.33). Eine Probe der Fraktion im Hauptpeak mit einer Absorption von etwa 2000 mAU (Abbildung 12.34) wurde auf einem Kupfer-*Grid* gefroren und anschließend ein Datensatz im *Counting Mode* mit 1600 Movies aufgenommen. Der Datensatz wurde mit CryoSPARC prozessiert und die Partikel automatisch ausgewählt. Nach mehreren Runden der 2D-Klassifizierung kollabierten die Klassen jedoch (Abbildung 12.35). Eine typische Mizelle war nicht sichtbar, was den Misserfolg der Rekonstitution bestätigt.

### 6.2.7.2 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StreptII in Fos12 mit Barium

Es wurde ein weiterer Datensatz von mFI in Fos12 aufgenommen, nachdem festgestellt wurde, dass die Rekonstitution in PMAL-C8 nicht erfolgreich war. Zusätzlich wurde mFI vor der SEC mit 1 mM PIP<sub>2</sub> und nach der SEC mit 2 mM BaCl<sub>2</sub> oder YbCl<sub>3</sub> versetzt. Es wurden Kupfer- und Gold-Grids der Fraktion, die in Abbildung 6.25 durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, angefertigt. Von mFI mit Barium auf einem Gold-*Grid* wurde ein Datensatz von 1100 Movies aufgenommen. Das Barium-Signal war zu stark, weshalb das Protein nicht mehr sichtbar war (Abbildung 12.36) und nur in wenigen 2D-Klassen sind Tetramere sichtbar.

Die spätere Analyse der Proben mittels nativer PAGE zeigt, dass mFI unter diesen Bedingungen hauptsächlich als mögliches Oktamer mit einer starken Bande bei etwa 160 kDa vorliegt (Abbildung 6.25).



**Abbildung 6.25: SEC und native PAGE von mFI nach Zugabe von PIP<sub>2</sub> und Barium.** Es wurde das normalisierte UV-Signal gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet die Fraktion von mFI mit PIP<sub>2</sub>, von der Kryo-EM-Proben angefertigt wurden. Die Fraktion wurde nach Zugabe von 2 mM Barium oder Ytterbium in einer nativen PAGE aufgetrennt. Der Pfeil bei etwa 160 kDa kennzeichnet die Bande von mFI.

### 6.2.7.3 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StrepII in DDM/CHS

Da es sich bei Fos12 vermutlich um ein zu harsches Detergenz handelt, erfolgte die Solubilisierung von mFI in 1 % DDM und 0,2 % CHS. Die anschließende Reinigung erfolgte in 0,1 % DDM und 0,02 % CHS. Zur Auftrennung der Oligomere vor dem Frieren der Proben erfolgte die abschließende SEC in 0,05 % DDM und 0,01 % CHS auf einer Superose 6 5/150 pg-Säule unter Verwendung einer MicroÄkta (Abbildung 12.38). Zur Überprüfung der Qualität der Proben wurden negativ kontrastierte Proben angefertigt. Erstmals war in den 2D-Klassen eine Mizelle erkennbar, was die erfolgreiche Rekonstitution des Proteins bestätigt, weshalb anschließend Proben des vorderen, mittleren und hinteren Peaks auf Kupfer-, Gold-, und Graphenoxid-Grids unter Verwendung des VitroBots gefroren wurden. Nach Aufnahme eines Datensatzes waren lediglich Mizellen, jedoch keine Protein-Merkmale erkennbar.

### 6.2.8 SSM-Elektrophysiologie

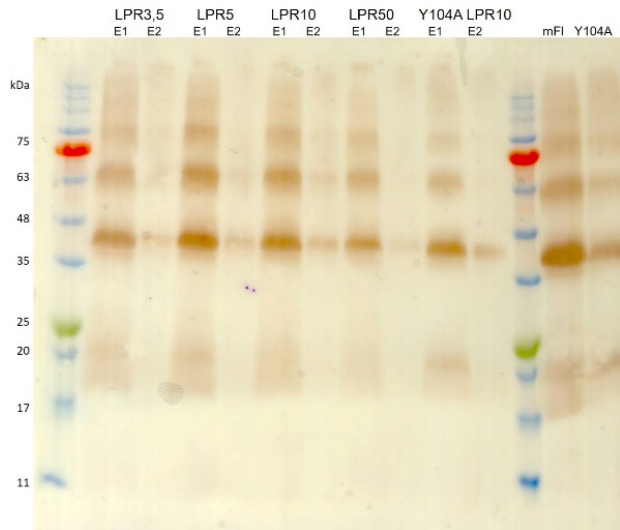
Wegen der Oligomerbildung von mFI galt es herauszufinden, ob es sich um einen wie von Yao et al. (2009) postulierten Calcium-Kanal handelt oder ob eine mögliche Calcium-Bindung mit einer Konformationsänderung einhergeht. Dazu wurde mFI, wie in Kapitel 5.6.3 beschrieben, in Liposomen rekonstituiert. Anschließend wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften des Proteins unter verschiedenen Bedingungen mittels SSM-Elektrophysiologie-Messungen untersucht.

Die Messungen erfolgten auch mit der mFI-StrepII-Variante Y104A, bei der die Aminosäure 104 (Tyrosin) zu Alanin mutiert wurde, was zu einer vollständigen Blockierung der Endozytose in CTLs führte (Ravichandran, 2021). Die Ergebnisse dieser Reinigung befinden sich in Kapitel 12.12.

Der beschriebene Endozytosedefekt könnte durch einen fehlenden Calcium-Strom hervorgerufen werden, was durch SSM-Messungen überprüft werden sollte.

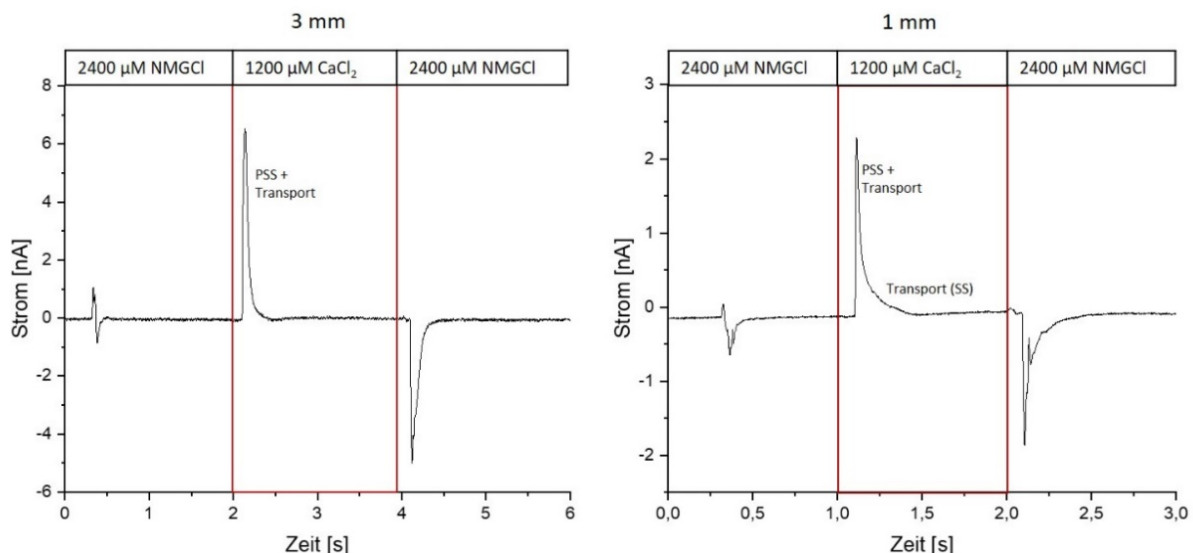
Der Einbau der Proteine in die Liposomen wurde mittels Western-Blot mit einem StrepII-Antikörper für LPRs von 3,5:1, 5:1, 10:1 und 50:1 überprüft (Abbildung 6.26). Es zeigte sich eine Übersättigung der Liposomen auch bei einem 50-fachen Lipidüberschuss. Deshalb wurden im Folgeexperiment Lipid-zu-Proteinverhältnisse von 150:1, 300:1, 500:1, 1000:1 und 2000:1 (LPR 150, LPR 300, LPR 500, LPR1000 und LPR 2000) gewählt, wobei sich diese niedrigen Proteinkonzentrationen nicht im Western-Blot nachweisen lassen.

## Ergebnisse



**Abbildung 6.26: Western-Blot von Proteoliposomen mit mFI.** Proteoliposomen wurden, wie in Kapitel 5.6.3 beschrieben, vorbereitet und mit 150  $\mu$ L Puffer von einer PD10-Säule eluiert (E1). Es erfolgte eine zweite Elution mit 150  $\mu$ L (E2), um nicht rekonstituiertes Protein von der Säule zu waschen. Als Referenz diente mFI in Fos12 (mFI) und die Y104A-Variante in Fos12 (Y104A).

Es wurden erste Messungen auf 1 mm und 3 mm Sensoren durchgeführt, wobei die zeitliche Auflösung bei den 3 mm Sensoren schlechter und ein Teil der Reaktion nicht sichtbar ist. Dies zeigt Abbildung 6.27, in der Messungen mit 1200  $\mu$ M Calcium im aktivierenden Puffer auf einem 3 mm Sensor und einem 1 mm Sensor mit den gemittelten Peaks aus drei Messungen dargestellt sind. Auf dem 3 mm Sensor zeigt sich nur der schnelle, transiente Strom (*pre-steady state*, PSS), während auf dem 1 mm Sensor auch der langsamere, stationäre Strom (*steady state*, SS) teilweise aufgelöst wird, bei dem es sich um den Ionenstrom handelt.

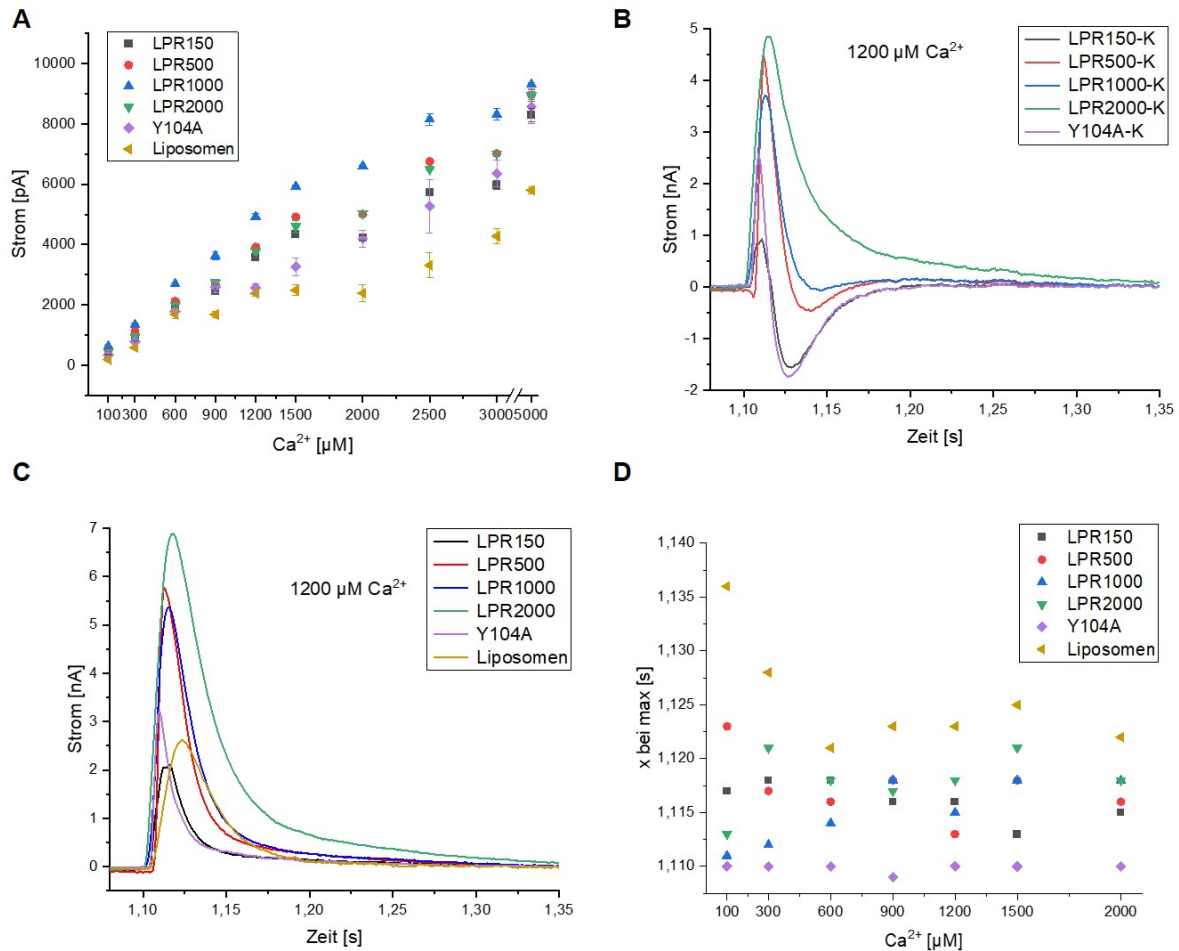


**Abbildung 6.27: Durch 1200  $\mu$ M Calcium ausgelöster Übergangstrom auf einem 3 mm (links) und 1 mm Sensor (rechts) bei einem LPR von 50 an der SSM.** NMgCl diente als Gegenion. Die Messung auf dem 3 mm Sensor erfolgte für 6 s, auf dem 1 mm Sensor für 3 s, wobei nach 2 bzw. 1 s der Wechsel zum aktivierenden Puffer erfolgte. Der stationäre Strom (SS) kann auf dem 3 mm Sensor nicht aufgelöst werden.

Folglich wurden die anschließenden Experimente auf 1 mm Sensoren durchgeführt. Durch Analyse verschiedener LPRs (150, 500, 1000, 2000) sollte herausgefunden werden, ob eine bestimmte mFI-Konzentration zur Bildung eines funktionsfähigen Kanals notwendig ist.

Als Kontrollen dienten reines mFI in Fos12 sowie leere Liposomen. Während beim reinen Protein keine Ladungsänderung detektiert wurde, unterschieden sich bei den Liposomen die aufgezeichneten Ströme in der Höhe sowie der Form des Peaks von Proteoliposomen (Abbildung 6.28C). Dies spricht für eine fehlende Bindung und ein reines Durchsickern von Calcium in die Liposomen. Bei Subtraktion des Stroms der Liposomen vom Strom der Proteoliposomen wird deutlich, dass die Reaktion bereits ab einem LPR von 1000 über der Auflösungsgrenze des 1 mm Sensors liegt (Abbildung 6.28B), weshalb bei höheren Proteinmengen geringere Ströme aufgezeichnet wurden. Bei Verlangsamung der Reaktion durch Einsatz einer geringeren Proteinmenge (LPR 2000) wird der stationäre Strom besser aufgelöst (Abbildung 6.28B, C). Bei der Titration von Calcium steigt die Stromstärke bei allen LPRs mit steigender Calcium-Konzentration, wobei der Anstieg ab 1500  $\mu\text{M}$  Calcium abflacht (Abbildung 6.28A). Unabhängig von der Proteinkonzentration und der auf den Sensor aufgetragenen Menge an Proteoliposomen wurde der halbmaximale Strom bei etwa 850  $\mu\text{M}$  Calcium gemessen (Abbildung 12.15). Die bei einer Calcium-Konzentration über 1500  $\mu\text{M}$  gemessenen Ströme liegen vermutlich über der Auflösungsgrenze des Sensors. Das Integral des Einstroms stimmt mit dem des Ausstroms überein (Abbildung 12.14). Die Normalisierung der Ströme bei 1200  $\mu\text{M}$  Calcium verdeutlicht die Linksverschiebung der Peakmaxima der Y104A-Variante (LPR2000) und die Rechtsverschiebung der Peakmaxima der Liposomen im Vergleich zu den funktionsfähigen Proteoliposomen mit den LPRs 2000, 1000, 500 und 150 (Abbildung 6.28D).

## Ergebnisse



**Abbildung 6.28: Calcium-Ströme bei verschiedenen LPRs gemessen mit 1 mm Sensoren an der SSM.**  
**A** Auftragung der bei verschiedenen LPRs gemessenen Peakpotenziale gegen die Calcium-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen von 100 bis 5000  $\mu\text{M}$  Calcium mit der Standardabweichung.  
**B** Vergrößerte Ansicht von Calcium-Strömen bei 1200  $\mu\text{M}$  Calcium nach Abzug der Ströme der Liposomen.  
**C** Darstellung der Calcium-Ströme bei 1200  $\mu\text{M}$  Calcium in vergrößerter Ansicht.  
**D** Auftragung der Position des Peakmaximums gegen die Calciumkonzentration, wobei die Position des Peakmaximums nach Normalisieren der Ströme vor allem von der Proteinkonzentration abhängt.

Da die gemessenen Ströme bei höherer Proteinmenge aufgrund der zu schnellen Reaktionsgeschwindigkeit geringer ausfallen (Abbildung 6.28A), wurde die Abklingzeit  $\tau$  ( $\tau$ ) analysiert. Biexponentielle Fits mit getrennten Abklingzeiten für den PSS (schneller Strom) und den SS (langsamer Strom) wurden mit der Software Origin analysiert (Formel 13). Dabei entspricht  $\tau$  der Zeitspanne, in der die Größe A auf das 1/e-fache (etwa 37 %) abfällt und A der Amplitude.

13

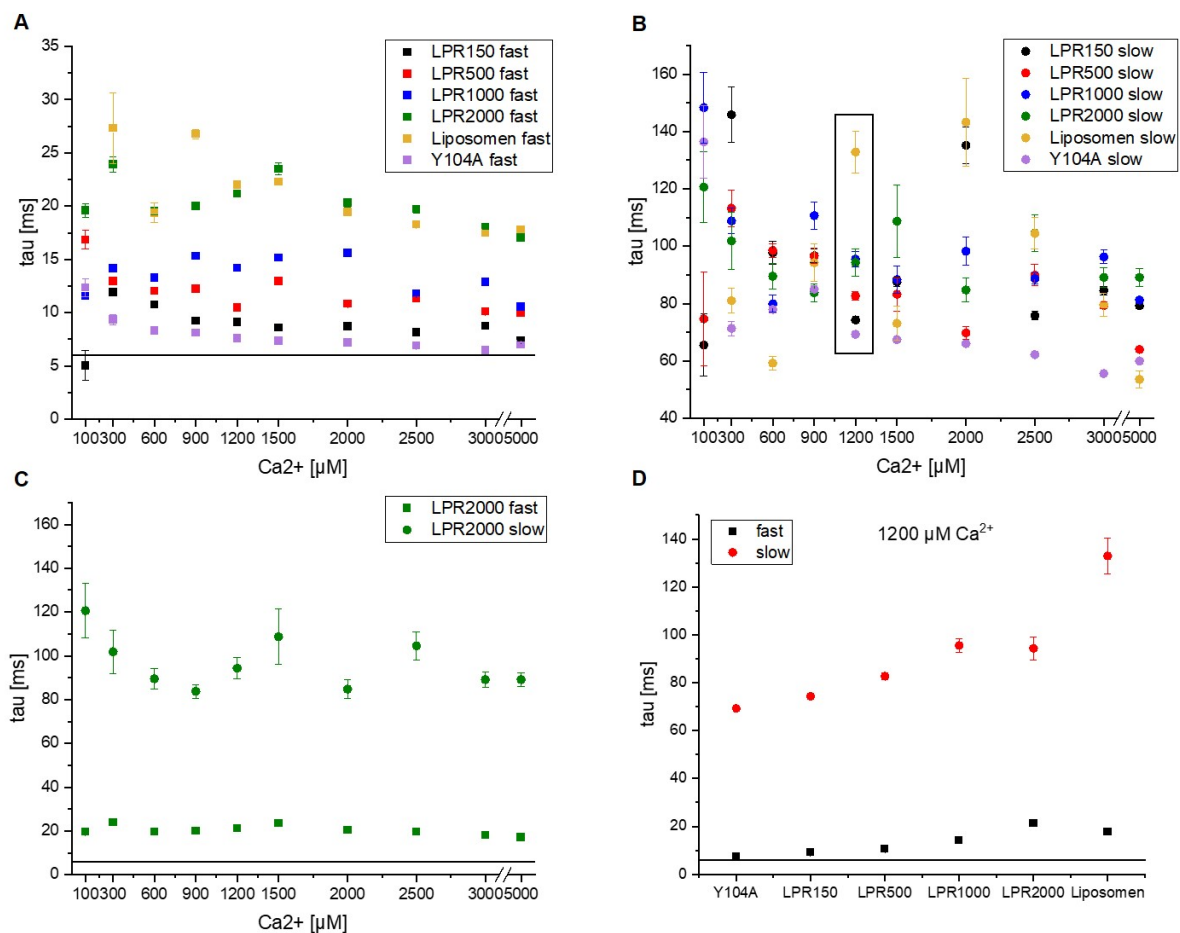
$$y = y_0 + A1 \times e^{-\left(\frac{x-x_0}{\tau_1}\right)} + A2 \times e^{-\left(\frac{x-x_0}{\tau_2}\right)}$$

Die Abklingzeiten wurden bei den verschiedenen Proteinkonzentrationen bestimmt und gegen die Calciumkonzentration aufgetragen (Abbildung 6.29A, B). Daraus lässt sich bereits eine Unabhängigkeit der schnellen und langsamen Abklingzeit von der Calcium-Konzentration ablesen, jedoch ist insbesondere die schnelle Abklingzeit abhängig von der Proteinkonzentration. Je mehr Protein vorhanden ist, umso schneller findet die Bindung (schnelle Abklingzeit, Abbildung 6.29A) statt. Tendenziell ähnlich verhält es sich bei der



langsamen Abklingzeit (Abbildung 6.29B), wobei die Abklingzeiten wegen der Überschreitung der Auflösungsgrenze des Sensors schwanken und der Strom nicht mehr interpretierbar ist. Dies wird bei Betrachtung der Abklingzeiten von LPR2000 mit einem wellenförmigen Verlauf deutlich (Abbildung 6.29C), wobei die Reaktion bis zu einer Calciumkonzentration von 900  $\mu\text{M}$  schneller wird und sich ab 1200  $\mu\text{M}$  verlangsamt. Daraus wird geschlossen, dass ab 1200  $\mu\text{M}$  nicht mehr der gesamte Strom sichtbar ist, was in einer schnelleren Abklingzeit resultiert. Der Vergleich der Abklingzeiten nach Verwendung von 1200  $\mu\text{M}$  Calcium zeigt eine Verlangsamung der Reaktion mit abnehmender Proteinkonzentration (Abbildung 6.29D), was in einer halbmaximalen Geschwindigkeit bei 0,019 ng/ $\mu\text{L}$  mFI resultiert.

Für die Proteoliposomen der Y104A-Variante wurde ebenfalls ein LPR von 2000 eingesetzt, dennoch liegen die Abklingzeiten deutlich niedriger als die von mFI-Wildtyp. Die langsame Abklingzeit der Liposomen liegt rund 50 ms höher als die der Proteoliposomen mit LPR2000.



**Abbildung 6.29: Biexponentielle Abklingzeiten bei verschiedenen Protein- und Calciumkonzentrationen gemessen mit 1 mm Sensoren an der SSM.** **A** Auftragung der schnellen Abklingzeit (fast) gegen die Calciumkonzentration bei verschiedenen LPRs. **B** Auftragung der langsamen Abklingzeit (slow) gegen die Calciumkonzentration bei verschiedenen LPRs. **C** Auftragung der schnellen und langsamen Abklingzeit von LPR2000 gegen die Calciumkonzentration. **D** Auftragung der schnellen und langsamen Abklingzeit bei durch 1200  $\mu\text{M}$  Calcium induzierten Strömen. Für alle biexponentiellen Fits gilt  $R^2 > 0,99$ . Die durch eine schwarze Linie gekennzeichnete Auflösungsgrenze des Sensors beträgt etwa 6 ms. Die Abbildungen wurden mit Origin erstellt.

Die Ströme der Y104A-Variante sind deutlich niedriger als die von mFI (Abbildung 6.28A) und das Peakmaximum kommt am frühesten (Abbildung 6.28C), was für einen fehlenden Calcium-

## Ergebnisse

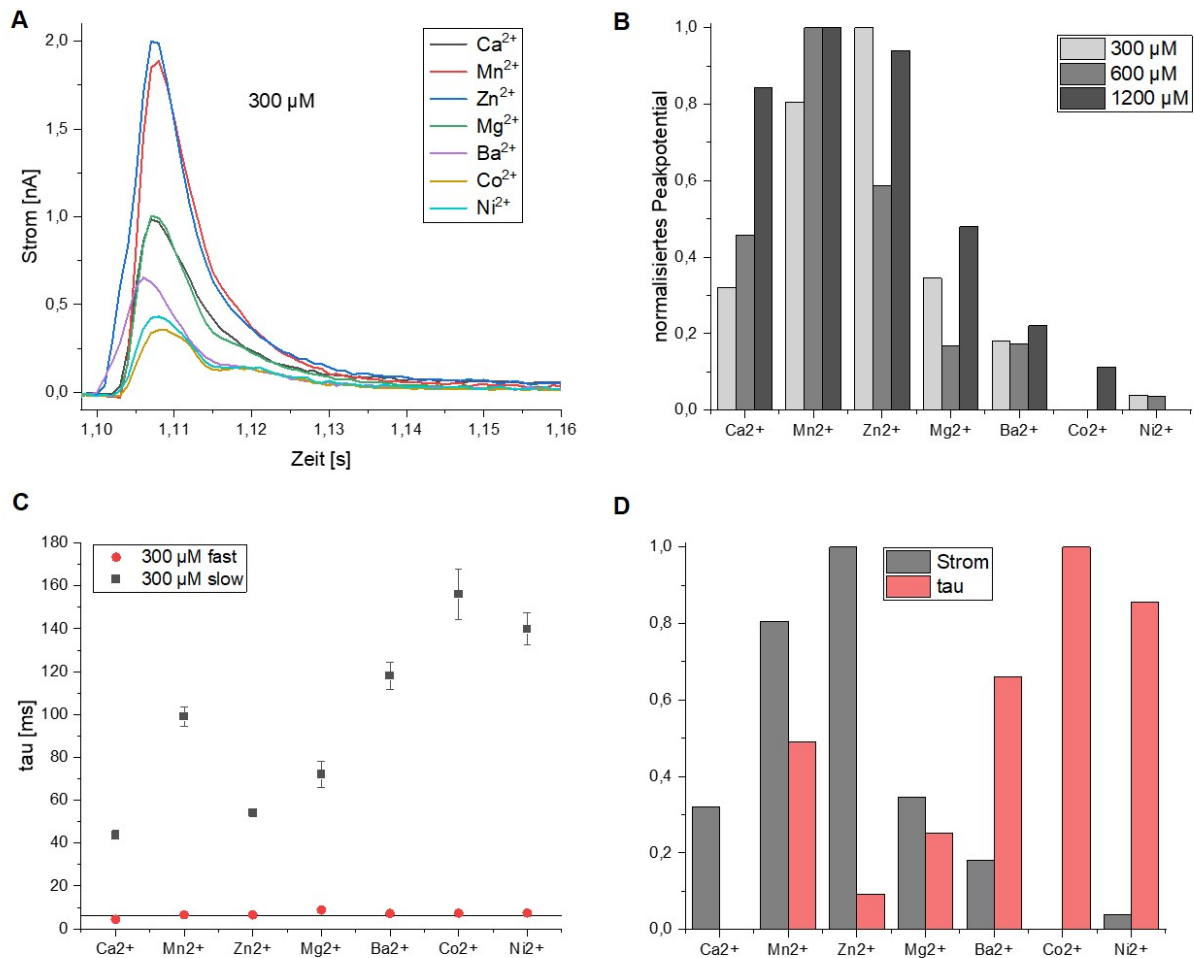
Strom und eine reine Bindung spricht. Dies ist auch an den deutlich schnelleren Abklingzeiten (Abbildung 6.29A, B) erkennbar.

Nach dem Nachweis der Calciumströme sollte die Calcium-Spezifität von mFI überprüft werden. Dazu wurde Calcium im aktivierenden Puffer durch verschiedene zweiwertige Ionen ersetzt und Ionen-Konzentrationen von 300, 600 und 1200  $\mu\text{M}$  getestet. Zwischen jeder Dreifachmessung erfolgte eine einminütige Inkubation in dem jeweiligen aktivierenden Puffer. Mangan und Zink, gefolgt von Calcium, induzieren die stärksten Ströme, wie in Abbildung 6.30A dargestellt ist.

Bei den Kationen Cobalt, Magnesium, Barium und Nickel liegen zwei deutlich abgetrennte Peaks vor (Abbildung 6.30A). Das Normalisieren der Peakpotentiale bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationen zeigt die Auslösung der stärksten Ströme durch Mangan, Zink und Calcium, wobei bei Calcium erst in der hohen Konzentration von 1200  $\mu\text{M}$  vergleichbare Ströme wie bei Mangan und Zink erfolgten (Abbildung 6.30B).

Die langsame Phase der Abklingzeit ist bei Calcium am niedrigsten, gefolgt von Zink, Magnesium und Mangan (Abbildung 6.30C). Beim Vergleich der normalisierten Ströme mit der normalisierten Abklingzeit bei den verschiedenen Ionen wird eine umso niedrigere Abklingzeit erkennbar, je höher der Strom ausfällt (Abbildung 6.30D). Die hohen Ströme in Kombination mit der niedrigen Abklingzeit verdeutlichen die Präferenz für die Ionen Calcium, Zink und Mangan.

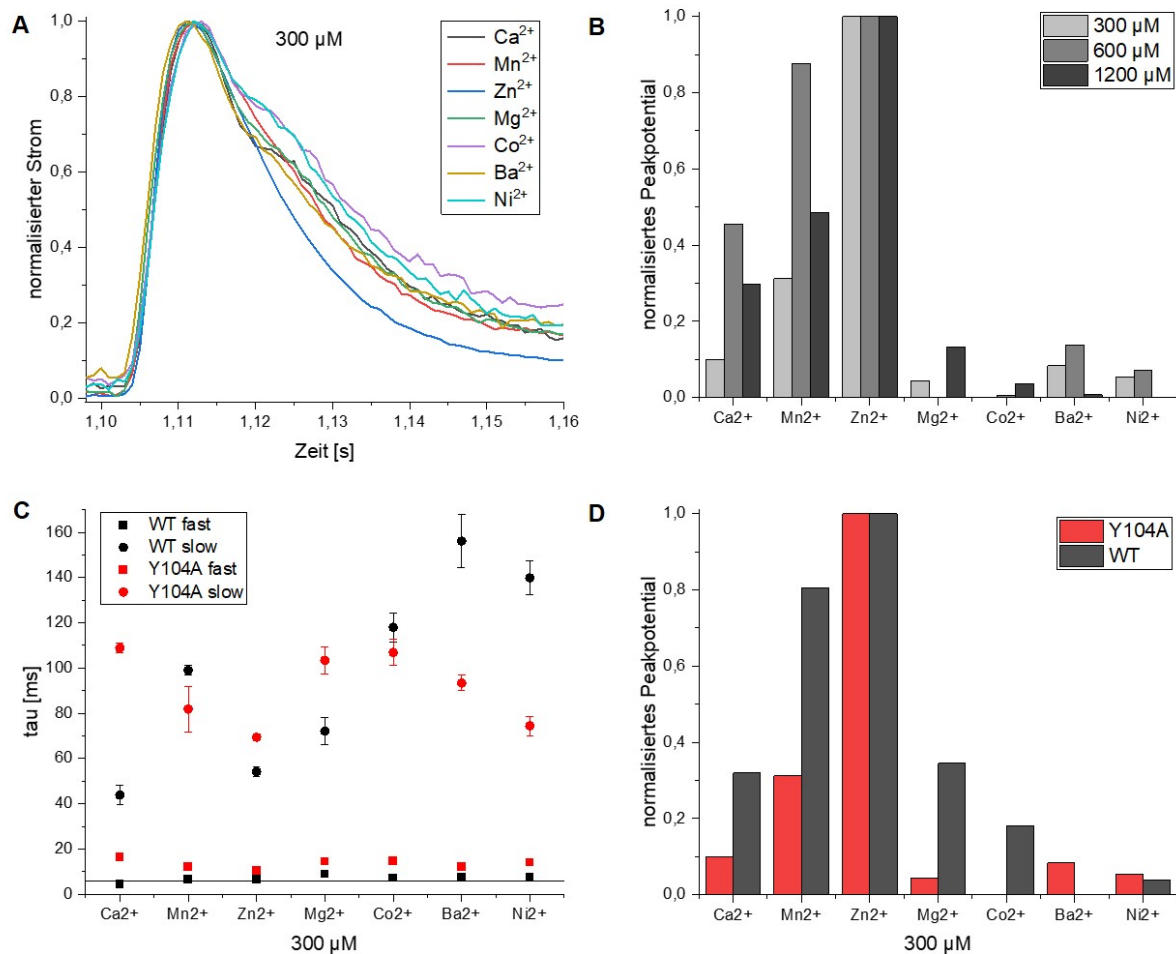




**Abbildung 6.30: Durch zweiwertige Kationen induzierte Ströme mit LPR 2000 auf einem 1 mm Sensor an der SSM.** **A** Ströme, die durch zweiwertige Ionen mit einer Konzentration von 300 µM ausgelöst wurden. Es sind die Mittelwerte aus drei Messungen dargestellt. **B** Auftragung der normalisierten Peakpotentiale bei verschiedenen Ionenkonzentrationen. **C** Auftragung der biexponentiellen Abklingzeit tau, wobei die schnelle Phase in rot, die langsame Phase in schwarz dargestellt ist. Die Auflösungsgrenze des Sensors beträgt etwa 6 ms und ist durch die schwarze Linie gekennzeichnet. **D** Auftragung der normalisierten langsamen Abklingzeit tau und des Stroms der angegebenen Ionen bei einer Konzentration von 300 µM. Für alle Fits gilt  $R^2 > 0,99$ .

Die durch Calcium und andere Ionen ausgelösten Ströme durch mFI und mFI(Y104A) bei einem LPR von 2000 wurden genauer untersucht. Wie bereits in Abbildung 6.28 gezeigt, fallen die Ströme bei der Y104A-Variante niedriger aus, liegen weiter links und die Peaks sind deutlich schmaler (Abbildung 6.31A). Das Testen verschiedener Ionen zeigte die Auslösung der höchsten Ströme durch Zink, gefolgt von Mangan und Calcium, wobei nur bei Zink ein einzelner Peak vorliegt, während die anderen Peaks eine Schulter aufweisen (Abbildung 6.31A, B). Die langsame Abklingzeit liegt bei Calcium, Zink und Magnesium höher als beim WT, während sie bei Mangan, Cobalt, Barium und Nickel niedriger liegt (Abbildung 6.31C). Der Vergleich der normalisierten Peakpotentiale von WT und mFI(Y104A) zeigt deutlich niedrigere Ströme bei Calcium, Mangan, Magnesium und Cobalt bei der Y104A-Variante, wohingegen bei beiden Proteinen bei Zink die höchsten Ströme vorliegen (Abbildung 6.31D).

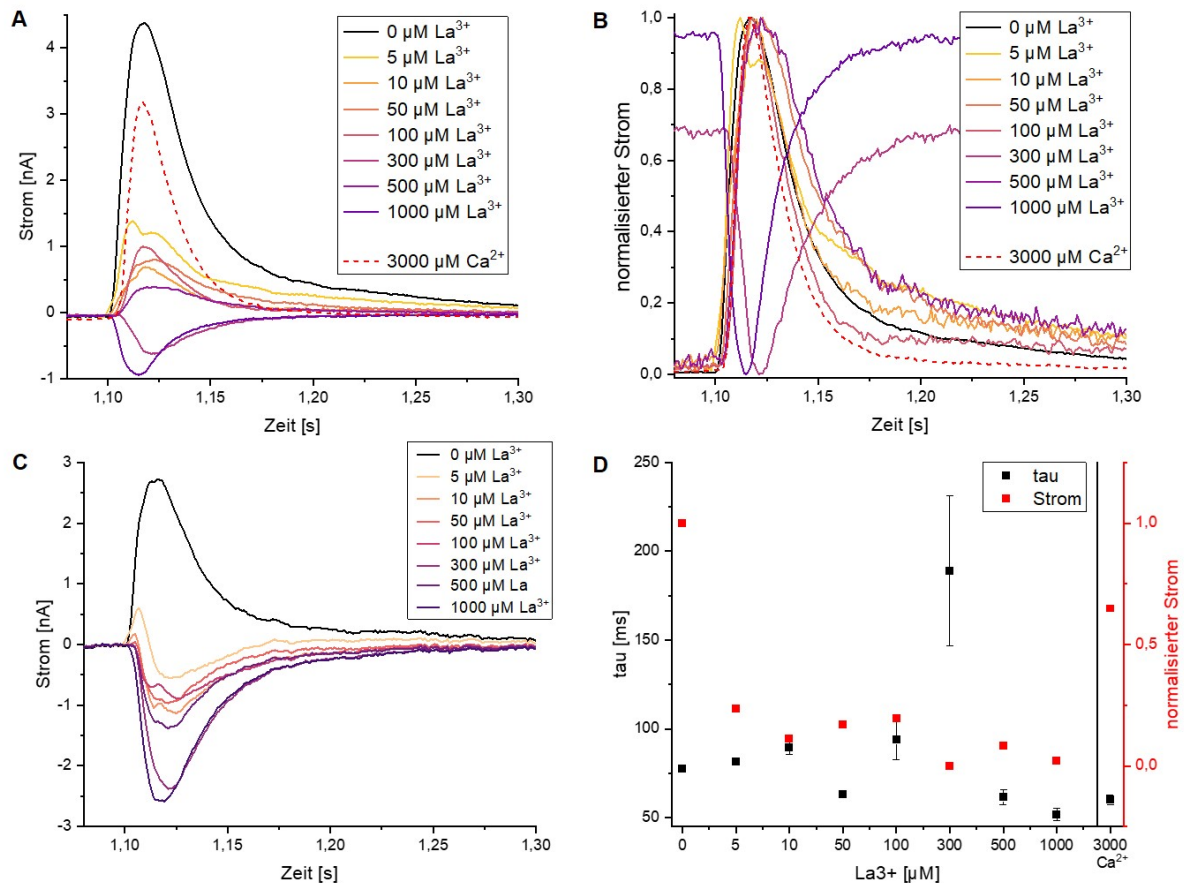
## Ergebnisse



**Abbildung 6.31: Durch zweiwertige Kationen induzierte Ströme mit LPR 2000 bei mFI und mFI(Y104A) auf einem 1 mm Sensor an der SSM. A** Auftragung der normalisierten Ströme, die durch Calcium mit einer Konzentration von 300 µM induziert wurden, gegen die Zeit. Es sind die Mittelwerte aus drei Messungen dargestellt. **B** Auftragung der normalisierten Peakpotentiale, die durch zweiwertige Ionen mit Konzentrationen von 300, 600 und 1200 µM ausgelöst wurden. **C** Auftragung der biexponentiellen Abklingzeit tau der angegebenen Ionen. Für alle Fits gilt  $R^2 > 0,99$ . **D** Vergleich der normalisierten Peakpotentiale, die durch zweiwertige Ionen mit einer Konzentration von 300 µM durch mFI und mFI(Y104A) erzeugt wurden.

Außerdem sollte überprüft werden, ob die Calciumströme wie bei dFwe inhibiert werden können. Das hierzu verwendete dreiwertige Kation Lanthan (Yao et al., 2017) wurde zu gleichen Konzentrationen in einen aktivierenden und nicht-aktivierenden Puffer gegeben, der 600 µM Calcium bzw. 1200 µM N-Methylglucamin (NMG<sup>+</sup>) enthielt. In Abbildung 6.32A sind die Ströme nach Zugabe von 5 bis 1000 µM Lanthan dargestellt. Mit steigender Lanthan-Konzentration nimmt der Strom ab. Ein Überschuss an Calcium (3000 µM) entfernt Lanthan und stellt den Strom wieder her. Die Zugabe von 300 und 500 µM Lanthan führt zu negativen Strömen und einer deutlichen Linksverschiebung des Peaks, was insbesondere beim Betrachten der normalisierten Ströme deutlich wird (Abbildung 6.32B).

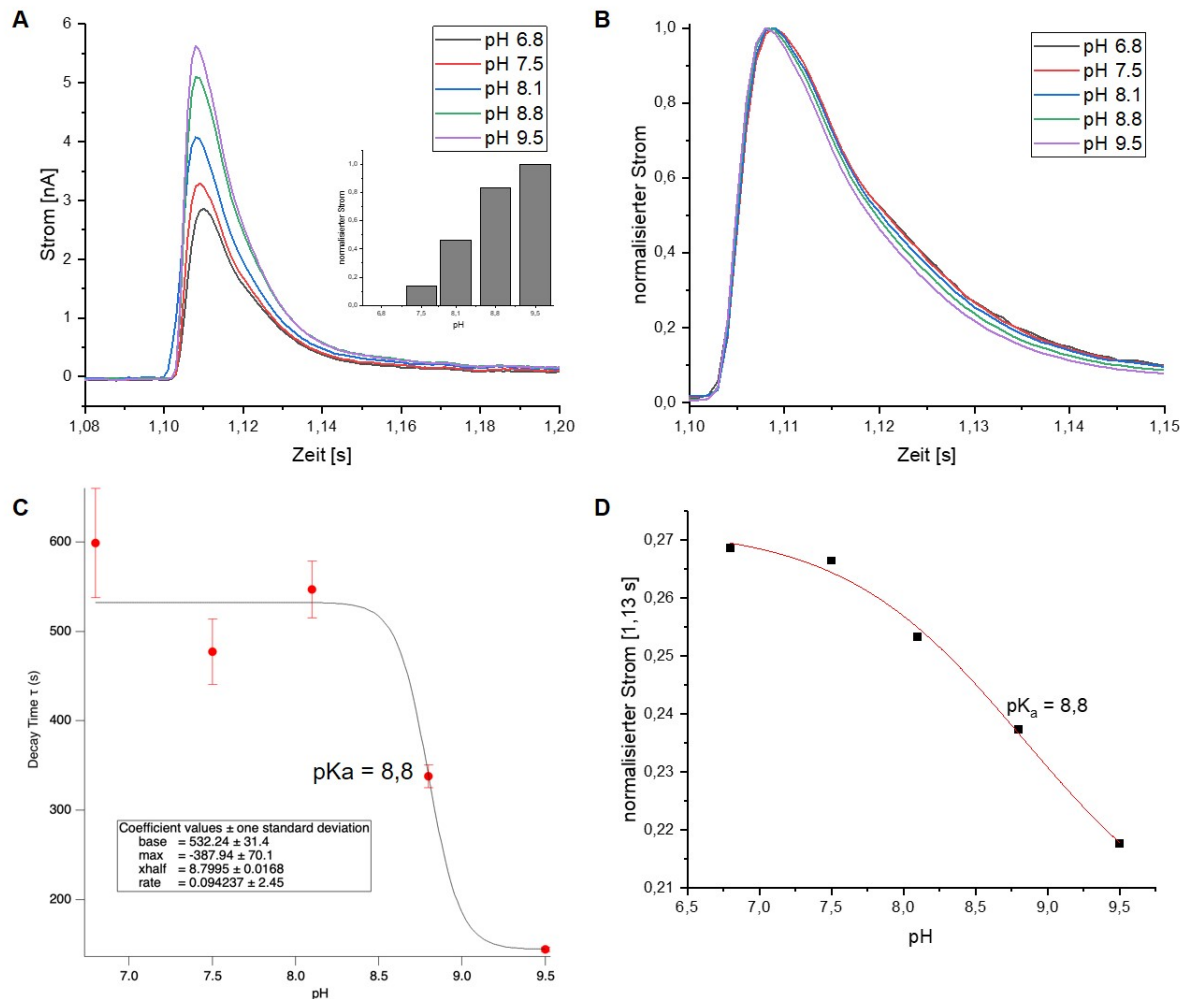
Die Ströme der leeren Liposomen wurden subtrahiert (Abbildung 6.32C). Die daraus resultierenden Graphen zeigen bereits bei 5 µM Lanthan eine starke Reduzierung der Ströme und ab 10 µM Lanthan eine vollständige Inhibierung. Bis zu einer Lanthankonzentration von 10 µM verlangsamt sich der Strom und wird schwächer. Die Abklingzeiten bei höheren Konzentrationen variieren und sind deshalb nicht interpretierbar (Abbildung 6.32D).



**Abbildung 6.32: Inhibition von mFI durch Lanthan.** **A** Durch 600  $\mu\text{M}$  Calcium induzierte Ströme wurden durch verschiedene Lanthan-Konzentrationen inhibiert. Durch einen Überschuss an Calcium (3000  $\mu\text{M}$ ) lässt sich der Strom wiederherstellen. **B** Auftragung der normalisierten Ströme gegen die Zeit. **C** Auftragung des Stroms gegen die Zeit nach Abzug der Ströme der Liposomen. **D** Auftragung der langsamen Abklingzeit  $\tau$  (schwarz) und des Peakpotenzials (rot) gegen die Lanthankonzentration.

Des Weiteren sollte der Einfluss des pH-Wertes untersucht werden, weshalb durch 1200  $\mu\text{M}$  Calcium induzierte Ströme bei pH-Werten von 6.8, 7.5, 8.1, 8.8 und 9.5 untersucht wurden. Ein pH-Wert von 9,5 resultierte in den stärksten Strömen (Abbildung 6.33A) und die Reaktionsgeschwindigkeit nahm mit steigendem pH-Wert zu, was sich durch die niedrigere Abklingzeit mit einem  $\text{pK}_a$  von 8,8 zeigt (Abbildung 6.33C). Dementsprechend nimmt auch der Strom bei 1,13 s mit zunehmendem pH-Wert ab, was die schneller ablaufende Reaktion bestätigt und ebenfalls ein  $\text{pK}_a$  von 8,8 liefert (Abbildung 6.33D).

## Ergebnisse

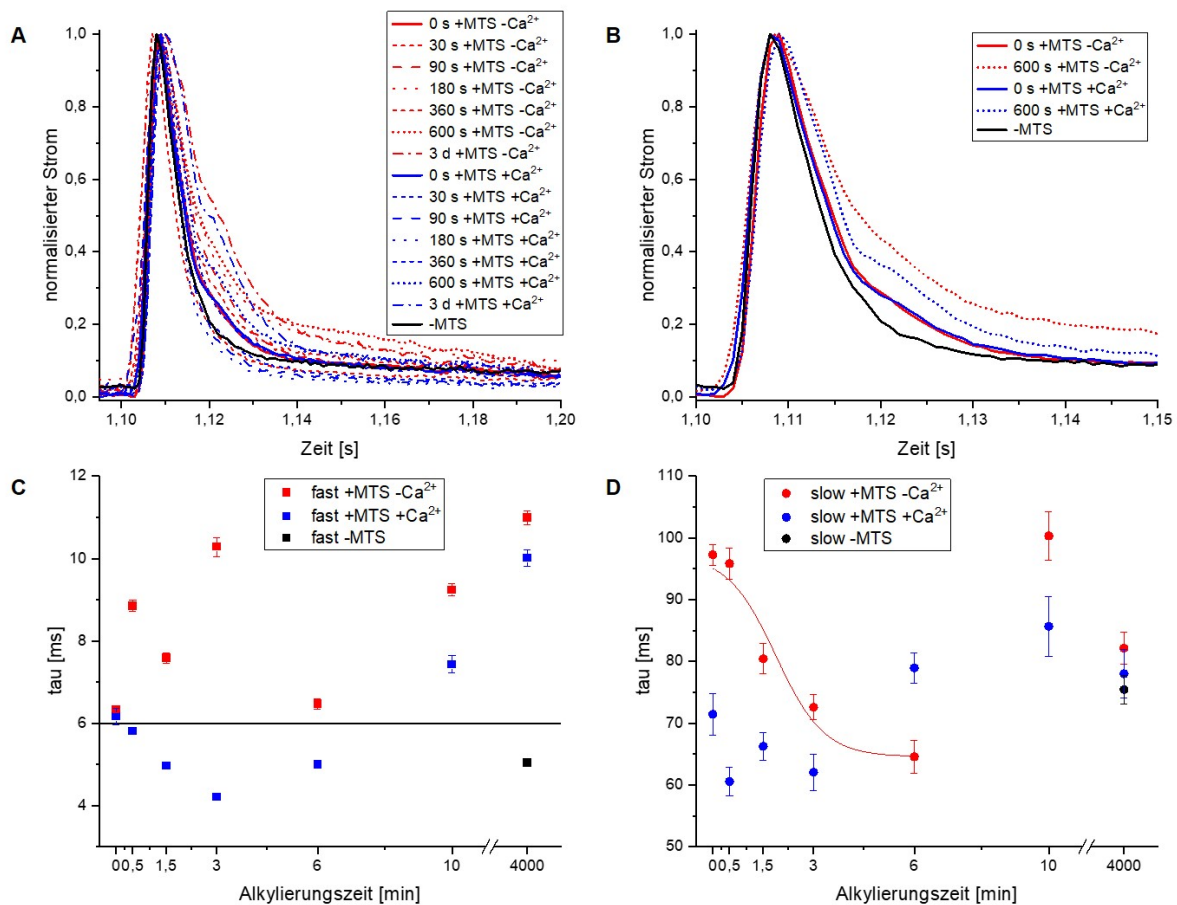


**Abbildung 6.33: pH-Abhängigkeit der durch 1200  $\mu$ M Calcium induzierten Ströme an der SSM.** **A** Calcium-Ströme bei verschiedenen pH-Werten. Mit zunehmendem pH-Wert wurden stärkere Ströme aufgezeichnet. Es sind die Mittelwerte aus drei Messungen gezeigt. Eingesetzt sind die normalisierten Peakpotentiale bei zunehmendem pH-Wert. **B** Auftragung der normalisierten Ströme bei verschiedenen pH-Werten gegen die Zeit. **C** Die Auftragung der langsamen Abklingzeit  $\tau$  gegen den pH-Wert liefert ein  $pK_a$  von 8.8. Die Abbildung wurde mit Igor Pro erstellt. **D** Die Auftragung des normalisierten Stroms bei 1,13 s gegen den pH-Wert liefert ein  $pK_a$  von 8.8.

Im nächsten Experiment sollte durch Substrat-geschützte Alkylierung mit MTSET (MTS) untersucht werden, ob es sich bei den Aminosäuren EAP von mFI (AS 74-76) tatsächlich um den durch die Gruppe von Yao beschriebenen Selektivitätsfilter (Yao et al., 2009) handeln könnte. MTSET erzeugt aus Cysteinen ein „Pseudo-Arginin“. Das vor dem EAP-Motiv liegende C73 könnte durch die Bindung von Calcium an E74 vor der Alkylierung geschützt werden, sodass Unterschiede in der Aktivität sichtbar werden sollten.

Zunächst galt es herauszufinden, ob die Alkylierung einen Einfluss auf die gemessenen Ströme hat und nach welcher Zeit sie abgeschlossen ist. Dazu wurden Sensoren mit Calcium-freiem mFI und mit 5 mM Calcium versetztem mFI verwendet. Die Reaktion mit MTSET wurde nach 30, 90, 180, 360 und 600 s durch Zugabe von Cystein abgestoppt. Zum Erhalt von vollständig alkylierten Proben wurde auf die Zugabe von Cystein verzichtet und die Proben bei 4 °C für 3 Tage inkubiert. Als Nullpunkt dienten Proben, bei denen eine Reaktion mit MTSET durch Zugabe von Cystein vor der Zugabe von MTSET verhindert wurde. Die Analyse der

Alkylierungszeit ist in Abbildung 6.34 dargestellt. Um eine Interpretierung des gesamten Stroms zu ermöglichen, wurden eine geringe Calcium-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  verwendet.



**Abbildung 6.34: Durch 300  $\mu\text{M}$  Calcium induzierte Ströme an der SSM mit und ohne Substrat-geschützter Alkylierung von mFI durch MTSET.** **A** Auftragung der normalisierten Ströme nach verschiedenen Alkylierungszeiten gegen die Zeit. **B** Vergrößerte Ansicht der normalisierten Ströme nach 0 und 600 s Alkylierungszeit. **C** Auftragung der schnellen Abklingzeit  $\tau_{\text{fast}}$  gegen die Alkylierungszeit. Die Auflösungsgrenze des Sensors von 6 ms ist durch die schwarze Linie gekennzeichnet. **D** Auftragung der langsamen Alkylierungszeit  $\tau_{\text{slow}}$  gegen die Zeit. Für die biexponentiellen Fits gilt  $R^2 > 0,99$ .

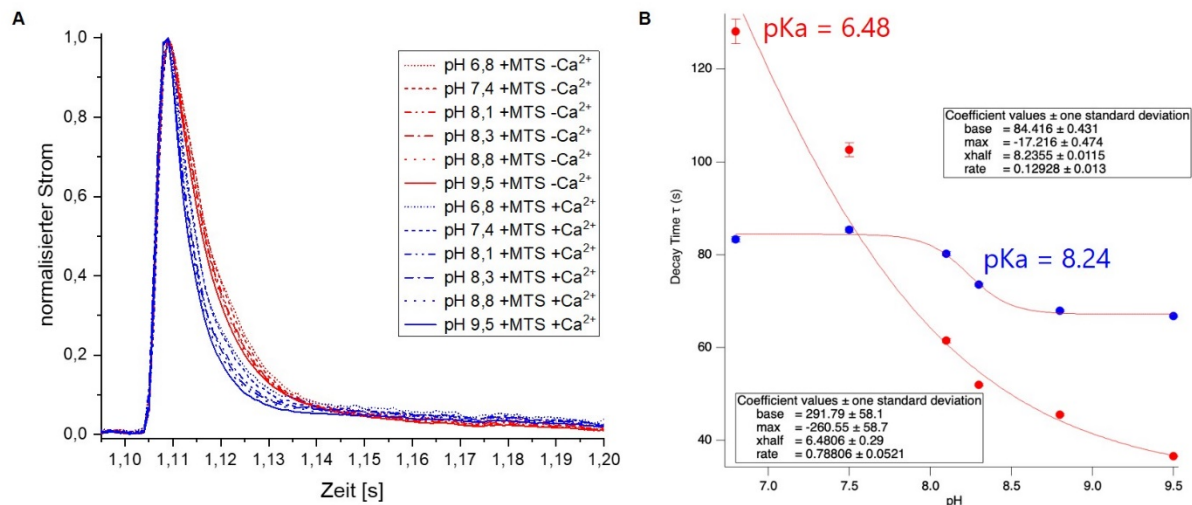
Die normalisierten Peaks zeigen ab 30 s Alkylierungszeit bereits eine deutliche Rechtsverschiebung, wenn mFI mit Calcium versetzt wurde (Abbildung 6.34A). Da nach 10 min Alkylierungszeit ein deutlicher Unterschied bei den Strömen zu erkennen ist (Abbildung 6.34B) wurde diese Zeit für weitere Experimente gewählt. Die schnelle Abklingzeit liegt zu nah an der Auflösungsgrenze des Sensors von 6 ms und ist deshalb nicht interpretierbar (Abbildung 6.34C). Die langsame Abklingzeit nimmt bei den Proben mit MTSET mit zunehmender Alkylierungszeit zunächst tendenziell ab, was bei den Proben ohne Calcium besonders deutlich durch den sigmoidalen Verlauf der Abklingzeit bis 6 min erkennbar ist. Nach 10 min ist der Strom auf dem Sensor ohne Calcium deutlich langsamer als mit Calcium. Nach drei Tagen (4000 min) nähern sich die Abklingzeiten wieder an, dennoch liegen sie auf dem Sensor ohne MTSET-Behandlung etwas niedriger (Abbildung 6.34D).

Anschließend wurde der Einfluss der Alkylierung und der Substrat-geschützten Alkylierung auf den  $\text{pK}_a$ -Wert überprüft. Vor dem möglichen Selektivitätsfilter EAP liegt das Cystein C73. Sollte



## Ergebnisse

das Glutamat E74 im möglichen Selektivitätsfilter den  $pK_a$  von 8,8 verursachen, sollte es bei den MTSET-behandelten Proben zu einer Verschiebung des  $pK_a$  kommen. Es wurden pH-Werte von 6,8 bis 9,5 getestet (Abbildung 6.35).

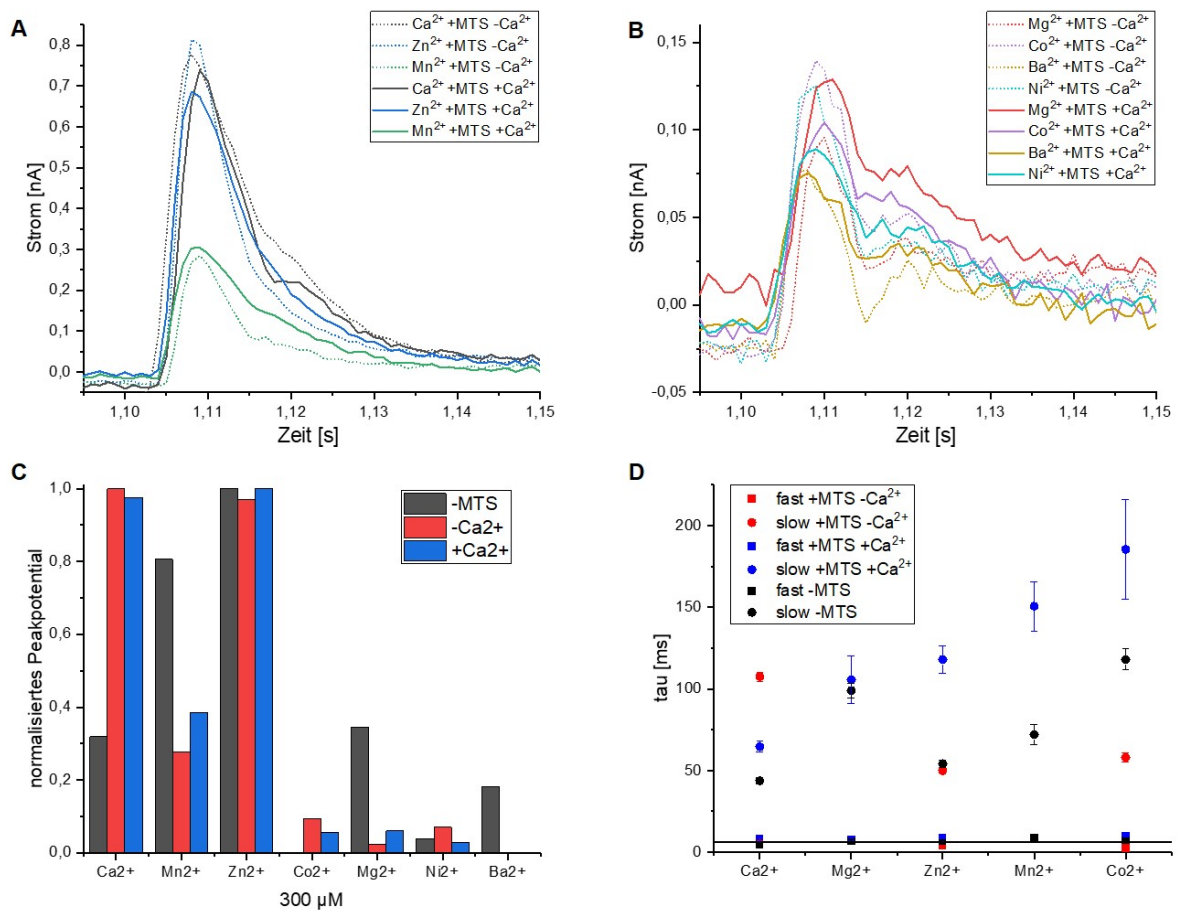


**Abbildung 6.35: Durch 300  $\mu$ M Calcium ausgelöste Ströme an der SSM bei verschiedenen pH-Werten nach Alkylierung.** **A** Auftragung der normalisierten Ströme bei unterschiedlichen pH-Werten. In rot sind die Peaks nach Zugabe von MTSET ohne Calcium und in blau nach Zugabe von MTSET mit Calcium gezeigt. **B** Auftragung der langsamen Abklingzeit tau gegen den pH-Wert. Die Behandlung mit MTSET ohne Zugabe von Calcium führte zu einer Verschiebung des  $pK_a$  von 8,8 zu 6,48, die Behandlung mit MTSET mit vorheriger Zugabe von Calcium führte zu einer Verschiebung des  $pK_a$  von 8,8 zu 8,24. Die Abbildung wurde mit Igor Pro erstellt.

Das Normalisieren der Ströme nach Testen von pH-Werten zwischen 6,8 und 9,5 zeigt auf, dass die Ströme ohne vorherige Zugabe von Calcium nach Behandlung mit MTSET enger zusammen liegen und breiter sind als mit vorheriger Zugabe von Calcium (Abbildung 6.35A). Die Analyse der langsamen Abklingzeit zeigt, dass die Behandlung mit MTSET ohne Zugabe von Calcium zu einer Verschiebung des  $pK_a$  von 8,80 zu 6,48 führte, wohingegen die Behandlung mit MTSET mit vorheriger Zugabe von Calcium lediglich eine Verschiebung des  $pK_a$  von 8,80 zu 8,24 zur Folge hatte (Abbildung 6.35B). Dies spricht stark für die anfangs gestellte Vermutung, dass es sich bei E74 um den Selektivitätsfilter von mFI handelt und dass die vorherige Zugabe von Calcium die Alkylierung in diesem Bereich verhindern könnte.

Ein Einfluss der Alkylierung auf den Selektivitätsfilter konnte gezeigt werden, weshalb die Bindestelle für Calcium oder andere zweiwertige Ionen verändert sein könnte. Deshalb wurden die Ströme untersucht, die durch verschiedene zweiwertige Ionen mit einer Konzentration von 300  $\mu$ M nach einer Alkylierungszeit von 10 min mit und ohne vorherige Zugabe von Calcium ausgelöst wurden, und mit den Strömen von unbehandeltem mFI verglichen. Wie Abbildung 6.36A zeigt, lösten immer noch Calcium, Zink und Mangan die höchsten Ströme aus. Bei Substrat-geschütztem mFI mit Calcium waren die durch Calcium ausgelösten Ströme am höchsten, bei nicht-geschütztem mFI ohne Calcium die Zink-Ströme. Durch Magnesium, Cobalt, Barium und Nickel wurden nur sehr niedrige Ströme ausgelöst (Abbildung 6.36B). Im Vergleich zu unbehandeltem mFI ist das normalisierte Peakpotenzial von Calcium deutlich höher, während es bei Mangan, Magnesium und Barium deutlich niedriger ausfällt (Abbildung

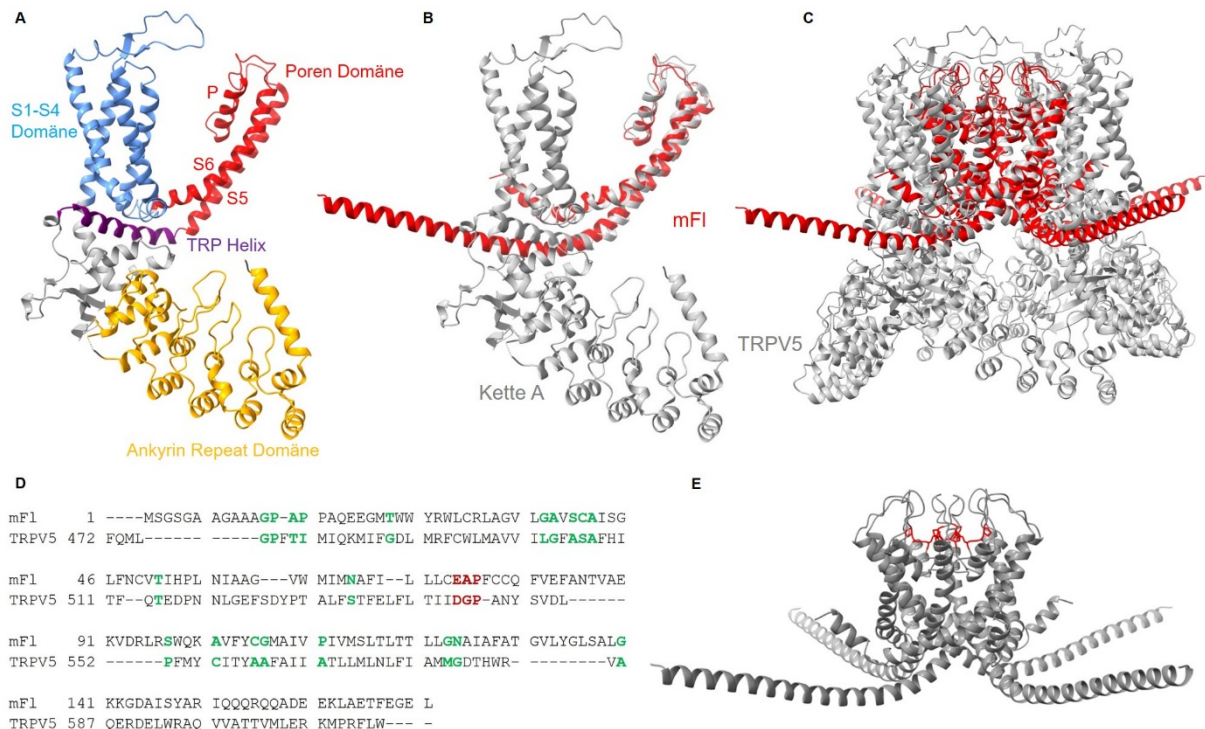
6.36C). Der Vergleich der biexponentiellen Abklingzeiten zeigt eine tendenziell schnellere Abklingzeit bei unbehandelten mFI. Die Berechnung der biexponentiellen Abklingzeit war durch die niedrigen Peaks nicht für alle Ionen möglich (Abbildung 6.36D).



**Abbildung 6.36: Durch verschiedene zweiwertige Ionen mit einer Konzentration von 300 µM ausgelöste Ströme nach Alkylierung mit MTSET. A,B** Auftragung der Ströme gegen die Zeit in vergrößerter Ansicht. Es sind die Mittelwerte aus drei Messungen nach zehnminütiger Alkylierung mit MTSET mit vorheriger Zugabe von Calcium (durchgezogene Linien) und ohne (gestrichelte Linie) gezeigt. **C** Vergleich der normalisierten Peakpotentiale bei unbehandeltem mFI (schwarz) und nach zehnminütiger Alkylierung mit MTSET mit vorheriger Zugabe von Calcium (blau) und ohne (rot). **D** Auftragung der biexponentiellen Abklingzeiten. Gezeigt sind die schnelle Phase (fast) und die langsame Phase (slow). Die Auflösungsgrenze des Sensors von 6 ms ist durch die schwarze Linie gekennzeichnet. Für alle Fits gilt  $R^2 > 0,99$ .

### 6.2.9 Erstellung eines Homologie-Modells

Da der mögliche Selektivitätsfilter im AlphaFold-Modell von der Pore weggerichtet ist, wurde aufgrund der Sequenzidentität mit dem Selektivitätsfilter von TRPV5 ein eigenes Modell nach der Methode von Madej (Madej, 2015) unter der Anleitung von Dr. Madej homolog zur Porendomäne von TRPV5 (PDB: 6DMR) mit den Programmen MODELLER und ISOLDE (Croll, 2018; Webb & Sali, 2016) erstellt. Während Proline die Faltung vorgeben, sorgen Glycine und andere kleine Reste wie Alanine oder Serine für Helix-Helix-Interaktionen, weshalb die Alinierung anhand der genannten Aminosäuren erfolgte (Madej, 2015; Popot & Engelman, 2000). Eine weitere Verfeinerung des Modells erfolgte mit WinCoot. Abbildung 6.37 zeigt die Struktur von TRPV5 und das aus der von den Helices S5 und S6 gebildeten Porendomäne erstellte Homologie-Modell von mFI.



**Abbildung 6.37: Homologie-Modell von mFI.** **A** Darstellung der Kette A von TRPV5 (PDB: 6DMR). Die wichtigsten Domänen sind farblich markiert. **B, C** Überlagerung eines mFI-Monomers mit einer Poren-Domäne von TRPV5 (grau), mFI ist rot gefärbt. **D** Sequenzalinierung von mFI und der Poren-Domäne von TRPV5. Die Alinierung erfolgte anhand der grün markierten Aminosäuren, wobei vor allem Glycin und Prolin die Topologie von Proteinen bestimmen (Madej, 2015). Die Selektivitätsfilter sind rot markiert. **E** Homologie-Modell von mFI. Das EAP-Motiv ist rot markiert.

### 6.3 Herstellung verschiedener mFI-StrepII-Varianten

Wegen des ausbleibenden Erfolgs der Kristallisation von mFI bei der angewendeten Reinigungsstrategie sollten neue Konstrukte zur Erhöhung der Stabilität des Proteins hergestellt werden. Da sich auch die Oligomerisierung durch Variation der Puffer nicht verhindern ließ, wurde versucht, diese durch Einfügen von Mutationen oder durch Erstellen verkürzter mFI-Konstrukte zu verhindern. Mit Hilfe des XtalPred Servers (Slabinski et al., 2007) wurde mFI auf seine Kristallisierbarkeit untersucht und auf dieser Grundlage neue Konstrukte kloniert. Abbildung 6.38 zeigt die Sequenz von mFI mit unterstrichen ungeordneten Bereichen, die die Kristallisation von mFI verhindern könnten.

1 MSGSGAAGAAAGPAPPAQEEGMTWYRWLCRLAGVLGAVSCAISGLFNCVTIHLNIAAGVWMIMNAFILLCEAPFCCQFVEFANTVAEKVDRLRSWQK 100  
101 AVFYCGMAIVPIVMSLTLTLLGNAIFATGVLYGLSALGKKGDAISYARIQQQRQQADEEKLAETFEFEGEL 171

**Abbildung 6.38: Vorhersage von ungeordneten Bereichen in mFI mit XtalPred** (Slabinski et al., 2007). Wahrscheinlich ungeordnete Bereiche sind unterstrichen. Das später mutierte GxxxG-Motiv ist rot markiert.

Die Beschreibung der Klonierung, Produktion und Reinigung der zwei mFI-Varianten mFIdC-StrepII und SUMOdNmFIdC-StrepII befindet sich im Anhang in Kapitel 12.13 und 12.14. Da die verkürzten Konstrukte keine Unterschiede zu mFI in Bezug auf ein verändertes Oligomerisierungsverhalten aufwiesen und nicht zu einer verbesserten Kristallisierbarkeit führten, werden sie nicht weiter beschrieben und diese Strategie nicht weiterverfolgt.

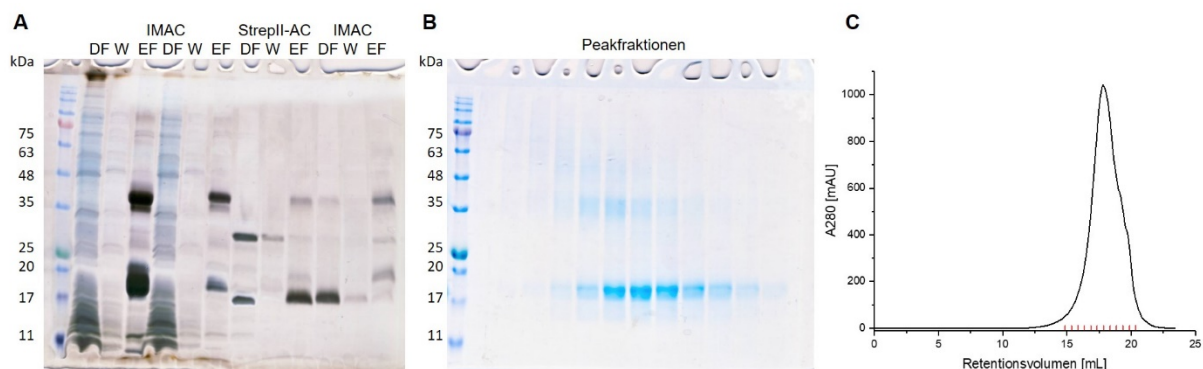


### 6.3.1 mFI(G812L)-StreptII

Das klassische GxxxG-Motiv begünstigt Helix-Helix-Interaktionen in Transmembranhelices und soll auch in löslichen Proteinen eine ähnliche Funktion haben (Kleiger et al., 2002). In den Aminosäuren 8 bis 12 besitzt mFI die Sequenz GAAAG (Abbildung 6.38). Vermutlich handelt es sich bei diesem Motiv um eine Sequenz, die die N-Termini einzelner Monomere in räumliche Nähe bringt (Kleiger et al., 2002; Teese & Langosch, 2015). Ziel der Mutation dieses Motivs war es, die mögliche Interaktion zweier Trimere oder Tetramere zu verhindern.

#### 6.3.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von mFI(G812L)-StreptII

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden die Glycine 8 und 12 zu Leucin mutiert (Kapitel 5.2.5.1), wobei abgesehen von einer *Annealing*-Temperatur von 75 °C den Herstellerangaben des *Agilent Quickchange Mutagenesis Kit I* gefolgt wurde. Als Vorlage diente das pCA528-6xHis-SUMO-mFI-StreptII-Plasmid. Nach Bestätigung des Erfolgs der zielgerichteten Mutagenese durch eine Sequenzierung erfolgte die Expression und Reinigung der Variante analog zu mFI (Abbildung 6.3).



**Abbildung 6.39: Reinigung von mFI(G812L)-StreptII.** **A** 12 %-iges SDS-Gel der Reinigung von mFI(G812L)-StreptII nach Silberfärbung. Gereinigtes mFI(G812L)-StreptII befindet sich im Durchfluss (DF) und in der Waschfraktion (W) der dritten IMAC mit Banden bei 17 und 35 kDa. **B** Gel der Peakfraktionen der SEC nach Coomassie-Färbung. **C** Elutionsprofil der SEC mit einer Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule. Im Chromatogramm wurde die Absorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Die im SDS-Gel aufgetragenen Peakfraktionen sind rot markiert.

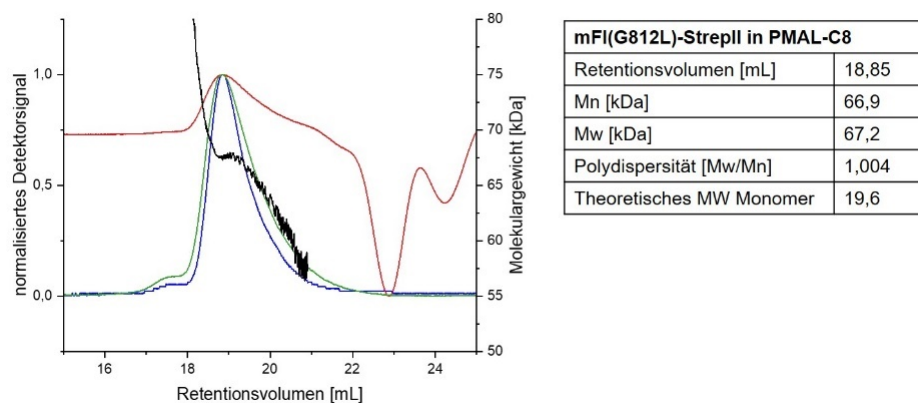
Das SDS-Gel zeigt die erfolgreiche Reinigung von mFI(G812L)-StreptII (Abbildung 6.39). Es sind klare Banden in der Durchfluss- und Waschfraktion der dritten IMAC bei 17 und 35 kDa angefärbt. Für die anschließende SEC wurden diese vereinigt, mit einem 30 kDa Konzentrator eingeeengt und auf eine mit GF1-Puffer äquilibrierte Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule aufgetragen. Das in Abbildung 6.39 gezeigte Chromatogramm weist einen spitzen Peak auf, der mit mehreren Schultern ausläuft. Das bei 17,8 mL liegende Absorptionsmaximum entspricht laut Herstellerangaben dem Laufverhalten eines löslichen Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 44 kDa. Im zugehörigen SDS-Gel ist die obere Bande bei 35 kDa im Vergleich zu mFI weniger stark ausgeprägt.

## Ergebnisse

Aus 3 L Zellkultur bzw. einem 30 g Zellpellet wurden 6 mg Protein gereinigt, was einer Proteinausbeute von 2 mg/L Expressionskultur entspricht. Somit ist die Ausbeute im Vergleich zu mFI mit bis zu 4,4 mg/L geringer.

### 6.3.1.2 Molekulargewichtsbestimmung von mFI(G812L)-StreptII in PMAL-C8

Das Laufverhalten bei der SEC und die stärkere Bande bei 17 kDa lassen bereits vermuten, dass es sich bei der mFI(G812L)-Variante um kleinere Oligomere handeln könnte als bei mFI. Deshalb wurde eine SEC in Kombination mit einer RI- und RALS-Messung zur Bestimmung des Molekulargewichts durchgeführt, wobei zuvor eine Rekonstitution in PMAL-C8 erfolgte. Zusätzlich wurde die Polydispersität im Hinblick auf die Kristallisation untersucht. Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung sind in Abbildung 6.40 dargestellt.

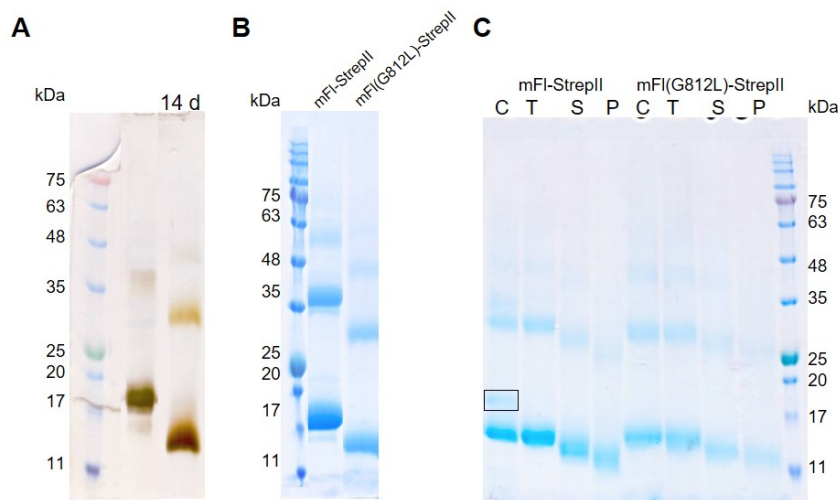


**Abbildung 6.40: Molekulargewichtsbestimmung von mFI(G812L)-StreptII in PMAL-C8 durch SEC mit RI- und RALS-Messung.** 200 µL gereinigtes mFI(G812L)-StreptII (29 mg/mL) wurde auf eine Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule, die mit GF1-Puffer äquilibriert war, injiziert. Es wurden die normalisierten Signale des UV-, RI- und RALS-Detektors gegen das Retentionsvolumen aufgetragen, wobei das UV-Signal in blau, das RALS-Signal in grün, das RI-Signal in rot dargestellt ist. Das berechnete Molekulargewicht wurde gegen das Retentionsvolumen aufgetragen und ist in schwarz dargestellt. Das Retentionsvolumen in der Tabelle entspricht der Mitte des Peaks. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 67,2 kDa.

In der Mitte des Peaks wurde ein Molekulargewicht von 67,2 kDa bestimmt. Mit einem Wert von 1 für den Quotienten aus Mw/Mn handelt es sich um eine monodisperse Probe. Wegen der zuvor festgestellten erfolglosen Rekonstitution von mFI in PMAL-C8 (Abbildung 6.7) ist anzunehmen, dass das gleiche für mFI(G812L)-StreptII gilt und der Einfluss von PMAL-C8 vernachlässigt werden kann. Somit bildet mFI(G812L) in PMAL-C8 vermutlich ein Trimer.

### 6.3.1.3 Abbau von mFI(G812L)-StreptII

Da mFI(G812L)-StreptII monodispers als mögliches Trimer vorliegt, würde es sich für die Kristallisation eignen. Allerdings wurde ein Ausfallen der Variante im Reaktionsgefäß bereits nach einigen Tagen beobachtet. Zusätzlich wurde nach Analyse in einer SDS-PAGE ein rascher Abbau des Proteins festgestellt. Abbildung 6.41 zeigt eine Verschiebung der beiden ursprünglichen Banden bei 17 und 35 kDa nach 14 Tagen zu niedrigeren Molekulargewichten von etwa 13 und 30 kDa. Dies zeigt, dass ein klar definierter Teil des Proteins verloren geht.



**Abbildung 6.41: 12 %-iges SDS-Gel zweier mFI(G812L)-StreptII-Proben nach Silberfärbung und limitierter Proteolyse von mFI und mFI(G812L)-StreptII.** **A** Auftragung einer Probe im Anschluss an die SEC und einer Probe nach 14-tägiger Lagerung (14d) bei 4 °C. Die Lagerung führt zum Abbau des Proteins. **B** Proben von mFI und mFI(G812L) vor Verdau. **C** Analyse des proteolytischen Verdaus mit Chymotrypsin (C), Trypsin (T), Subtilisin (S) und Papain (P) in einem 12 %-igen SDS-Gel nach Coomassie-Färbung.

Mittels limitierter Proteolyse sollte der bei mFI(G812L)-StreptII abgebaute Bereich näher eingegrenzt werden, indem untersucht wurde, ob sich mFI und mFI(G812L)-StreptII beim Verdau durch Proteasen unterschiedlich verhalten. Dazu wurde mit beiden Proteinen in einer Konzentration von 15 mg/mL mit den Proteasen Chymotrypsin, Trypsin, Subtilisin und Papain in einer 1:100 Verdünnung die Proteolyse nach Herstellerangaben durchgeführt (Kapitel 5.10.4), sodass ein Protease-zu-Protein-Verhältnis von 1:750 vorlag. Im SDS-Gel (Abbildung 6.41C) läuft mFI nach dem proteolytischen Verdau durch die vier Proteasen auf der gleichen Höhe wie mFI(G812L)-StreptII, wohingegen die Banden von mFI(G812L)-StreptII im Vergleich zu mFI vor dem Verdau eine Verschiebung nach unten zeigten (Abbildung 6.41B). Während beim Verdau durch Trypsin, Subtilisin oder Papain kein Unterschied zu erkennen war, wurde mit Chymotrypsin bei mFI eine zusätzliche Bande bei 17 kDa identifiziert, die bei mFI(G812L)-StreptII fehlte. Folglich zeigt dies einen N-terminalen Abbau von mFI(G812L)-StreptII an, da Chymotrypsin die Hydrolyse nach Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin katalysiert (Wernimont & Edwards, 2009), die vorwiegend im N-Terminus von mFI vorkommen.

#### 6.3.1.4 Kristallisation von mFI(G812L)-StreptII

Nach abgeschlossener SEC erfolgte die Kristallisation von mFI(G812L)-StreptII unter Verwendung kommerziell erhältlicher Kristallisationsscreens. Aus den hergestellten Kristallisationsansätzen konnten insgesamt 115 Kristalle geerntet werden, mit denen am ESRF Röntgenbeugungsexperimente durchgeführt wurden. Allerdings führte keiner dieser Kristalle zu einem für Proteine typischen Diffraktionsbild.

### 6.4 Interaktion von mFI-StreptII und Calmodulin

Die SSM-basierte Elektrophysiologie zeigte, dass es sich bei mFI um einen Calcium-Kanal handelt, woraufhin eine Untersuchung der Interaktion mit Calmodulin (CaM) erfolgte.

## Ergebnisse

Calmodulin als typischer Regulator von Calcium-Kanälen spielt eine Rolle bei der Auslösung der Endozytose (Saimi & Kung, 1994, 2002; Wu et al., 2014). Außerdem wird das Calmodulin-Homolog Azot aus *D. melanogaster* nach Markierung durch eine dFwe-Lose-Isoform hochreguliert, was die Apoptose auslöst (Merino et al., 2015).

### 6.4.1 Identifikation einer möglichen Calmodulin-Bindestelle

Mit Hilfe der Calmodulin *Target Database* (Yap et al., 2000) wurde eine mögliche Calmodulin-Bindestelle in mFI identifiziert, die in Abbildung 6.42 durch die Zahl 9 markiert ist und in der Nähe des C-Terminus liegt. Allerdings handelt es sich dabei nicht um ein typisches IQ-Motiv mit der Konsensus-Sequenz IQxxxRGxxxR (Tidow & Nissen, 2013).

Da deshalb unklar ist, welche der identifizierten Aminosäuren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine CaM-Bindung für die Bindung essenziell sind, sollte zunächst mit Hilfe von vier den C-Terminus von mFI abdeckenden Peptiden die mögliche Bindestelle eingegrenzt werden. Die Sequenzen der Peptide P1 bis P4 sind in Abbildung 6.42 farblich markiert.



**Abbildung 6.42: Sequenzanalyse mit Hilfe der Calmodulin Target Database zur Ermittlung möglicher Calmodulin-Bindestellen in mFI (Yap et al., 2000) und GST-Pulldown-Assay.** Den Aminosäuren werden Zahlen von 0 (Bindung unwahrscheinlich) bis 9 (Bindung wahrscheinlich) zugeordnet. Der C-Terminus von mFI wurde in Peptide unterteilt, um mit Hilfe von Interaktionsstudien die genaue Bindestelle eingrenzen zu können. Die Peptide wurden in der AG Jung hergestellt. Für P1 und P2 konnte in einem GST-Pulldown-Assay nach einer SDS-PAGE (18 %-iges Gel) mit anschließender Silber-Färbung eine Bindung gezeigt werden.

### 6.4.2 Interaktion von Calmodulin mit mFI-Peptiden

Mit den vier von der AG Jung (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, UdS) hergestellten mFI-Peptiden wurde die Interaktion von mFI und CaM untersucht.

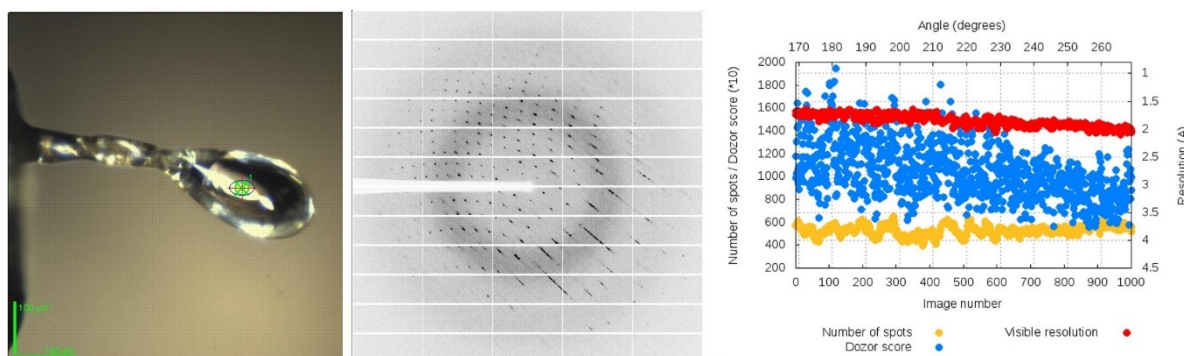
Zunächst wurde ein GST-Pulldown-Assay mit GST-Calmodulin, wie in Kapitel 5.8.3 beschrieben, durchgeführt (Abbildung 6.42). Im Waschschrift vor der Elution wurde kein Peptid nachgewiesen, während in den Elutionsfraktionen von P1 und P2 Banden der Peptide mit einem Molekulargewicht von 2 kDa im unteren Bereich des Gels angefärbt wurden. Eine Bindung von P3 und P4 war nicht nachweisbar.



### 6.4.3 Kristallisation und Aufnahme von Datensätzen von Calmodulin mit mFI-Peptiden

Nach dem Nachweis der Bindung der Peptide P1 und P2 durch CaM sollten die Komplexe kristallisiert werden. Da Flower kein klassisches CaM-Bindemotiv besitzt, soll die Aufklärung der Struktur von CaM mit den das Bindemotiv enthaltenden Flower-Peptiden genaueren Aufschluss über die Interaktion von mFI und CaM geben. Die Struktur dieser Komplexe könnte später zur Strukturaufklärung eines mFI-CaM-Komplexes bei der Lösung des Phasenproblems durch molekularen Ersatz beitragen.

Zur Kokristallisation wurden die CaM und Peptid enthaltenden Fraktionen der SEC auf etwa 15 mg/mL konzentriert und mit einem zusätzlichen fünffach molaren Peptidüberschuss versetzt. Verschiedene Sparse-Matrix-Screens (ProPlex, Wizard 1+2, PEG/Ion 1+2) wurden mittels Pipettierroboter angesetzt. Kristalle des CaM-P1-Komplexes wurden nach etwa 16 Monaten geerntet, die Ernte der CaM-P2-Kristalle erfolgte nach 8 Monaten. Mit insgesamt 165 Kristallen wurde Röntgenbeugungsexperimente am SLS und ESRF durchgeführt, wobei von den am besten streuenden Kristallen Datensätze aufgenommen wurden. Für den CaM-P1- und CaM-P2-Komplex wurde jeweils der Datensatz mit der besten Statistik und Auflösung prozessiert. In Abbildung 6.43 ist ein Diffraktionsbild des CaM-P2-Kristalls sowie eine vorläufige über die automatische Pipeline des ESRF erfolgte Analyse des Datensatzes abgebildet.



**Abbildung 6.43: Diffraktionsbild von CaM-P2, Kristallbild und vorläufige Analyse des Datensatzes.** In der Mitte ist ein Diffraktionsbild des links abgebildeten Kristalls dargestellt. Die erste Analyse des Datensatzes zeigt, dass der Kristall gleichmäßig bis etwa 2 Å Auflösung streut und die Spots gleichmäßig verteilt sind.

Die erste Prozessierung des CaM-P1-Datensatzes erfolgte am SLS über die automatische Datenprozessierung mittels XDS (Kabsch, 2010). Der Datensatz hatte eine Auflösung bis 2,08 Å. Um ein  $I/\sigma$  von  $> 2$  zu erreichen und den  $CC_{1/2}$ -Wert zu verbessern, wurden die Daten bei 2,15 Å mit dem Programm AIMLESS (Evans, 2006) geschnitten. Für die Prozessierung des CaM-P2-Datensatzes wurde die automatische Xia2-Prozessierung des ESRF verwendet (Evans, 2006; Evans & Murshudov, 2013; Winn et al., 2011; Winter, 2010) und die Auflösung betrug 1,87 Å. Die zugehörigen Daten zur Analyse der Datensätze sind in Tabelle 6.7 angegeben.

## Ergebnisse

**Tabelle 6.7: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für CaM-P1 und CaM-P2.** Angegeben sind die experimentellen und verfeinerten Daten. In Klammern sind die Parameter in der höchsten Auflösungsschale angegeben.

	<b>Ca<sup>2+</sup>-CaM-P1</b>	<b>Ca<sup>2+</sup>-CaM-P2</b>
Bedingung	0,2 M Kaliumiodid, 0,1 M MES pH 6,5, 25 % PEG4000 (ProPlex C12)	0,02 M Zitronensäure. 0,08 M Bis-Tris Propan pH 8,8, 16 % PEG3350 (PEG/Ion 2 41)
<b>Datensammlung</b>		
Beamline	PXIII (SLS)	ID23-1 (ESRF)
Detektor (Abstand)	Pilatus (300)	Pilatus (357,95)
Temperatur [K]	100 K	100 K
Wellenlänge [Å]	1,0	0,979
Belichtungszeit (s)	0,1	0,1
Rotation (°)	0,2	0,1
Auflösungsbereich	48,70 – 2,15 (2,22 – 2,15)	154,22 – 1,9 (2,0 – 1,87)
Raumgruppe	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22
Einheitszellparameter a, b, c [Å]	40,495 40,495 340,13	39,578 39,578 325,506
Einheitszellparameter $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ [°]	90, 90, 120	90, 90, 120
Anzahl gemessener Reflexe	163550 (9690)	123729 (18055)
Anzahl einzigartiger Reflexe	10187 (830)	13234 (1827)
Multiplizität	16,1 (11,7)	9,3 (9,9)
Vollständigkeit [%]	99,8 (98,2)	99,9 (100)
Mosaizität (°)	0,234	0,12
$I/\sigma(I)$	15,5 (2,7)	11,0 (2,2)
$R_{\text{merge}}$ [%]	9,8 (76,6)	10,8 (36,5)
$R_{\text{meas}}$ [%]	10,3 (83,1)	11,4 (38,5)
$R_{\text{pim}}$ [%]	3,3 (31,8)	3,7 (11,9)
$CC_{1/2}$	0,999 (0,784)	0,999 (0,937)
<b>Strukturverfeinerung</b>		
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ [%]	25,13 / 30,69	21,82 / 26,33
mittlerer B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	53,571	50,207
mittlerer B-Faktor Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	47,291	44,688
Ramachandran		
favorisiert [%]	142 (94 %)	150 (99,3 %)
erlaubt [%]	8 (5,3 %)	1 (0,7 %)
nicht erlaubt [%]	1 (0,7 %)	0 (0 %)

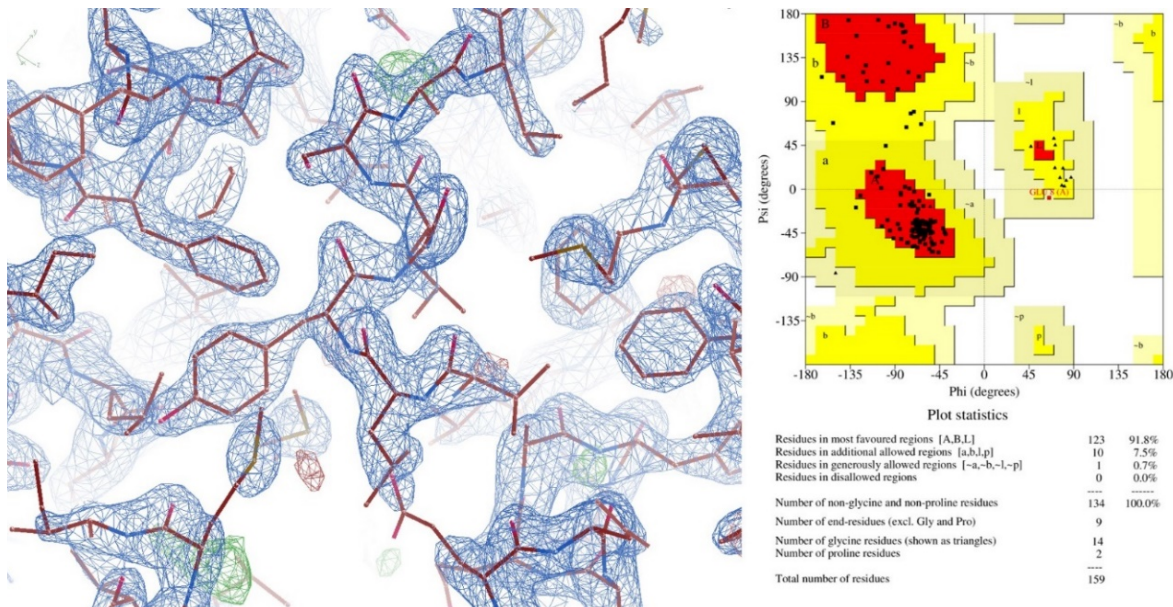
Für beide Komplexe wurde die Raumgruppe P6<sub>1</sub>22 mit den Zellparametern a=b=40,5 Å, c=340,1 Å für CaM-P1 und a=b=39,6 Å, c=325,5 Å für CaM-P2 mit  $\alpha=\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$  ermittelt. Der Matthews-Koeffizient beträgt für beide Komplexe 2,32 Å<sup>3</sup>/Da mit einem Lösungsmittel-Gehalt von 47 %, sodass angenommen werden kann, dass sich ein Molekül in der asymmetrischen Einheit befindet (Matthews, 1968).

### 6.4.4 Prozessierung der Datensätze und Verfeinerung der Strukturen

Die Prozessierung der Datensätze erfolgte, wie in Kapitel 5.10.13 beschrieben. Die Phasierung beider Datensätze mittels molekularen Ersatzes erfolgte mit MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) unter Verwendung einer Calmodulin-Struktur mit einem TRPV1-Peptid (PDB: 3SUI, Lau et al., 2012), aus der das vorhandene Peptid entfernt wurde. Wegen der höheren Auflösung des CaM-P2-Datensatzes und den gleichen vorhandenen Aminosäuren wird dieser genauer beschrieben und der CaM-P1-Datensatz nur zum Vergleich herangezogen.

Der Modellbau wurde mit WinCoot durchgeführt (Emsley & Cowtan, 2004) und die Struktur mit REFMAC (Murshudov et al., 1997) für CaM-P2 bis zu einem R-Faktor von 21,82 % und einem freien R-Faktor von 26,33 % verfeinert. Das fertige Modell von CaM-P2 enthält die CaM-Reste 4-147 und die mFI-Reste 131-140 (GVLYGSALG). 99,3 % der Reste liegen in bevorzugten Regionen, 0,7 % in erlaubten und 0 % in unerlaubten Regionen des Ramachandran-Plots (Ramakrishnan & Ramachandran, 1965).

Der Datensatz von CaM-P1 ließ sich bis zu einem R-Faktor von 25,13 % und einem freien R-Faktor von 30,69 % verfeinern. Eine Elektronendichte für die mFI-Peptidreste GVLYSALG wurde identifiziert und die entsprechenden Aminosäuren eingesetzt. 94 % der Reste liegen in bevorzugten, 1 % in erlaubten und 0 % in unerlaubten Regionen des Ramachandran-Plots. Abbildung 6.44 zeigt einen Ausschnitt der Elektronendichtekarte von CaM-P2 mit der Dichte des Peptids im Zentrum bei einer Auflösung von 1,87 Å und den Ramachandran-Plot. Während der Verfeinerung wurden 86 Wassermoleküle eingebaut.

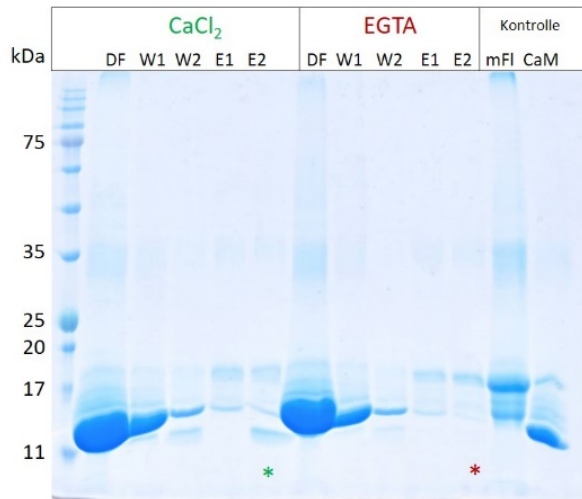


**Abbildung 6.44: Elektronendichtekarte von CaM-P2 bei einem Konturlevel von  $\sigma \sim 1,5$  und Ramachandran-Plot.** Im Zentrum der Elektronendichtekarte ist die Dichte des Peptids gezeigt. Der mit PROCHECK (Laskowski et al., 1993) erstellte Ramachandran-Plot zeigt 91,8 % der Reste in bevorzugten, 7,5 % in zusätzlich erlaubten, 0,7 % in erlaubten und 0 % in unerlaubten Regionen an.

#### 6.4.5 Die Interaktion von mFI-StrepII und Calmodulin ist Calcium-abhängig

Nachdem die Experimente mit den Peptiden eine Interaktion des vorhergesagten Bindemotivs von mFI mit Calmodulin zeigten, sollte die Interaktion von mFI und CaM untersucht werden. Dazu wurde ein StrepII-Pulldown Assay mit mFI und CaM in Anwesenheit von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  oder 10 mM EGTA durchgeführt. Die einzelnen Proben wurden in einer SDS-PAGE analysiert. Das SDS-Gel nach Coomassie-Färbung ist in Abbildung 6.45 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 6.45: StreptII-Pulldown-Assay mit mFI und CaM.** Analyse der Proben in einem 12 %-igen SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. Der Assay wurde in An- und Abwesenheit von Calcium durchgeführt. mFI wurde an die StreptII-Matrix gebunden. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe von 1,4 mM CaM und eine zweistündige Inkubation. Nach erneutem Waschen (W1 und W2) erfolgte die Elution mit Desthiobiotin. Nur bei Zugabe von Calcium konnte eine Interaktion nachgewiesen werden (grüner Stern). Zum Vergleich wurden beide Proteine einzeln aufgetragen (Kontrolle).

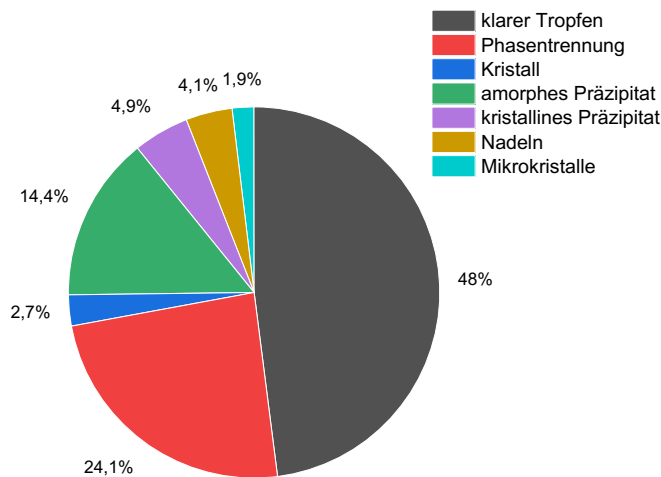
In Anwesenheit von Calcium sind in der Elutionsfraktion E2 sowohl die Banden von mFI als auch von CaM sichtbar, während in Abwesenheit von Calcium in E2 keine Bande von CaM nachgewiesen werden konnte. Die Interaktion von mFI und CaM ist somit Calcium-abhängig.

### 6.4.6 Kokristallisation von mFI-StreptII und Calmodulin

Nachdem mittels Pulldown-Assay die Interaktion von mFI und CaM nachgewiesen wurde, sollte der Komplex, wie in Kapitel 5.10.8 beschrieben, kokristallisiert werden. Das gut zu kristallisierende Calmodulin könnte an mFI gebunden als Kristallisationschaperon zusätzliche Kristallkontakte herstellen, die mFI allein aufgrund des gebundenen Detergenz nicht ausbilden kann. Außerdem könnte CaM durch seine Bindung den flexiblen C-Terminus von mFI stabilisieren.

Vor dem Mischen beider Proteine in verschiedenen molaren Verhältnissen wurde in Fos12 gereinigtes mFI 1:1 mit Detergenz-freiem GF1-Puffer (Tris pH 8) verdünnt. In Abbildung 6.46 sind die prozentualen Anteile der möglichen Ereignisse von 1440 Bedingungen nach acht Wochen angegeben. In fast der Hälfte der Bedingungen waren klare Tropfen vorhanden, in 2,8 % der Tropfen Kristalle und in 4 % der Tropfen Nadelkristalle.





**Abbildung 6.46: Bewertung von Kristallisationsansätzen nach Kokristallisation von mFI und Calmodulin.** mFI und Calmodulin wurden in Anwesenheit von 20 mM  $\text{CaCl}_2$  mit einer Konzentration von 12 mg/mL kristallisiert. Die Bewertung der 1440 Tropfen erfolgte nach 8 Wochen. Es sind die prozentualen Anteile möglicher Kristallisationsereignisse dargestellt. In etwa 50 % der Bedingungen lag ein klarer Tropfen vor, während in nur 2,8 % der Tropfen Einkristalle entstanden sind.

Neben dem großen Anteil klarer Tropfen und Phasentrennung bildeten sich Kristalle, die sich aufgrund ihrer Größe für Röntgenbeugungsexperimente eigneten. An den 329 Kristallen konnte keine für Proteine typische Röntgenbeugung gemessen werden.

## 6.5 Nanobodies für mFI-StreptII

Nachdem Calmodulin als Kristallisationschaperon die Kristallisation von mFI nicht begünstigte, wurde auf Nanobodies als klassische Kristallisationschaperone zurückgegriffen. Sie sollen die Kristallisationswahrscheinlichkeit durch ihre hochaffine Bindung erhöhen, indem sie die Struktur oder eine bestimmte Konformation stabilisieren und dadurch eine neue Oberfläche für Kristallkontakte schaffen (Koide, 2009).

### 6.5.1 Herstellung der Nanobodies

Von der AG Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM, UdS) wurden Nanobodies (NBs) gegen mFI nach dem Protokoll von Pardon generiert (Pardon et al., 2014). Für die Expression wurde der *E. coli* Stamm WK6 verwendet, dessen *pelB*-Leadersequenz die Periplasma-Extraktion erlaubt.

### 6.5.2 Auswahl, Expression und Reinigung der Nanobodies

Eine Vorauswahl der Nanobodies und die Identifizierung der Epitope führte die AG Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM, UdS) durch. Dabei wurde die Funktion durch Immunzytochemie oder im Western-Blot mit Hirnlysate von Mäusen oder mit Hilfe von mFI-Peptiden überprüft. Es wurden 7 bindende Nanobodies identifiziert und nach der Position in der 96-well Platte bezeichnet, in der sie angezogen wurden.

Die ausgewählten Nanobodies sowie die durch *Peptid Spot Arrays* identifizierten Epitope sind in Tabelle 6.8 angegeben.

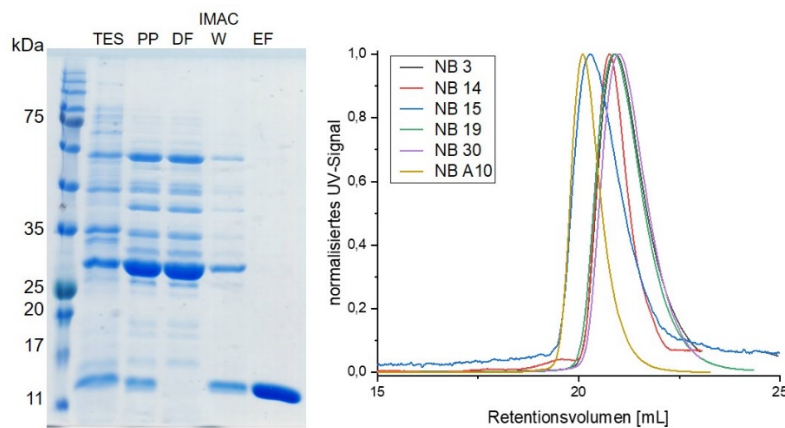
## Ergebnisse

**Tabelle 6.8: Epitope ausgewählter Nanobodies und ihre Position in mFI.** Die Bestimmung der Epitope erfolgte durch Peptid Spot Arrays, die in der AG Rettig durchgeführt wurden. Epitope in Klammern waren nicht eindeutig.

Nanobody	Binde-Epitop	Position in mFI
NB3	PFCCQFVEFANTVAEKV	Exon 3
NB14	QQQRQQADEEKLAETFE	C-Terminus
NB15	(PFCCQFVEFANTVAEKV)	Exon 3
NB19	QQQRQQADEEKLAETFE	C-Terminus
NB30	PFCCQFVEFANTVAEKV	Exon 3
NBA10	QQQRQQADEEKLAETFE	C-Terminus
NBAa5	(QQQRQQADEEKLAETFE)	C-Terminus

Die Nanobodies wurden, wie in Kapitel 5.13 beschrieben, exprimiert und gereinigt. Die gereinigten NBs 15 und A10 stellte die AG Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM, UdS) zur Verfügung.

In Abbildung 6.47 sind beispielhaft die erfolgreiche Reinigung von NB14 sowie die Elutionsprofile der SECs der getesteten Nanobodies abgebildet.

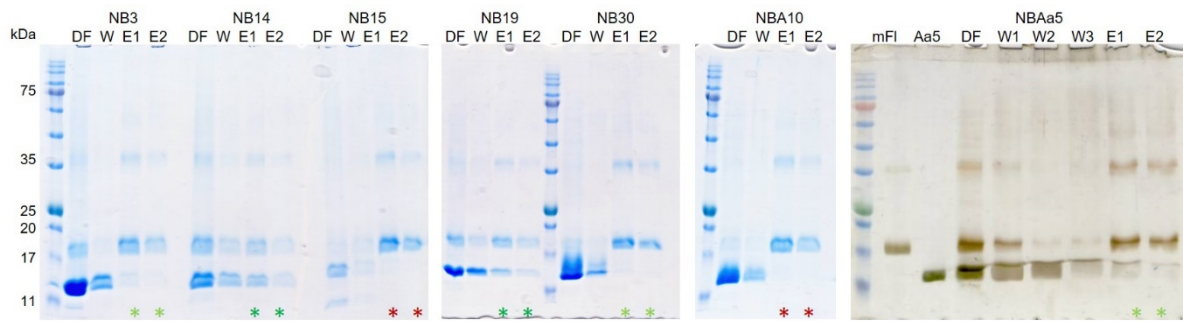


**Abbildung 6.47: 12 %-iges SDS-Gel der Reinigung von NB14 und Chromatogramme der SECs ausgewählter Nanobodies.** Die Proteinabsorption der Nanobodies bei 280 nm wurde normiert und gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Die SECs wurden auf einer Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule durchgeführt.

Die klare Bande in der Elutionsfraktion EF im SDS-Gel der Reinigung von NB14 bei etwa 14 kDa bestätigt den Erfolg der Reinigung. Alle Nanobodies zeigen bei der SEC ein ähnliches Elutionsverhalten mit einem symmetrischen Peak bei etwa 21 mL, wobei NB15 und NBA10 früher eluieren. Das Retentionsvolumen entspricht laut Herstellerangaben einem Molekulargewicht von 6,5 kDa. Durch eine SEC gekoppelt an eine RALS- und RI-Messung wurde ein Molekulargewicht von 13,8 kDa bestimmt (Abbildung 12.32).

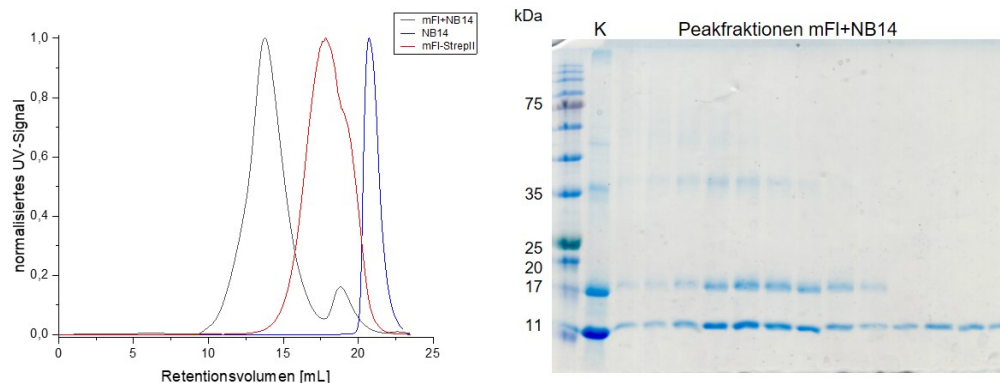
### 6.5.3 Interaktion von mFI-StreptII mit ausgewählten Nanobodies

Mittels StreptII-Pulldown-Assay wurde überprüft, ob die ausgewählten Nanobodies auch das rekombinant exprimierte und gereinigte mFI binden. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie- bzw. Silber-Färbung analysiert (Abbildung 6.48). Für NB15 und NBA10 konnte keine Bindung nachgewiesen werden, für NB3, NB30 und NBAa5 eine leichte Bindung und für NB14 und NB19 eine eindeutige Bindung. Für die drei letztgenannten wurde das gleiche Epitop bestimmt, weshalb vorerst nur mit NB14 weitergearbeitet wurde.



**Abbildung 6.48: StreptII-Pulldown-Assay mit mFI und ausgewählten Nanobodies.** Es sind die 12 %-igen SDS-Gele nach Coomassie-Färbung (rechts Silberfärbung) gezeigt. Ein hellgrüner Stern zeigt eine leichte Bindung an (NB3, NB30, NBAa5), ein dunkelgrüner Stern eine Bindung (NB14, NB19) und ein roter Stern keine Bindung (NB15, NBA10).

NB14 bindet den flexiblen C-Terminus von mFI und könnte zu dessen Stabilität beitragen. Deshalb wurde die Interaktion von mFI und NB14 durch eine SEC weiter mit dem Ziel der Kristallisation des Komplexes untersucht. Dazu wurde mFI mit einem 1,2-fach molaren NB14-Überschuss in einem Volumen von 500  $\mu$ L für zwei Stunden bei 4  $^{\circ}$ C unter Rotieren inkubiert und anschließend auf eine Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule injiziert, die in GF1-Puffer (50 mM Tris pH 8, 75 mM KCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,075 % Fos12) äquilibriert war. Die starke Linksverschiebung des Komplex-Peaks zeigt die Interaktion von mFI und NB14, die sich nach Analyse der Peakfraktionen mittels SDS-PAGE nach anschließender Coomassie-Färbung bestätigt (Abbildung 6.49). Bei dem ersten Peak handelt es sich um den Komplex, während im zweiten, schwachen Peak reiner NB14 vorliegt. Die optisch gleich starke Färbung der Banden und die starke Linksverschiebung deuten auf eine 1:1 Bindung von mFI und NB14 hin, wobei ein mFI-Monomer ein NB14 bindet.



**Abbildung 6.49: SEC von einem mFI-NB14-Komplex, NB14 und mFI.** Analytische SECs mit einer Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule in GF1-Puffer. Es wurde die normalisierte Proteinabsorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Das 12 %-ige SDS-Gel zeigt die Peakfraktionen des mFI-NB14-Komplexes. Die Probe vor Injektion wurde mit K bezeichnet. Bei 17 und 35 kDa zeigen sich Banden von mFI, die Bande bei etwa 11 kDa stammt von NB14.

#### 6.5.4 Kristallisation von NB14 mit dem Flower-Peptid P4

Nach dem Nachweis der Interaktion von mFI und NB14 durch einen Pulldown-Assay und eine SEC sollte NB14 zunächst mit dem Epitop von mFI enthaltenden mFI-Peptiden kristallisiert werden. Die Struktur dieses Komplexes soll als Suchmodell für die Phasierung mittels molekularen Ersatzes für den Vollängen-Komplex aus mFI und NB14 dienen. Es standen zwei

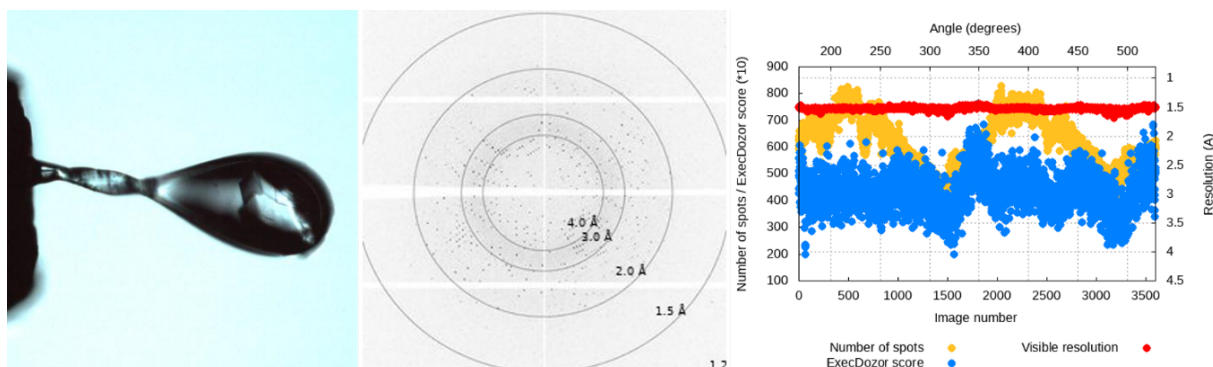
## Ergebnisse

in der AG Jung synthetisierte Peptide zur Verfügung. Die Sequenzen der Peptide sind in Abbildung 6.50 markiert und decken das Epitop ab. Da nicht bekannt ist, welche Aminosäuren des Epitops essenziell für die Bindung sind, wurde mit beiden Peptiden P3 und P4 eine SEC mit NB14 durchgeführt. Dazu wurden 150 µL NB14 (15 mg/mL) mit 30 µL P3 oder P4 (45 mg/mL), was etwa einem fünffach molaren Peptidüberschuss entspricht, über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Die Elutionsprofile nach Injektion auf eine mit 50 mM Tris pH 7,4 und 150 mM NaCl äquilibrierte Superdex 75 10/300 pg-Säule sind in Abbildung 6.50 rechts gezeigt.



**Abbildung 6.50: Sequenzen der Peptide, die das Epitop (P4) bzw. einen Teil des Epitops (P3) enthalten und analytische SEC von NB14 allein und im Komplex mit P3 oder P4.** Die Peptide wurden von der AG Jung synthetisiert. Dargestellt ist die Sequenz von mFI. Die Peptide P3 und P4 sind farblich markiert. Rechts sind die Elutionsprofile der analytischen SECs von NB14 (schwarz), NB14 mit P3 (rot) und NB14 mit P4 (blau) nach Injektion auf eine Superdex 75 10/300 pg-Säule, die in 50 mM Tris pH 7,4 und 150 mM NaCl äquilibriert wurde, dargestellt. Es wurde die normalisierte Absorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen.

Eine Bindung von P3 erfolgte nicht. Die Linksverschiebung des Peaks von NB14 mit P4 zeigt eine Interaktion von NB14 und P4 an, weshalb dieser Komplex anschließend kristallisiert wurde. Dazu wurden 1,3 mM NB14 mit 2,6 mM P4 inkubiert. Nach einer SEC wurde der Peak mit Hilfe eines 3 kDa-Konzentrators bis zu einer Konzentration von 20 mg/mL eingengt. Zusätzlich wurden 90 µL NB14 (1 mM, 15 mg/mL) mit 10 µL P4 (22,5 mM, 45 mg/mL) inkubiert und anschließend direkt kristallisiert. Letztere Methode stellte sich als erfolgreicher heraus. Die Kristallisation erfolgte mit Hilfe des 0,3 µL Protein- und 0,3 µL Reservoirlösungs-Tropfen setzenden Kristallisationsroboters, wobei die Screens PEG/Ion 1+2, ProPlex, HR Cryo/ JBS Classic und Wizard 1+2 (Tabelle 4.18) verwendet wurden. An den zahlreich entstandenen, nach etwa 6 Monaten geernteten Kristallen wurden Röntgendiffraktionsexperimente durchgeführt. Von den insgesamt 193 gemessenen Kristallen wurden mehrere Datensätze aufgenommen und der Datensatz mit der besten Auflösung und Statistik analysiert (Abbildung 6.51).



**Abbildung 6.51: Bild des Kristalls in der Nylonschleife, zugehöriges Diffraktionsbild und Analyse des Datensatzes.** Eine erste Analyse des Datensatzes zeigt, dass der Kristall gleichmäßig bis etwa 1,5 Å streut.

### 6.5.5 Strukturanalyse des NB14-P4 Komplexes

Der Kristall von NB14-P4 besitzt die Raumgruppe  $P4_22_12$  mit den Zellparametern  $a=b=72,66$  Å,  $c=46,84$  Å und  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . Der Matthews-Koeffizient beträgt  $2,01$  Å<sup>3</sup>/Da bei einem Lösungsmittelgehalt von 38,93 % (Matthews, 1968). Die erste Prozessierung des Datensatzes erfolgte durch die automatische Prozessierungs-Pipeline des ESRF mit den Programmen autoPROC (Vonrhein et al., 2011), XDS (Kabsch, 2010), POINTLESS (Evans, 2006), AIMLESS (Evans & Murshudov, 2013), CCP4 (Winn et al., 2011) und STARANISO (Vonrhein et al., 2018). Die weitere Prozessierung des Datensatzes fand mit dem Programmpaket CCP4 statt. Der Kristall streute bis 1,17 Å, wobei die Daten für  $I/\sigma > 2$  mit dem Programm AIMLESS (Evans & Murshudov, 2013) bei 1,43 Å geschnitten wurden. Die Phasierung erfolgte mit dem Programm MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) durch molekularen Ersatz unter Verwendung eines durch SWISS-Model erstellten Strukturmodells (Waterhouse et al., 2018). Der Modellbau wurde mit WinCoot (Emsley & Cowtan, 2004) durchgeführt und die Struktur mit REFMAC (Murshudov et al., 1997) bis zu einem R-Faktor von 17,61 % und einem freien R-Faktor von 20,22 % verfeinert. Im Modell sind alle Aminosäuren des Nanobodies enthalten und es wurden während der Verfeinerung 116 Wassermoleküle eingebaut. Eine vollständige Dichte des C-Terminalen Hexahistidin-Anhängsels ist nicht vorhanden, sodass nur das erste Histidin und ein Alanin eingesetzt werden konnten. Es wurde eine zusätzliche Elektronendichte außerhalb der Dichte des Nanobodies detektiert. Diese konnte den vom P4 stammenden Aminosäuren QADEEKLAETFEGEL zugeordnet werden, die den Aminosäuren 157-171 in mFI entsprechen. 97,8 % aller Reste liegen in bevorzugten, 2,2 % in erlaubten und keine in unerlaubten Regionen des Ramachandran-Plots (Ramakrishnan & Ramachandran, 1965). Die Datenstatistik ist in Tabelle 6.9 angegeben.

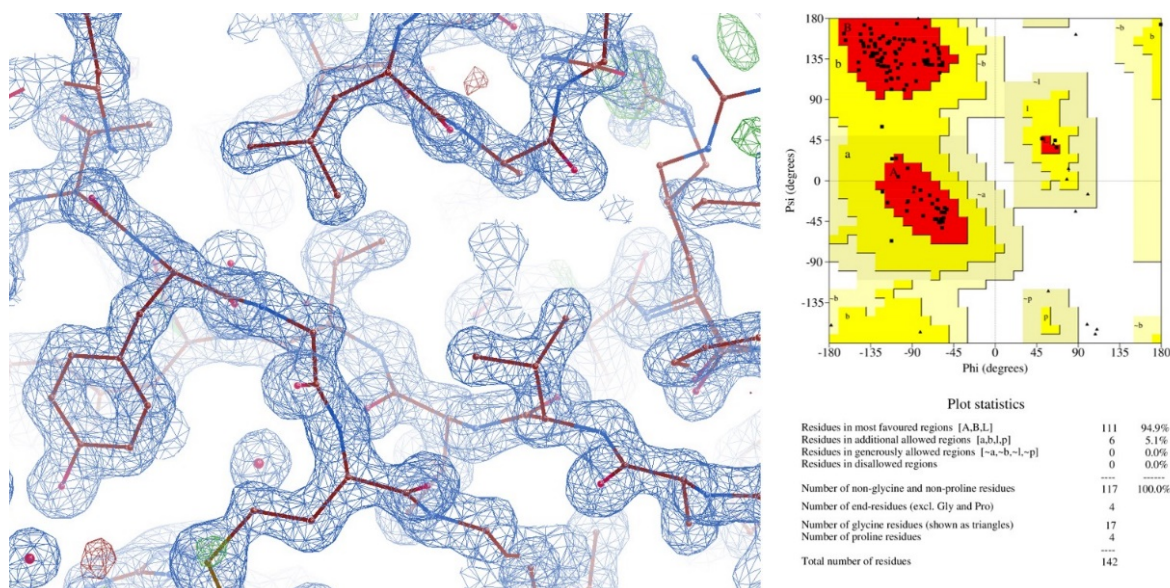


## Ergebnisse

**Tabelle 6.9: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik für NB14-P4.** Angegeben sind die experimentellen und verfeinerten Daten. In Klammern sind die Parameter in der höchsten Auflösungsschale angegeben.

	<b>NB14-P4</b>
Bedingung	0,1 M MES pH 6,5, 1,6 M Ammoniumsulfat, 10% 1,4-Dioxan
<b>Datensammlung</b>	
Beamline	ID30A-3, ESRF
Detektor (Abstand)	Eiger X 4M (103,738)
Temperatur [K]	100
Wellenlänge [Å]	0,9677
Belichtungszeit [s]	0,1
Rotation [°]	0,003
Auflösungsbereich [Å]	51,38-1,43 (1,45-1,43)
Raumgruppe	P4 <sub>2</sub> 1 <sub>2</sub>
Einheitszellparameter a, b, c [Å]	72,66, 72,66, 46,84
Einheitszellparameter $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ [°]	90, 90, 90
Anzahl gemessener Reflexe	628771 (27714)
Anzahl einzigartiger Reflexe	23789 (1153)
Multiplizität	14,1 (12,5)
Vollständigkeit [%]	100 (100)
Mosaizität [°]	0,2
$I/\sigma(I)$	33,2 (4,1)
$R_{\text{merge}}$ [%]	5,8 (79,5)
$R_{\text{meas}}$ [%]	6,0 (83,0)
$R_{\text{pim}}$ [%]	1,6 (23,3)
$CC_{1/2}$ [%]	100 (94,8)
<b>Strukturverfeinerung</b>	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ [%]	17,61 / 20,22
mittlerer B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	18,135
Mittlerer B-Faktor Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	27,841
Ramachandran Plot [%]	
bevorzugt	97,8
erlaubt	2,2
nicht erlaubt	0

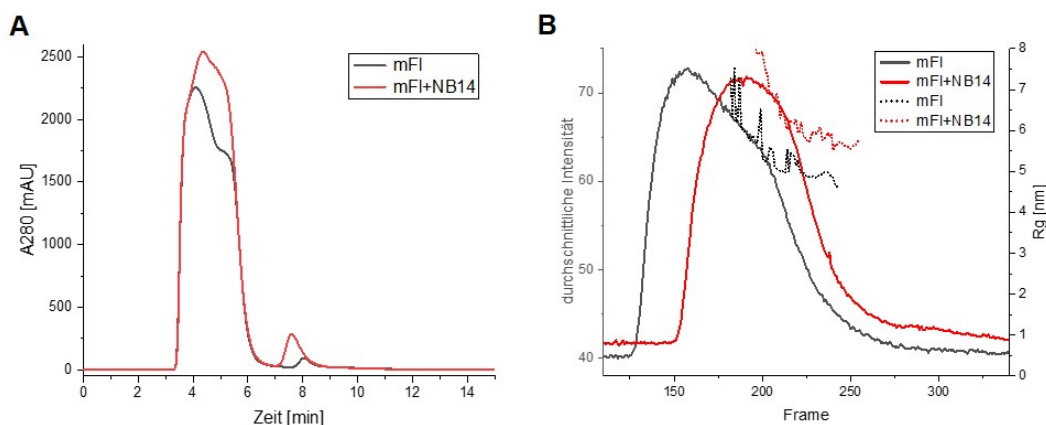
Abbildung 6.52 zeigt einen Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte und den mit PROCHECK (Laskowski et al., 1993) erstellten Ramachandran-Plot.



**Abbildung 6.52: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte (Konturlevel  $\sigma \sim 1,5$ ) und Ramachandran-Plot der Kristallstruktur von NB14-P4.** Der Ramachandran-Plot wurde mit PROCHECK (Laskowski et al., 1993) erstellt. 94,9 % der Reste liegen in bevorzugten Regionen und 5,1 % in zusätzlich erlaubten Regionen.

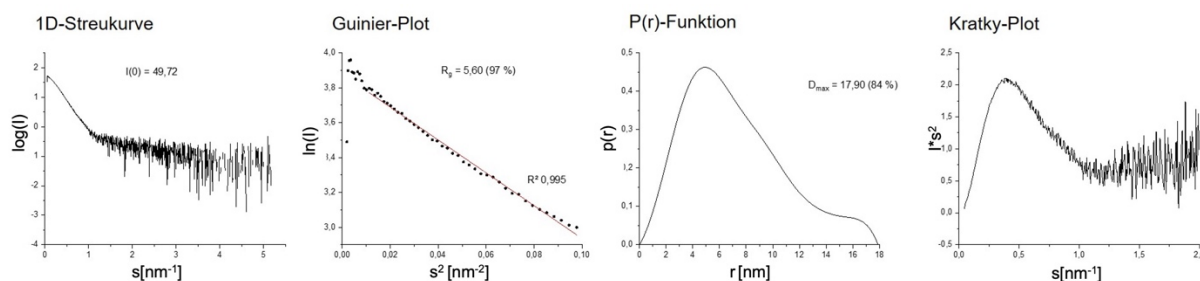
### 6.5.6 HPLC-SAXS von mFI-StreptII in PMAL-C8 und NB14

Mit einem Komplex aus NB14 und mFI wurden zur weiteren Charakterisierung HPLC-SAXS-Experimente durchgeführt. Dazu wurden mFI und NB14 in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 bei einer Gesamtproteinkonzentration von etwa 12 mg/mL inkubiert und 50  $\mu$ L auf eine mit dem SAXS-System gekoppelte Superdex 200 5/150 pg-Säule bei einer Flussrate von 0,3 mL/min injiziert. Eine Messung mit mFI allein diente zum Vergleich, wobei mFI in PMAL-C8 rekonstituiert war. Abbildung 6.53A zeigt die UV-Profile und die Intensitätsprofile beider Messungen. Bei dem Lauf von mFI wurden zwei Peaks detektiert, bei dem des Komplexes aus mFI und NB14 verstärkte sich der zweite Peak im UV-Profil mit einer höheren Intensität. Die beschriebene höhere Intensität ist auch Folge der Bindung des Nanobodies, was bei Betrachtung der  $R_g$ -Werte deutlich wird, die an dieser Stelle für mFI bei etwa 5 nm liegen und sich durch Bindung des Nanobodies auf 6 nm erhöhen.



**Abbildung 6.53: HPLC-SAXS-Experimente von mFI in PMAL-C8 und mFI im Komplex mit NB14. A** UV-Profile von mFI und einem Komplex aus mFI und NB14. **B** Intensitätsprofil und Berechnung des  $R_g$  mit CHROMIXS.

Eine Auswertung der Daten von mFI in PMAL-C8 ist aufgrund der Datenqualität nicht möglich. Aus den Daten von mFI mit NB14 ließen sich mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) Oberflächenmodelle berechnen, auch wenn sich die  $P(r)$ -Funktion nicht für  $r = D_{\max}$  langsam 0 annähert.



**Abbildung 6.54: Streukurve, Guinier-Plot,  $P(r)$ -Funktion und Kratky-Plot der HPLC-SAXS-Daten von mFI im Komplex mit NB14.** Die Messung erfolgte an der BM29 des ESRF. Die Auswertung erfolgte mit PRIMUS (Konarev et al., 2003).

Die Auswertung der Streukurven mittels PRIMUS (Konarev et al., 2003) ist in Abbildung 6.54 gezeigt und die berechneten Parameter in Tabelle 6.10 aufgeführt. Zum Vergleich ist die in Kapitel 6.2.5.1 beschriebene Auswertung der Daten von mFI in 0,05 % Fos12 angegeben. Die

## Ergebnisse

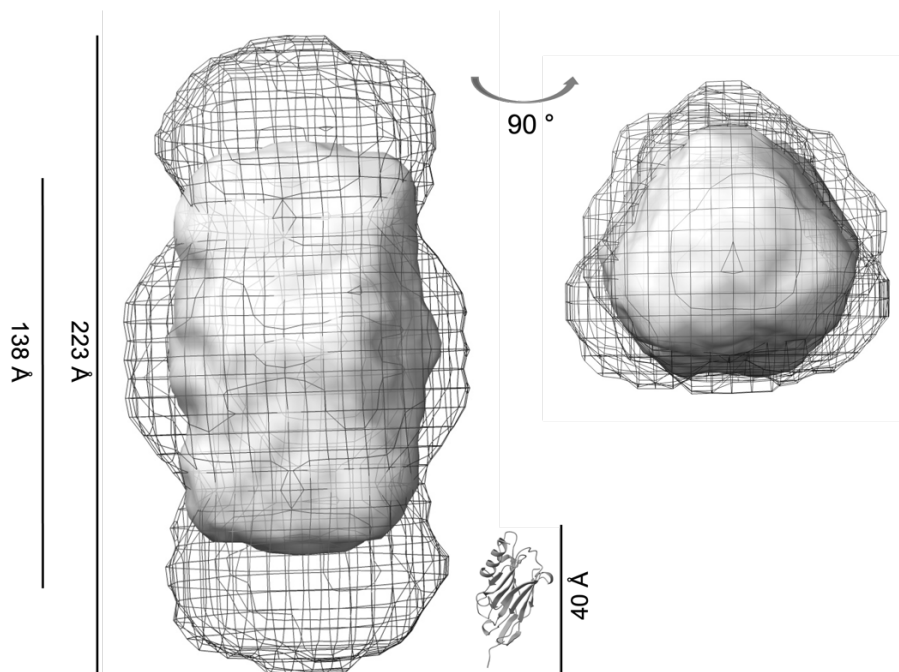
Intensität lag bei 49,72 und es wurde ein  $R_g$  von 5,60 nm berechnet. Aus der  $P(r)$ -Funktion ergab sich ein  $D_{\max}$  von 17,90 nm, wobei die Funktion keinen optimalen Verlauf bei trotzdem guter Qualität der Daten aufweist. Der Gauß-ähnliche Verlauf des Kratky-Plots bei kleinen Winkeln bestätigt die Faltung der Proteine.

**Tabelle 6.10: Guinier-Analyse, Paarverteilungs-Analyse und Berechnung des Molekulargewichtes.** Es wurde angenommen, dass  $V_p/1,6 = MW$  (Korasick & Tanner, 2018) ist. Die Auswertung erfolgte mit Programmen der Atsas-Suite (Atsas 3.1.1).

	Frame 237-263 mFI + NB14 in PMAL	Frame 1200-1250 mFI in Fos12
<b>Guinier-Analyse</b>		
$I(0)$	49,72 +/- 0,18	25,4 +/- 0,15
$R_g$ (nm)	5,60 +/- 0,03	3,88 +/- 0,15
$qR_g$ Bereich	0,54 – 1,29	0,57 - 1,30
Punkte	11 - 37	24 - 64
Qualität	97 %	78 %
$V_p$ (nm <sup>3</sup> )	389	215
<b>P(r)-Analyse</b>		
$I(0)$	49,20	25,64
$R_g$ (nm)	5,63	3,95
$D_{\max}$ (nm)	17,90	12,60
$q$ Bereich (nm <sup>-1</sup> )	0,04 – 1,42	0,15 - 1,46
Qualität	0,84	0,95
$V_p$ (nm <sup>3</sup> )	380	336
<b>MW [kDa]</b>		
$V_p$ (Rg)	243	134
$V_p$ (P(r))	237	209
Datmow	178	171
Datvc	175	159

Nach Berechnung von Oberflächenmodellen unterschiedlicher Symmetrien lieferten eine P4- und P32-Symmetrie in länglicher Form die besten statistischen Daten und Übereinstimmung mit den experimentellen Daten (Tabelle 12.10). Da sich mFI in Amphipol befand, wurde wie zuvor eine P32-Symmetrie als wahrscheinlich erachtet. Abbildung 6.55 zeigt das *damaver*-Modell des größten Clusters in P32-Symmetrie. Zum Vergleich ist das P32-Modell von mFI in Fos12 gezeigt. Das Modell hat eine Länge von 223 Å und ist damit um 85 Å länger als das mFI-Modell ohne Nanobody. NB14 hat eine Länge von etwa 40 Å, so dass oben und unten jeweils drei NB14-Monomere Platz finden würden.

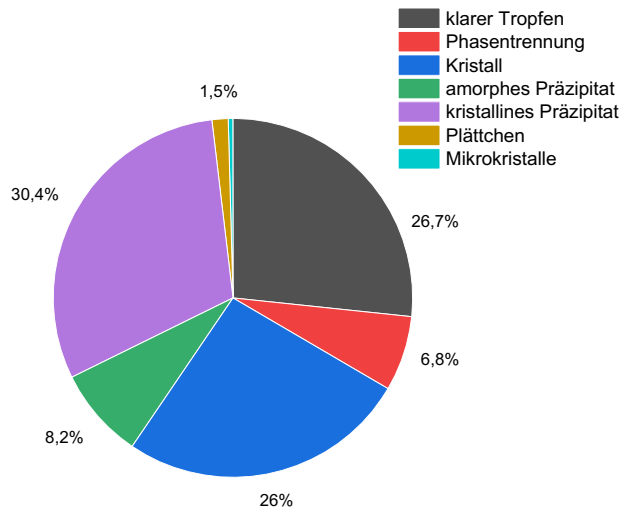




**Abbildung 6.55: Oberflächenmodell des mFI-NB14-Komplexes.** Dargestellt ist die Dichtekarte des Modells in P32-Symmetrie mit einer Auflösung von 20 Å in Gitterdarstellung. Die Oberflächenmodelle wurden mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) erstellt. Zum Vergleich ist die Dichtekarte des mFI-Oberflächenmodells gezeigt. Zum Größenvergleich ist die Struktur von NB14 abgebildet. Die Abbildung wurde mit ChimeraX erstellt.

### 6.5.7 Kokristallisation von NB14 und mFI-StreptII

Nach dem Nachweis der Bildung des Komplexes aus mFI und NB14 und der genaueren Charakterisierung sollte die Kokristallisation erfolgen. NB14 soll dabei als Kristallisationschaperon für mFI dienen und den flexiblen C-Terminus stabilisieren sowie zusätzliche Kristallkontakte schaffen. 500 µL mFI (663 µM) und 500 µL NB14 (796 µM) wurden inkubiert, sodass sie in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 vorlagen (Pardon et al., 2014). Die Gelfiltration erfolgte in GF1-Puffer ohne TCEP. Fraktionen, die nach SDS-PAGE beide Proteine enthielten, wurden vereinigt und auf 20 mg/mL konzentriert. Die Kristallisation erfolgte mit Hilfe des Kristallisationsroboters unter Verwendung verschiedener 96-well Kristallisationsscreens (Wizard 1+2, JCSG Core I, JB Membrane 1-3 und Cryo 1, Morpheus, PEG/Ion 1 + 2, MemGold und ProPlex). Dabei wurden 1 µL Proteinlösung mit 1 oder 0,5 µL Reservoirlösung gemischt. Eine letzte Bewertung der Kristalle erfolgte nach neun Monaten. In 26 % der Tropfen entstanden Kristalle (Abbildung 6.56), von denen 188 für Röntgendiffraktionsexperimente geerntet wurden. Bei keinem der Kristalle wurde eine für Proteine typische Beugung beobachtet.



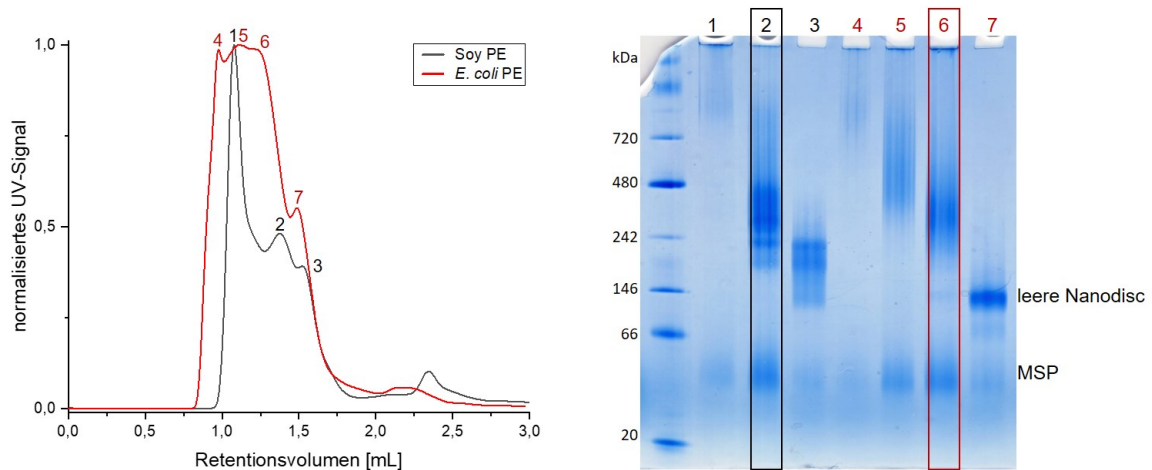
**Abbildung 6.56: Bewertung von Kristallisationsansätzen nach Kokristallisation von mFI und NB14.** MFI und NB14 wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 inkubiert und nach einer SEC in 50 mM Tris, 150 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,075 % Fos12 bei einer Gesamtproteinkonzentration von 20 mg/mL kristallisiert. Die Bewertung der 960 Tropfen erfolgte nach 9 Monaten. Es sind die prozentualen Anteile möglicher Kristallisationsergebnisse dargestellt. In 26 % der Tropfen lagen Kristalle vor.

### 6.5.8 Kryo-Elektronenmikroskopie eines mFI-StreptII-NB14-Komplexes in Nanodiscs

Wegen der erfolglosen Kristallisation des mFI-NB14-Komplexes sollte die Struktur durch Kryo-EM bestimmt werden. Nanobodies bieten bei der Kryo-EM den Vorteil, dass sie aus der Membrandomäne herausragen und so die 2D-Klassifizierung erleichtern können.

#### 6.5.8.1 Rekonstitution von mFI-StreptII in Nanodiscs

Da die Rekonstitution von mFI in PMAL-C8 vermutlich nicht erfolgreich ist, erfolgte die Rekonstitution in NDs, wie in Kapitel 5.6.4 beschrieben. Es wurden die Lipide *Soy Polar Extract* und *E. coli Polar Extract* sowie die pH-Werte 4,6 und 8 getestet. Bei den Ansätzen mit pH 4,6 fielen die Lipide aus. Mit den mFI-ND Proben in *E. coli* und Soy Lipid wurden nach vorheriger Zugabe eines 1,2-fach molaren Überschusses NB14 SECs auf einer Superose 6 5/150 GL-Säule durchgeführt. Die Chromatogramme und die Analyse der Proben in einer nativen PAGE zeigt Abbildung 6.57. Das zugehörige SDS-Gel ist in Abbildung 12.37 gezeigt. Nach Rekonstitution in *E. coli* Lipid-NDs eluiert der Komplex in mehreren ineinanderlaufenden Peaks (Abbildung 6.57). Während in Spur 4 bis 6 nur verschmierte Banden sichtbar sind, zeigt sich in Spur 7 eine klar definierte Bande bei etwa 146 kDa. Eine leere ND hat ein Molekulargewicht von rund 150 kDa (Majeed et al., 2021), was vermuten lässt, dass die Rekonstitution in *E. coli* Lipid nicht erfolgreich war. Dennoch wurde eine Probe von Peak 6 gefroren. Vielversprechender erschien die Rekonstitution in Soy Lipid. Es erfolgte eine schärfere Auftrennung der Peaks und im nativen Gel war keine leere ND sichtbar. In Spur 2 aus Peak 2 sind mehrere Banden um 240 kDa zu sehen. Ein hexamerer mFI-NB-Komplex mit MSP1E3D1 (*membrane scaffold protein*) hat ein theoretisches Molekulargewicht von 228 kDa, ein oktamere Komplex von 296 kDa, was etwa den oberen Banden in Spur 2 entspricht.

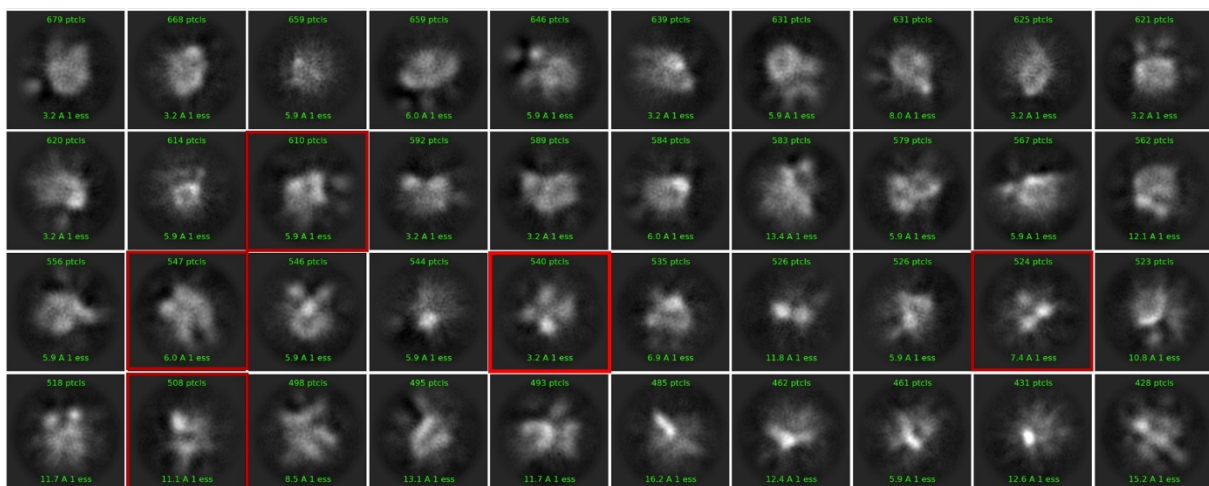


**Abbildung 6.57: SECs von mFI in Nanodiscs mit NB14 und native PAGE.** Chromatogramme analytischer SECs (Superdex 200, 5/150 µg) in 50 mM Tris pH 8, 75 mM KCl und 20 mM CaCl<sub>2</sub>. In schwarz ist das Elutionsprofil von mFI in NDs aus MSP1E3D1 mit *Soy Polar Extract* Lipid im Komplex mit NB14 abgebildet, in rot das Elutionsprofil, wo *E. coli Polar Extract* als Lipid verwendet wurde, dargestellt. Es wurde die normalisierte Absorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Die Fraktionen, die in der native PAGE (Bis-Tris 4-12 %) analysiert wurden, sind mit Zahlen markiert. Von Fraktion 2 und 6 wurden Kryo-EM Proben vorbereitet und Datensätze aufgenommen.

Proben der Fraktionen 2 und 6 wurden auf Kupfer- und Gold-Grids mit Blotting-Zeiten von 5 und 6 s vitrifiziert und anschließend Datensätze aufgenommen.

#### 6.5.8.2 Kryo-EM von mFI mit NB14 in Nanodiscs

Für mFI mit NB14 in NDs aus *E. coli* Lipid wurden 1103 Movies im *Counting Mode* aufgenommen, für mFI in NDs aus *Soy* Lipid 8100 Movies. Abbildung 6.58 zeigt ausgewählte 2D-Klassen von nicht rekonstituiertem Protein, die eine vierfache Symmetrie aufweisen. Bei der Mehrheit der Partikel handelte es sich um leere NDs, die hier nicht gezeigt sind.



**Abbildung 6.58: 2D-Klassifizierung von mFI in Nanodiscs aus *E. coli* Lipid aus 31700 Partikeln.** Gezeigt sind Klassen von nicht rekonstituiertem Protein, in denen Proteinmerkmale sichtbar sind. Exemplarisch sind Klassen rot umrandet, die eine eindeutige vierfache Symmetrie aufweisen.

## Kapitel 7 Diskussion

Das Flower-Protein aus der Maus könnte wie sein Homolog aus *D. melanogaster* als putativer Calcium-Kanal eine Rolle bei der Verbindung von Exo- und Endozytose spielen und hat außerdem eine wichtige Bedeutung bei der Zellkompetition durch Markierung Fitness-defizienter Zellen. Da der genaue Funktionsmechanismus von mFI nicht geklärt ist und zudem strukturelle Informationen über Flower-Proteine fehlen, galt als Hauptziel dieser Arbeit der Erhalt struktureller Informationen über das Protein, die Rückschlüsse auf seine Funktion ermöglichen. Die Voraussetzung dafür erbrachten vorherige Arbeiten in Form geeigneter Produktions- und Reinigungsbedingungen (Frohnweiler, 2013; Lafontaine, 2017; Urbansky, 2017), die nach Optimierung eine biochemische, funktionelle und strukturelle Charakterisierung des Proteins erlaubten.

### 7.1 Bioinformatische Analysen

Das Flower-Protein ist evolutionär vom Wurm bis zum Menschen konserviert (Yao et al., 2009). Die Maus-Isoform mFI (mFweA, mFwe2) weist zur humanen Flower-Isoform hFWE4 eine Sequenzidentität von 92 % auf, während zur *D. melanogaster*-Isoform dFweUbi eine Sequenzidentität von nur 27 % besteht (Abbildung 6.1, Abbildung 12.1). Es existiert keine bekannte homologe Struktur von mFI, sodass zunächst auf Strukturvorhersagen zurückgegriffen werden muss, die sich allerdings häufig wiederum auf homologe Strukturen berufen (Jaroszewski, 2009). Die Topologievorhersagen verschiedener Server liefern unterschiedliche Ergebnisse, die sich in der Anzahl und der Länge der Transmembrandomänen unterscheiden (Tabelle 6.1, Tabelle 12.14, Tabelle 12.15). Neben der Verwendung unterschiedlicher Algorithmen (Jones, 2007) wird eine unterschiedliche Anzahl an Aminosäuren für eine Transmembranhelix angenommen, die aus 15-30 Aminosäuren mit einer hohen Anzahl hydrophober Reste bestehen kann (Käll et al., 2005). Frühere Vorhersagemethoden basierten auf experimentell bestimmten Hydropathie-Indizes. Aus einem entlang der Proteinsequenz bewegten Fenster von definierter Länge (19 Aminosäuren) wurde ein Hydropathie-Plot erstellt (Kyte & Doolittle, 1982; von Heijne, 1992). Erste automatisierte Vorhersagemethoden, wie z.B. TOPPred, berücksichtigten zusätzlich das Vorkommen positiv geladener Aminosäurereste in zytoplasmatischen Regionen von Transmembranproteinen (von Heijne, 1992), sodass nicht nur Transmembrandomänen, sondern gleichzeitig die Topologie vorhergesagt werden kann. Im C-Terminus von mFI kommen die Aminosäuren Arginin und Lysin häufiger vor, was für die Vorhersagen mit vier Transmembrandomänen spricht, bei denen die erste Helix von innen nach außen führt, sodass der C-Terminus wieder ins Zytoplasma ragt. Realistisch erscheint auch die Vorhersage von TMPred (Hofmann & Stoffel, 1993) mit drei Transmembrandomänen, wobei die erste von außen nach innen führt (Tabelle 6.1, Tabelle 12.15). Wegen der fehlenden Signalpeptidsequenz von mFI am N-Terminus (Reynolds et al., 2008) sollte der N-Terminus

jedoch intrazellulär liegen. Unter Berücksichtigung beider Punkte spricht dies für vier Transmembranhelices, wobei N- und C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind.

Bei der MEMSAT-Methode (Jones et al., 1994) wird für jede Aminosäure die Neigung berechnet, sich in einem der fünf möglichen Zustände innere Schleife, äußere Schleife, inneres Helix-Ende, Helix-Mitte oder äußeres Helix-Ende zu befinden, sodass sich eine mathematisch optimale Lösung ergibt. Wie die MEMSAT-Methode basieren TMHMM (Krogh et al., 2001) und HMMTOP (Tusndy & Simon, 1998) auf dem *Hidden Markov Modell* (HMM). Dennoch sagt TMHMM drei Transmembrandomänen voraus, während HMMTOP und MEMSAT vier Transmembrandomänen vorhersagen, wobei nur die Transmembrandomäne 3 identisch ist.

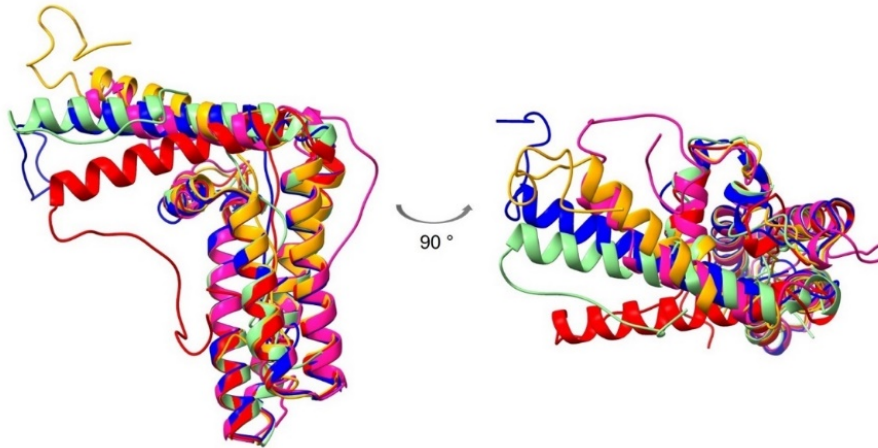
Das von vielen Servern verwendete vereinfachte Konzept (Elofsson & von Heijne, 2007; von Heijne, 1992), dass typische Membranproteine in der Membran durch membranberspannende Bündel von unpolaren  $\alpha$ -Helices mit einer Länge von etwa 20 Aminosäuren mit konstanter Ausrichtung senkrecht zur Membranoberfläche verankert sind, stimmt grundsätzlich. Mittlerweile wurde allerdings durch eine Vielzahl hoch aufgelöster Membranproteinstrukturen gezeigt, dass Membranhelices eine Fülle von Längen und Orientierungen innerhalb der Membran annehmen können (McKay et al., 2018).

Da keine homologe Struktur bekannt ist, ist eine eindeutige Aussage über die Topologie von mFI allein anhand der bioinformatischen Analysen nicht möglich. Experimentelle Daten (Chang et al., 2018; Rudd et al., 2023) sowie auch die Mehrzahl der Vorhersagen deuten auf vier Transmembrandomänen hin. Eindeutig bestätigen kann dies allerdings nur eine atomare Struktur des Proteins.

Sowohl unterschiedliche Methoden zur Vorhersage der Sekundärstruktur als auch die stark variierenden Ergebnisse könnten durch eine Änderung der Tertiärstruktur von mFI erklärt werden, weshalb tatsächlich mehrere Konformationen möglich sind. Die Lokalisation von dFwe in verschiedenen Kompartimenten wie synaptischen Vesikeln oder der Plasmamembran und die Möglichkeit einer Art von Stimulus im Rahmen der Zellkompetition sprechen dafür, dass mFI während der Ausübung seiner verschiedenen Funktionen Konformationsänderungen durchläuft.

Nachteilig an den derzeit verfügbaren Servern ist, dass aus einer Proteinsequenz lediglich eine einzige mögliche Sekundärstrukturvorhersage gemacht wird. Im Gegensatz dazu liefern *de novo* vorhersagende Server in der Regel eine Auswahl an Tertiärstrukturen. Diese können entweder als unterschiedliche Vermutungen der korrekten Struktur oder als Vorhersage der dynamischen Konformationsumlagerungen um die Kernstruktur gesehen werden (Mishra et al., 2019). Letzteres ist anhand von fünf durch RaptorX (Källberg et al., 2012) vorhergesagten Strukturmodellen in Abbildung 7.1 dargestellt, wobei die RaptorX-Modelle im Aufbau dem AlphaFold-Modell (Jumper et al., 2021) hneln. Die aus vier Helices bestehende Kernstruktur

ähnelt sich in allen fünf Modellen, während die N- und C-Termini sowie die Helix aus Exon 3 unterschiedliche Konformationen aufweisen. Sekundärstrukturen vorhersagende Server identifizieren diese Bereiche oft als ungeordnet, weshalb das Vorhandensein unterschiedlicher Konformationen hier naheliegend ist.



**Abbildung 7.1: Übereinanderlagerung von mFI-Strukturmodellen.** Die fünf Strukturvorhersagen wurden durch RaptorX (Wang et al., 2012) ermittelt. Sie sind in den vorhergesagten Helices ähnlich und unterscheiden sich in den N- und C-Termini sowie der Helix aus Exon 3 (AS 68-111).

Bei AlphaFold handelt es sich um neuronale Netze, die durch künstliche Intelligenz die 3D-Struktur von Proteinen basierend auf ihrer Sequenz vorhersagen können. Das Training des Netzwerks erfolgt anhand von Informationen aus Protein-Datenbanken, wobei physikalische und biologische Kenntnisse über die Proteinstruktur sowie Multi-Sequenz-Alinierungen mit einbezogen werden (Jumper et al., 2021). Der Mangel an homologen Strukturen und damit einhergehend fehlende Informationen in Protein-Datenbanken erklären die unzureichende Verlässlichkeit des AlphaFold-Modells von mFI (Abbildung 6.2).

Umso wichtiger ist die Aufklärung der Struktur durch hochauflösende Methoden wie die Röntgenstrukturanalyse oder die Kryo-Elektronenmikroskopie. Gleichzeitig stellt die Tatsache, dass kein verlässliches Strukturmodell mithilfe bioinformatischer Methoden gefunden werden kann, eine große Herausforderung für die Erstellung eines Strukturmodells aus experimentell ermittelten Daten bei der Kleinwinkelröntgenstreuung, der Kryo-Elektronenmikroskopie und der Röntgenstrukturanalyse, falls das Phasenproblem durch molekularen Ersatz gelöst werden soll, dar. Für genannte Anwendungen wurde zunächst das AlphaFold-Modell als die fortschrittlichste Methode basierend auf künstlicher Intelligenz verwendet, wobei aufgrund der später durchgeführten Experimente ein eigenes Homologie-Modell erstellt wurde.

## 7.2 Produktion und Reinigung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII und mFI-StrepII

### 7.2.1 Produktion von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII in *E. coli*

Die Mehrheit der Membranproteine weist in nativen Organismen nur ein geringes Expressionslevel auf, was die rekombinante Überexpression für strukturelle und funktionelle Studien erforderlich macht. Bei *E. coli* handelt es sich um ein schnelles, vielseitiges und

kostengünstiges Expressionssystem mit einigen Nachteilen bei der Expression eukaryotischer Proteine. Zur Proteinfaltung sind andere Chaperone vorhanden, essenzielle Lipide fehlen und posttranslationale Modifikationen können nicht ausgeführt werden (Lyons et al., 2016). Da die Expression von mFI in *Pichia pastoris* (Urbansky, 2017) aufgrund der schlechteren Reinheit keinen Vorteil brachte und die für die Proteinkristallisation erforderlichen Proteinmengen nicht einfach aus Säugerzellen gewonnen werden können, wurde *E. coli* als Expressionssystem verwendet.

Das T7-Promotorsystem kommt am häufigsten bei der Expression von Membranproteinen zum Einsatz (Kesidis et al., 2020) und gewährleistet ein hohes Expressionsniveau (Studier et al., 1990). Der verwendete BL21Star(DE3)-Stamm wurde mit dem pRARE-Plasmid transformiert, das für zusätzliche tRNAs kodiert, die in *E. coli* selten genutzte Kodons erkennen. Dadurch wird die Kodonnutzung für die Translation fremder Gene verbessert und die Expressionsrate erhöht (Novy et al., 2011; Kane, 1995). Der BL21Star(DE3)-Stamm weist eine die mRNA-Stabilität erhöhende Mutation im *rne131* Gen auf. Außerdem wird die Proteinexpression durch das Fehlen der Protease *lon* und der Außenmembranprotease *OmpT* verstärkt, was den Abbau heterologer Proteine reduziert (Lopez et al., 1999). Die Fusion mit dem SUMO-Protein erhöht die Expression und Löslichkeit von schwer exprimierbaren Membranproteinen (Marblestone et al., 2006; Butt et al., 2005).

Durch Einsatz des zur Produktion von Membranproteinen besonders gut geeigneten und sich durch eine langsame Induktion und niedrige Expressionstemperatur auszeichnenden Autoinduktionssystems (Studier, 2005; Deacon et al., 2008) konnte eine sehr hohe Zell- und Proteinausbeute erreicht werden.

### 7.2.2 Reinigung und Rekonstitution von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII und mFI-StrepII

Trotz der generellen Ineffizienz von LDAO bei der Extraktion von Membranproteinen löst es bestimmte Proteine, insbesondere Transportproteine, im Vergleich zu anderen Detergenzien gut aus der Membran (Arachea et al., 2012; Kotov et al., 2019).

Solubilisierungstests zeigten, dass die Solubilisierung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII mit LDAO am effizientesten ist (Lafontaine, 2017). Weitere eigens durchgeführte Solubilisierungstests bestätigten dieses Ergebnis. Allerdings ist 6xHis-SUMO-mFI-StrepII nur kurzzeitig in 1 % LDAO stabil, was sich durch Ausfallen des Proteins in der Lösung zeigt. Deshalb wurde die Lösung nach erfolgter Solubilisierung vor der Ultrazentrifugation auf eine LDAO-Konzentration von etwa 0,3 % verdünnt.

Ein besser geeignetes Detergenz mit ähnlich hoher Ausbeute und Stabilität konnte nicht identifiziert werden. So resultierte die Solubilisierung von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII in LMNG zwar in einer einzigen Bande bei etwa 17 kDa (Abbildung 12.9), allerdings bindet in LMNG solubiliertes Protein nicht mehr an die zur weiteren Reinigung benötigte StrepII-Matrix. Dies wurde auch für weitere Detergenzien, wie z.B. Fos12 und Fos14, beobachtet. Ursächlich ist

möglicherweise die unterschiedliche Mizellengröße, die das StreptII-Anhängsel am C-Terminus verdecken könnte. Für die LMNG-Mizelle wurde mittels HPLC-SAXS-Messung ein Molekulargewicht von rund 600 kDa bestimmt (Abbildung 12.10). Die Bildung sehr großer LMNG-Mizellen wurde bereits beobachtet, jedoch haben Protein-LMNG-Mizellen eine mit anderen Detergenzien vergleichbare Größe (Breyton et al., 2019). LMNG wird aufgrund seiner niedrigen CMC als vielversprechendes Detergenz für die Kryo-Elektronenmikroskopie beschrieben (Huynh et al., 2016; Dang et al., 2017) und kommt auch bei der Kristallisation zum Einsatz (Chae et al., 2010; Guo et al., 2016). Wegen der Koelution der großen LMNG-Mizelle mit mFI (Abbildung 12.10) wurde der Ansatz mit LMNG anschließend nicht weiterverfolgt.

Letztendlich stellte sich die Solubilisierung und Reinigung mit DDM und CHS als vielversprechend heraus (Abbildung 12.38).

Strukturelle und funktionelle Studien zeigten eine essenzielle Rolle der Membrenumgebung bei Membranproteinen. Entsprechend kann die Solubilisierung mit Detergenz Nachteile mit sich bringen, da der native Zustand des Proteins nicht beibehalten wird und es in eine neue Umgebung gebracht wird. Durch den Austausch von Protein-bindenden Membranlipiden gegen Detergenz kann die Funktion des Proteins verloren gehen (Wang & Tonggu, 2015).

Die Einbettung in amphiphile Polymere wie Diisobutylen/ Maleinsäure (DIBMA) (Oluwole et al., 2017) oder Styren/ Maleinsäure (SMA) (Tonge & Tighe, 2001; Knowles et al., 2009) liefert stabilere und funktionellere Membranproteine (Wang & Tonggu, 2015). Im Gegensatz zu SMA ist DIBMA tolerant gegenüber dem zur Reinigung von mFI verwendeten Calcium (Danielczak et al., 2019). SMA bietet den Vorteil der Toleranz saurer pH-Werte (Hall et al., 2018), jedoch wurde es wegen fehlender Vorteile nach der Testreinigung mit DIBMA nicht getestet. Obwohl sich 6xHis-SUMO-mFI-StreptII nach der Rekonstitution in DIBMA in einem nativen Zustand befinden sollte, wurden eine gleiche Oligomerverteilung wie bei der Solubilisierung mit LDAO mit Banden bei 20 und 40 kDa beobachtet (Abbildung 12.5). Somit brachte die Rekonstitution in DIBMA keinen Vorteil mit sich und es wurde weiterhin das Detergenz LDAO zur Solubilisierung verwendet. Es deutet sich an, dass sich die Produktion von mFI in *E. coli* nicht eignet und mFI sich bereits in der *E. coli*-Membran nicht im richtigen Faltungs- und Oligomerzustand befindet.

Die Reinigung des Solubilisats über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie erhöhte die Reinheit der Probe bereits stark. In den Elutionsfraktionen sind im SDS-Gel zwei starke Banden bei etwa 20 und 40 kDa erkennbar, die nicht zu dem theoretischen Molekulargewicht von 31,8 kDa für 6xHis-SUMO-mFI-StreptII passen. Die Bande bei 20 kDa war in verschiedenen Reinigungen unterschiedlich stark ausgeprägt, weshalb die Vermutung bestand, dass es sich um C-Terminal abgebautes Protein handelt, was eine teilweise fehlende Detektion der unteren Bande mit einem StreptII-Antikörper zeigte (Abbildung 12.2A). Nach



Abspalten des SUMO-Anhängsels wurde vermehrt ein nicht immer gleich stark ausgeprägter und mit der Zeit zunehmender N-terminaler Abbau beobachtet (Abbildung 12.2).

Das bekannte veränderte Laufverhalten von Membranproteinen im SDS-Gel hängt unter anderem mit der unterschiedlichen Bindung von Detergenz zusammen (Rath et al., 2009). Entweder bindet SDS aufgrund von bereits vorhandenem Detergenz nicht gut an das Protein oder das Protein ist tolerant gegenüber SDS und behält seine Faltung mit einer langsameren Migration im Gel als Folge. Die Bildung von auch bei mFI beobachteten SDS-resistenten Oligomeren untermauert diese Hypothese. Deshalb wird davon ausgegangen, dass es sich bei der Bande bei 40 kDa um 6xHis-SUMO-mFI-StrepII von voller Länge und bei der Bande bei 20 kDa um teilweise abgebautes Protein handelt.

Der Ulp1p-Verdau erfolgte parallel zur StrepII-Tactin-Affinitätschromatographie. Ulp1p wurde in einem Protease-zu-Protein-Verhältnis von 1:2 eingesetzt, was zu keinem vollständigen Verdau führte, jedoch wurde dieser auch nicht bei einem 1:1 Verhältnis erreicht (Urbansky, 2017). Detergenzien können die hydrolytische Aktivität von Enzymen behindern. Zur Erhöhung der Stabilität von mFI wurde der Verdau bei 4 °C durchgeführt, wobei Ulp1p ein Temperaturoptimum von 25 bis 37 °C hat (Liang et al., 2017). Auch bei Verdünnung der IMAC-Elutionsfraktion bis zu einer Imidazolkonzentration unter 100 mM könnte sich Imidazol weiterhin negativ auf die Aktivität von Ulp1p auswirken (Zuo et al., 2005; Marblestone et al., 2006).

Wegen der Instabilität von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII und mFI in hoher Konzentration in LDAO muss während der StrepII-Affinitätschromatographie ein Detergenztausch zu Fos12 erfolgen. Fos12 wird sehr häufig zur Solubilisierung von Membranproteinen, aber auch bei der Reinigung eingesetzt (Geertsma et al., 2008). Beispiele sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Cook et al., 2009; Ma et al., 2013), Kanäle (Billen et al., 2015; Zhang et al., 2019) oder Transporter (Kraft et al., 2015; Suades et al., 2019). MFI wies die höchste Stabilität in Fos12 auf (Lafontaine, 2017), das als eines der effektivsten Detergenzien zur Solubilisierung bei der Reinigung von Proteinen den Nachteil mit sich bringt, dass es auch Aggregate und damit verschiedenste Oligomerzustände solubilisieren kann (Geertsma et al., 2008). Hieraus könnte die später diskutierte Problematik des Vorkommens von mFI in verschiedenen Oligomerzuständen resultieren. Dieses Phänomen wurde auch bei anderen Proteinen beobachtet (Kol et al., 2013).

Während nach der IMAC noch schwache, nicht identifizierbare Banden im höheren Molekulargewichtsbereich vorhanden waren, zeigten sich in der Elutionsfraktion der StrepII-AC lediglich zwei im Vergleich zur IMAC-Elutionsfraktion in Folge des Ulp1p-Verdaus nach unten verschobene Banden bei etwa 17 und 35 kDa.

Die anschließend durchgeführte Rechromatographie in Form einer weiteren IMAC wies in der Elutionsfraktion noch eine geringe Menge ungeschnittenes Protein auf. Falls es sich dabei

tatsächlich um 6xHis-SUMO-StrepII handelt, läuft dieses gereinigt in Fos12 niedriger als zuvor in LDAO (Abbildung 6.4). Das unterschiedliche Migrationsverhalten kann mit unterschiedlichen Mengen an gebundenem Detergenz zusammenhängen (Rath et al., 2009).

Stabilitätsmessungen mittels Thermofluor-Assay zeigten eine Bevorzugung saurer pH-Werte durch mFI (Lafontaine, 2017), weshalb die SEC bei pH 4,6 durchgeführt wurde, wenn das Protein nur kristallisiert werden sollte. Für Interaktionsstudien oder die Rekonstitution erfolgte die SEC bei dem mit anderen Proteinen und Methoden kompatibleren pH-Werten von 7,4 oder 8. Zudem sind Ergebnisse des Thermofluor-Assays für Tris-Puffer wegen der Abhängigkeit des pH-Wertes von der Temperatur nicht aussagekräftig (Kolhe et al., 2010). Das hochreine mFI zeigte keine pH-abhängige Änderung der Elutionsprofile und eluierte nach Injektion auf eine Säule in einem spitzen, teilweise nach hinten auslaufendem Peak.

Die SDS-PAGE nach SEC zeigt immer noch zwei Banden bei 17 und 35 kDa sowie besonders im vorderen Bereich Banden höheren Molekulargewichts bei etwa 50 und 70 kDa, die nach hinten abnehmen (Abbildung 6.5). Dies zeigt die Bildung SDS-resistenter Oligomere durch mFI, was auch bei anderen Membranproteinen beobachtet wurde (Le Maire et al., 2000; Makino et al., 1975). Western-Blots mit mFI-spezifischen Antikörpern bestätigten, dass es sich bei allen Banden um mFI handelt und das Protein somit mit 100 %-iger Reinheit vorliegt (Abbildung 12.2).

### 7.3 Oligomerisierungsverhalten von mFI-StrepII

30-50 % aller Proteine können miteinander assoziieren und die Bildung von Homo-Oligomeren (Homomeren) ist ein weit verbreitetes biologisches Phänomen (Goodsell & Olson, 2000; Levy & Teichmann, 2013; Bergendahl & Marsh, 2017).

Für Flower aus *D. melanogaster* wurde wie bei mFI die Bildung von Homo-Oligomeren gezeigt und im SDS-Gel konnten höhere Oligomere mit vorherrschendem monomeren, dimeren, trimeren und tetrameren Zustand nachgewiesen werden. Das gleiche gilt für eine durchgeführte native PAGE mit Perfluorooctansäure (Yao et al., 2009).

Zunächst wurde im Hinblick auf die Kristallisation eine Verhinderung der Oligomerisierung angestrebt. Änderungen in der Pufferzusammensetzung, der Art und Konzentration an Reduktionsmittel, der Detergenzmenge und die Zugabe verschiedener Additive hatte jedoch keinen Einfluss auf das Laufverhalten von mFI im SDS-Gel oder im nativen Gel (Abbildung 12.7). Eine Ursache hierfür könnte die feste Bindung des Detergenz an die Oligomere sein, so dass Änderungen am Protein nur lösliche Bereiche betreffen können und folglich beim Laufverhalten kein Unterschied beobachtet werden kann.

Flower besitzt insgesamt sieben Cysteine, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken an der Oligomerisierung beteiligt sein könnten. Die Zugabe von Iodacetamid bewirkt eine Alkylierung der Cysteine (Hains & Robinson, 2017), die die Bildung von Disulfidbrücken verhindert (Ravi

et al., 2014). Es wurde jedoch kein Effekt auf mFI beobachtet (Daten nicht gezeigt), weshalb die Cysteine wahrscheinlich nicht zur Oligomerbildung über Disulfidbrücken beitragen.

Eine andere Strategie war die Erzwingung eines bestimmten Oligomerzustandes. Dies erfolgte durch Crosslinking-Versuche mit DSS (Kapitel 12.7), das Lysine und den N-Terminus von Proteinen vernetzt (Trabjerg et al., 2021). mFI besitzt vorwiegend in Richtung des C-Terminus Lysine, sodass wahrscheinlich insbesondere die flexiblen N- und C-Termini miteinander verknüpft werden. Bei den durchgeführten Crosslinking-Experimenten konnte in der SDS-PAGE ebenfalls eine zunehmende Oligomerisierung bis einschließlich eines Tetramers mit zunehmender DSS-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 12.8). Wegen der Bildung SDS-resistenter Oligomere sind die Ergebnisse anhand einer SDS-PAGE nicht interpretierbar. Das Auftragen der Proben auf ein natives Gel zeigt eine Stabilisierung des Tetramers durch die kovalente Vernetzung mit DSS. Die Banden auf Höhe eines Oktamers und eines Hexamers nehmen mit zunehmender DSS-Konzentration ab, wobei die Tetramer-Bande in ihrer Intensität gleichbleibt (Abbildung 6.11, Abbildung 12.8). Eine Umlagerung der Monomere kann somit ausgeschlossen werden, jedoch sind instabilere Oligomere ausgefallen.

Die spätere Reinigung der mFIdC-StreptII- und der mFI(G812L)-StreptII-Variante (Kapitel 12.13 und 6.3.1.1) zeigten, dass vor allem der N-Terminus, jedoch nicht der C-Terminus eine Rolle bei der Oligomerisierung spielen könnte.

Es existieren alternative Methoden zum Crosslinking von Proteinen wie zum Beispiel mit Glutaraldehyd, das ebenfalls hauptsächlich über Lysine erfolgt (Wine et al., 2007) oder das durch  $\text{CuSO}_4$  induzierte Crosslinking von Cysteinen (Väth et al., 2021). Hierzu wäre die Zugabe des Crosslinkers bereits bei der Solubilisierung anzuraten, da das Detergenz beim bereits solubilisierten Protein möglicherweise einen Effekt verhindert. Außerdem ist problematisch, dass das native Oligomer von mFI noch unbekannt ist und die Erzeugung eines nicht nativen Zustandes vermieden werden sollte, weshalb auf weitere Experimente dieser Art zunächst verzichtet wurde. Die Stabilisierung des tetrameren Zustandes durch DSS spricht jedoch für die Vermutung, dass der native Zustand des Proteins ein Tetramer ist.

Bei der Reinigung des humanen TRPV3-Kanals in Fos12 wurde ebenfalls die Bildung von verschiedenen Oligomerzuständen (Dimer und Tetramer) beobachtet (Kol et al., 2013), sodass es sich um ein bekanntes Phänomen handelt.

### **7.3.1 Molekulargewichtsbestimmung von mFI in Fos12**

Die alleinige Bestimmung des Molekulargewichts anhand des Elutionsvolumens ist für Membranproteine aufgrund der unbekannten Menge an gebundenem Detergenz nicht möglich. Außerdem handelt es sich bei den Standardproteinen um globuläre, wasserlösliche Proteine (Gimpl et al., 2016; Le Maire et al., 2000). Daher wurde das Oligomerisierungsverhalten in Lösung durch eine Dreifach-Detektion untersucht, bei der die SEC an ein Detektorsystem bestehend aus UV-Absorption, Rechtwinkellichtstreuung (RALS)

und Brechungsindex (RI) gekoppelt ist (Gimpl et al., 2016). Wegen fehlender Detektion eines Peaks einer Fos12-Mizelle wurde von einer Koelution der Detergenz-Mizelle mit der Protein-Detergenz-Mizelle ausgegangen. Dies verhindert eine genaue Berechnung der gebundenen Detergenzmenge am Protein, da die Detergenzkonzentration, die sich aus dem RI-Signal berechnen ließe, in diesem Fall der Summe an gebundenem und koeluiendem Detergenz entspricht (Hayashi et al., 1989; Wen et al., 1996; Slotboom et al., 2008). Um den Einfluss von Detergenz gering zu halten, wurde mit einfacher CMC (0,05 % Fos12) gearbeitet. Da ein Teil des Detergenz vom Protein gebunden ist, liegt die Detergenzkonzentration in der Lösung vermutlich knapp unterhalb der CMC, sodass möglicherweise keine freien Detergenz-Mizellen vorliegen. Da zu diesem Zeitpunkt von einem niedrigeren Molekulargewicht ausgegangen wurde, erfolgte die Messung mit einer nur bis zu einem Molekulargewicht von 75 kDa auftrennenden Superdex 75 10/300 pg-Säule. Trotzdem eluierte das Protein deutlich nach dem Ausschlussvolumen, was sich mit einer Interaktion des Proteins mit dem Säulenmaterial erklären ließe (Fekete et al., 2022). Trotz des symmetrischen Peaks des UV-Signals zeigten das RI- und RALS-Signal eine Elution von mFI in mehreren, übereinander liegenden Peaks an. Daraus wurde ein Molekulargewicht von 140 kDa für den ersten und von 133 kDa für den zweiten und den dritten Peak bestimmt. Das Molekulargewicht über alle Peaks betrug 135 kDa. Ursächlich für die leichten Unterschiede im Molekulargewicht könnten unterschiedliche Mengen an gebundenem Detergenz sein, was auch bei den später erfolgten HPLC-SAXS-Messungen (Kapitel 6.2.5.1) mit einer Zunahme des Einflusses der Detergenzmizelle nach hinten beobachtet wurde. Die geringen Unterschiede im Molekulargewicht sind nicht das Resultat verschiedener Oligomerezustände. Ein Molekulargewicht von 118 kDa würde einem Hexamer entsprechen, wobei die Menge an gebundenem Fos12 unbekannt ist.

Die Analyse durch eine native PAGE zeigte ein Vorliegen von mFI in verschiedenen Oligomerformen, wobei Banden bei etwa 88, 140 und 178 kDa bestimmt wurden (Abbildung 6.9). Bereits in der SDS-PAGE wurde beobachtet, dass mFI langsamer migriert als erwartet, was auch bei der für Membranproteine etablierten, nativen PAGE (Reisinger & Eichacker, 2008) nicht auszuschließen ist. Dies resultiert aus den in der Probe vorkommenden Detergenz-Mizellen und Protein-Detergenz-Mizellen, die beide um den die Ladung verleihenden Coomassie-Farbstoff im Kathoden-Puffer konkurrieren. Eine ungleichmäßige Ladung der Proteine durch zu wenig Farbstoff kann das Laufverhalten verändern (Ma & Xia, 2008). Somit handelt es sich bei den detektierten Banden mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Tetramer, ein Hexamer und ein Oktamer. Insbesondere ein Heptamer mit 140 kDa und ein Nonamer mit 178 kDa wären für ein Protein ungewöhnliche Symmetrien (Goodsell & Olson, 2000; Bergendahl & Marsh, 2017). Eindeutig ist das Vorkommen mehrerer Oligomere, deren durchschnittliches Molekulargewicht basierend auf den detektierten Banden 135 kDa beträgt,

was mit dem durch die Dreifach-Detektion berechneten Molekulargewichten übereinstimmt. Zudem muss für Membranproteine eine Abweichung des berechneten Molekulargewichts um bis zu 10 % berücksichtigt werden (Gimpl et al., 2016) und, dass es sich um das durchschnittliche, in der Lösung vorliegende Molekulargewicht handelt.

Zur Bildung der Oligomere können die Lipidumgebung oder Co-Faktoren eine Rolle spielen (Lee, 2009) und häufig binden Lipide sehr spezifisch an Kanäle. In der Kristallstruktur der heterotrimeren Nitratreduktase A bindet beispielsweise ein einzelnes Phosphatidylglycerol in einer aus allen drei Untereinheiten gebildeten Bindetasche (Bertero et al., 2003). Die Bildung des Amyloid- $\beta$  Calcium-Kanals hängt von der Cholesterin-Konzentration ab (Gao et al., 2020), was ebenfalls die Bedeutung der Umgebung betont. Häufiger spielen Lipide jedoch bei der Kanalfunktion eine Rolle (Lee, 2009). So wäre es denkbar, dass die Bindung eines noch unbekannten Liganden für die Erhaltung einer bestimmten Quartärstruktur erforderlich ist. Beispielsweise dienen negativ geladene Lipide wie  $\text{PIP}_2$  oder Cholesterin als Cofaktoren von Kalium-Kanälen zur Verstärkung oder Veränderung ihrer Aktivität (Huang et al., 1998; Levitan et al., 2014). Die Aktivität der Kanäle TRPV5 und TRPV6 wird über die  $\text{PIP}_2$ -Aktivierung und die  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-Inhibierung reguliert (Fluck et al., 2022; Cao et al., 2013). Es wurde bereits gezeigt, dass dFwe mehrere auch im humanen und murinen Protein konservierte  $\text{PIP}_2$ -Bindestellen aufweist (Li et al., 2020), was zur Vermutung führt, dass  $\text{PIP}_2$  stabilisierend wirkt und einen bestimmten Oligomerzustand begünstigen könnte. Im Gegensatz zu den drei gleich starken Banden bei 88, 140 und 178 kDa war nach einer nativen PAGE nach Zugabe von  $\text{PIP}_2$  nur eine deutliche Bande bei etwa 160 kDa erkennbar (Abbildung 6.25). Allerdings wurde die SEC auf einer MicroÄkta mit einer besseren Auftrennung der Oligomere durchgeführt. Wegen der Analyse nur einer Fraktion aus der Peakmitte in der nativen PAGE ist unklar, ob sich das Laufverhalten von mFI nach Zugabe von  $\text{PIP}_2$  tatsächlich änderte (Abbildung 6.25).

Bislang ist auch das Vorkommen mehrerer nativer mFI-Oligomere und die Ausübung unterschiedlicher Funktionen nicht auszuschließen. Bei der Zellkompetition (Petrova et al., 2012) könnte eine andere Oligomerform aktiv sein als bei der Endozytose (Chang et al., 2018). Es ist unbekannt, ob mFI auch im nativen Zustand in der Zelle als Oligomer vorliegt oder ob es nur aufgrund der hohen Konzentration nach Überexpression zur Selbst-Assemblierung neigt. Dass es sich nicht um ein Artefakt aufgrund der heterologen Expression eines eukaryotischen Proteins in *E. coli* handelt, wurde durch eine native PAGE mit anschließendem Western-Blot mit von der AG Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM, UdS) zur Verfügung gestellten in CTLs überexprimiertem mFI festgestellt. Hier lag mFI vorwiegend als Tetramer und geringfügig als Hexamer vor, wobei das *teal fluorescent protein* (TFP)-Anhängsel den Oligomerzustand beeinflussen könnte (Abbildung 12.31). Dennoch sprechen auch diese Ergebnisse für das native Vorliegen von mFI als Tetramer.

Da die Quartärstruktur durch nicht-kovalent interagierende Untereinheiten entsteht, hängt sie auch von der Konzentration ab und solange nicht ein Zustand kinetisch günstiger ist, handelt es sich um ein Gleichgewicht zwischen mehreren Zuständen (Marciano et al., 2022). So gilt es herauszufinden, welche Quartärstruktur von mFI die physiologisch relevante ist und unter welchen Bedingungen sie vorkommt. Eine zur Untersuchung nicht-kovalenter Interaktionen geeignete Methode ist die native Massenspektrometrie (MS) (Marciano et al., 2022), allerdings wurde bei bisher durchgeführten MS-Experimenten mit mFI nur ein Peptid des C-Terminus detektiert (Daten nicht gezeigt), was auf das Detergenz zurückzuführen ist.

### 7.3.2 Rekonstitution und Molekulargewichtsbestimmung von mFI-StreptII in PMAL-C8

Die Art der Membranimitierung kann einen Einfluss auf die Struktur des Proteins haben. Detergenzmoleküle haben hydrophobe Schwänze, die verglichen mit den Alkylketten von Lipiden kürzer und sehr mobil sind, weshalb Proteine nicht-physiologische Konformationen annehmen können (Zhou & Cross, 2013; Jones et al., 2020). Daher ist das Testen verschiedener Systeme wichtig.

Die Rekonstitution soll Membranproteine wieder in eine im Gegensatz zu Detergenz nativere Umgebung überführen. Eine einfache Methode stellt die Rekonstitution in Amphipol dar, die jedoch immer noch eine vorherige Solubilisierung mit Detergenz erfordert (Stetsenko & Guskov, 2017; Jones et al., 2020). Anschließend sollen Amphipole eine bessere Stabilität als Mizellen bieten (Popot et al., 2011; Majeed et al., 2021) und bleiben auch in Amphipol-freiem Puffer fest um das Membranprotein gebunden (Stetsenko & Guskov, 2017; Zoonens & Popot, 2014). Obwohl Amphipole mit der *in meso* Kristallisation in LCPs kompatibel sind (Polovinkin et al., 2014; Caffrey, 2015), kommen sie vor allem im Bereich der Kryo-EM zum Einsatz (Popot, 2018), da keine freien Detergenzmizellen vorliegen sollten (Zoonens & Popot, 2014).

Nach negativer Kontrastierung kristallisierte sich PMAL-C8 aufgrund der besseren Verteilung der Partikel als geeignetes Polymer für die Rekonstitution von mFI heraus (Tabelle 12.13).

Das Elutionsprofil der durchgeführten SEC nach Rekonstitution zeigt eine stark ausgeprägte Schulter mit einem spitzen, nach hinten auslaufendem Peak (Abbildung 6.6). Im SDS-Gel der Peakfraktionen befindet sich eine starke Bande bei 17 kDa und eine schwächere bei 34 kDa (Abbildung 6.6). Nach dem Vergleich von SECs in Fos12 und ohne Detergenz im Puffer stellte sich heraus, dass es sich nur im Bereich der Schulter um rekonstituiertes Protein handelt (Abbildung 6.7). In den 2D-Klassen nach Aufnahme eines Kryo-EM Datensatzes einer Probe des Hauptpeaks war keine Mizelle sichtbar (Abbildung 12.35).

Zur Bestimmung des Oligomerzustandes von mFI in PMAL-C8 wurde eine SEC mit Dreifach-Detektion durchgeführt (Kapitel 6.2.4.2). Die vorherige präparative SEC trennte drei Peaks auf (Abbildung 12.4), die nach Aufkonzentrieren der entsprechenden Peakfraktionen einzeln analysiert wurden. In Abbildung 6.10 ist die deutliche Rechtsverschiebung in der Absorption der Elutionsprofile der einzelnen Pools dargestellt. Mit in Fos12 solubilisiertem mFI wird eine

Auftrennung der Oligomere auch nicht durch Weglassen von Fos12 im Puffer erreicht (Abbildung 12.30). Das SAXS-Modell in P32-Symmetrie deutet darauf hin, dass es zur Aneinanderlagerung hydrophober Bereiche kommt (Abbildung 6.16), sodass mFI vermutlich selbst ohne Detergenz in Lösung bleibt. Wahrscheinlich lagern sich die hydrophoben Bereiche im Protein so aneinander an, dass durch Umklappen von zwei langen Helices vier kürzere Helices entstehen. Dies wiederum verhindert die Bindung von Detergenz oder Amphipol.

Im ersten Pool betrug das Molekulargewicht 187 kDa, im zweiten 115 kDa und im dritten 67 kDa. Alle Peaks eluierten, wie auch bei mFI in Fos12, ab einem Retentionsvolumen von 10 mL. Allerdings waren die Hochpunkte der Peaks in PMAL-C8 deutlich nach rechts verschoben. Nach einem Retentionsvolumen von etwa 20 mL wurde bei allen drei Messungen ein Peak aufgezeichnet, der von freiem Amphipol oder Fos12 stammen könnte, was wegen der zuvor durchgeführten SEC überraschend ist. Weil das berechnete Molekulargewicht lediglich 7 kDa betrug, ist unklar, worum es sich handelt.

Bei Bestimmung des Molekulargewichtes in Fos12 wurde über den gesamten Peak ein Molekulargewicht von 135 kDa ermittelt. Dies entspricht etwa dem Molekulargewicht des zweiten Pools in PMAL-C8, sodass mFI auch hier wahrscheinlich als Hexamer ohne Detergenz oder PMAL-C8 vorliegt. Es bestätigt sich damit, dass es sich um nicht-rekonstituiertes Protein handelt.

Unbekannt ist die Anzahl von mit mFI interagierenden PMAL-C8-Molekülen. Für A8-35 wurde eine Masse von etwa 40 kDa bestimmt, die sich aus 9-10 A8-35 Molekülen zusammensetzt (Gohon et al., 2006; Giusti et al., 2014), wobei A8-35 ein Molekulargewicht von 9 kDa aufweist. Insgesamt wurde festgestellt, dass Protein/A8-35-Komplexe größer sind als Protein/Detergenz-Komplexe (Zoonens et al., 2005; Charvolin et al., 2014). PMAL-C8 mit einem Molekulargewicht von etwa 18,5 kDa könnte somit einen größeren Anteil am Molekulargewicht des mFI-PMAL-C8-Komplexes bei erfolgreicher Rekonstitution haben. Im Gel der nativen PAGE (Abbildung 6.9) wurde eine Bande bei 165 kDa detektiert, die dem Protein aus Pool 1 entsprechen würde, wobei es sich um ein Oktamer handeln könnte. Bei Pool 3 könnte es sich um ein Trimer handeln, eine entsprechende Bande wurde auch in der nativen PAGE (Abbildung 6.9) detektiert.

Dies passt zu den Ergebnissen der HPLC-SAXS-Messungen. Hier wurde vermutet, dass mFI mit weniger Detergenz eine dreifache Symmetrie und in höherer Detergenzkonzentration eine vierfache Symmetrie aufweist.

Die Art und Konzentration des Detergenz kann einen Effekt auf den Oligomerisierungsgrad von Membranproteinen haben, wie es beispielsweise bei Proteorhodopsin (Heuberger et al., 2002), LacS und XylP (Kinnebrew et al., 2014) gezeigt wurde. Es könnte sich auch bei mFI in 0,05 % Fos12 und mFI ohne Detergenz bzw. rekonstituiert in PMAL-C8 um verschiedene Oligomerzustände handeln.

Das durchschnittliche Molekulargewicht aus den drei analysierten Pools in PMAL-C8 beträgt 123 kDa. Dies stimmt gut mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht von 135 kDa der ausgewerteten Fraktionen aus mFI in Fos12 überein. Dies spricht für ein Vorliegen der gleichen Oligomere in Lösung, die in PMAL-C8 (bzw. ohne Detergenz) wegen der Verwendung einer Superdex 200-Säule besser separiert wurden, während in Fos12 eine Mischung verschiedener Oligomerzustände vorliegt.

### 7.3.3 HPLC-SAXS-Messung von mFI-StreptII

Anhand der gemessenen HPLC-SAXS-Daten erfolgte eine weitere Charakterisierung von mFI und die Berechnung von Oberflächenmodellen.

#### 7.3.3.1 Strukturelle Parameter

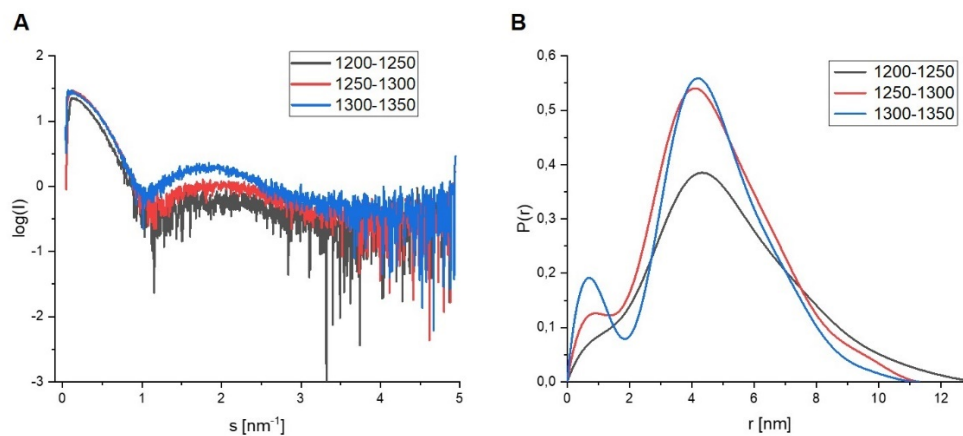
Mit dem Programm CHROMIXS (Panjkovich & Svergun, 2016) erfolgte die Erstellung eines „SAXS-Chromatogramms“ und eine erste Auswertung der Daten. Der  $R_g$  weist einen konstanten, aber leicht U-förmigen Verlauf auf, der sich durch eine stärkere intermolekulare Interaktion von Partikeln bei höheren Proteinkonzentrationen (Grobelyny et al., 2014) in der Mitte des Peaks oder durch unterschiedliche Mengen gebundenes Detergenz erklären lässt. Das Molekulargewicht fiel von etwa 120 kDa auf 20 kDa ab. Allerdings basiert die Berechnung des Molekulargewichtes auf dem Porod-Volumen (Porod, 1951; Fischer et al., 2010) mit der Annahme, dass  $MW = V_{\text{Porod}}/1,6$  nur für globuläre Proteine gilt (Rambo & Tainer, 2011). Zur Auswertung wurden die Frames mit einem konstanten  $R_g$  herangezogen, sodass der Intensitätspeak in einen vorderen, mittleren und hinteren Bereich zur Gewährleistung einer möglichst guten Trennung der Oligomere unterteilt wurde. Die Berechnung des Molekulargewichts aus dem Porodvolumen über DATPOROD (Franke et al., 2017) mit den als verlässlicher geltenden (Petoukhov et al., 2012) prozessierten Daten aus GNOM (Svergun, 1992) ergab für den vorderen Teil des Peaks ein Molekulargewicht von 209 kDa, für die Peakmitte von 163 kDa und für den hinteren Teil von 172 kDa. Der leichte Anstieg des Molekulargewichts hinten ist bereits am erwähnten U-förmigen Verlauf des  $R_g$  erkennbar.

Eine leichte Über-Subtraktion des Puffers (Arleth et al., 2017) konnte nicht vermieden werden. Da die Probe vor der Injektion stark aufkonzentriert wurde, ist die Detergenzkonzentration der Probe unbekannt und entspricht vermutlich nicht der des Puffers. Für zukünftige SAXS-Experimente sollte die aufkonzentrierte Probe daher gegen Puffer mit 0,05 % Fos12 dialysiert werden und idealerweise das Dialysat als Puffer zur Hintergrundsubtraktion verwendet werden (Bu & Engelman, 1999).

Bei Überlagerung der drei mit PRIMUS (Konarev et al., 2003) ermittelten Streukurven (Abbildung 7.2) wird die Zunahme des Mizellenanteils zum Peak-Ende in Form der stärker werdenden Intensität ab  $s > 1$  deutlich. In mit reinem Fos12 durchgeführten SAXS-Experimenten wurde für kleine Winkel nur ein sehr schwaches Streusignal detektiert, während bei größeren Winkeln ( $1-2 \text{ nm}^{-1}$ ) ebenfalls die Streuintensität zunahm (Lipfert et al., 2007).



Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich im hinteren Teil der Streukurve um das Streusignal der reinen Detergenzmizelle handelt und der Einfluss von Fos12 im vorderen Bereich der Streukurve gering ist.



**Abbildung 7.2: Streukurven der HPLC-SAXS-Messung in 0,05 % Fos12.** **A** Überlagerung der aus PRIMUS erhaltenen Streukurven. Der Anteil der Mizelle nimmt bei der Streukurve von Frame 1200-1250 (blau) über Frame 1250-1300 (hellblau) zu Frame 1300-1350 (rot) zu. **B**  $P(r)$ -Funktionen der ungeschnittenen Daten.

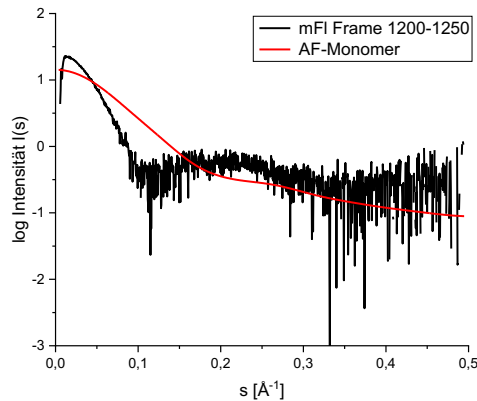
Wegen der Störung der Detergenzmizelle bei der Auswertung der Daten wurden diese bei  $s \sim 1,4 \text{ nm}^{-1}$  geschnitten. Dies führte zu einer deutlich besseren Datenqualität, widerstrebt jedoch der Richtlinie, dass für die Berechnung der  $P(r)$ -Funktion  $s = 8/R_g$  gelten soll (Petoukhov et al., 2012). Da vermutet wird, dass lediglich die Information der Detergenzmizelle, jedoch nicht die des Proteins verloren geht und generell unklar ist, welche strukturelle Information genau sich hinter diesem Bereich der Streukurve verbirgt (Ivanović et al., 2020), wurde dennoch so verfahren.

Experimente an DDM-Mizellen zeigten eine Verbesserung der Übereinstimmung zwischen durch *Molecular Dynamics* (MD)-Simulationen erstellten und experimentellen SAXS-Kurven bei ausschließlicher Verwendung von Regionen aus kleineren Winkeln ( $< 1\text{-}2 \text{ nm}^{-1}$ ). Dies hängt mit der heterogenen, asymmetrischen Zusammensetzung der Mizelle zusammen (Ivanović et al., 2020).

Die initiale Auswertung der ungeschnittenen Daten ist in Tabelle 12.1 angegeben. Bei Erstellen der  $P(r)$ -Funktion wird der Einfluss der Mizelle zwischen 0 und 2 nm deutlich (Abbildung 7.2). Das Schneiden der Daten führte zu einer exzellenten Datenqualität (Svergun, 1992) mit einer Zuverlässigkeit der  $P(r)$ -Funktionen von 94-95 % (Tabelle 6.2). Der Kratky-Plot liefert eine Aussage über die Faltung des Proteins und geht in allen drei Bereichen für  $I \times s^2$  gegen 0 bei  $s \sim 1$ . Dies bestätigt die Faltung des Proteins (Bernadó, 2010; Mertens & Svergun, 2010). Anschließend steigt  $I \times s^2$  wieder an, was auf die nicht optimale Subtraktion des Puffers hinweist (Hammel, 2012).

Die HPLC-SAXS-Messungen zeigen eindeutig, dass es sich bei mFI um ein Oligomer handelt und bestätigen damit die Ergebnisse der SEC mit RI- und RALS-Messung und der nativen PAGE. Für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 19,6 kDa wäre ein  $R_g$  von 2,3 nm zu erwarten (Schneidman-Duhovny et al., 2013, 2016). In Abbildung 7.3 sind die experimentell

bestimmte Streukurve von Frame 1200-1250 und eine aus dem AlphaFold-Monomer (Jumper et al., 2021) mit dem FoXS-Server (Schneidman-Duhovny et al., 2013, 2016) erstellte theoretische Streukurve übereinander gelagert, was zu einem sehr hohen  $\chi^2$  von 45,08 führte. Dies zeigt ebenfalls deutlich, dass mFI als höheres Oligomer vorliegt.



**Abbildung 7.3: Experimentell bestimmte Streukurve und mit dem FoXS-Server berechnete Streukurve des AlphaFold-Modells.** In rot ist die theoretische mittels FoXS-Server (Schneidman-Duhovny et al., 2013, 2016) berechnete Streukurve des AlphaFold-Modells (Jumper et al., 2021) dargestellt, in schwarz die experimentell bestimmte Streukurve. Das  $\chi^2$  beträgt 45,08.

Vorherige Experimente zeigten bei mFI verschiedene Oligomerformen und deren Koelution (Kapitel 6.2.4), sodass dies auch bei der Erstellung der Oberflächenmodelle aus den HPLC-SAXS-Messungen bedacht werden muss, die im Folgenden diskutiert werden.

### 7.3.3.2 Oberflächen- und Strukturmodelle von mFI

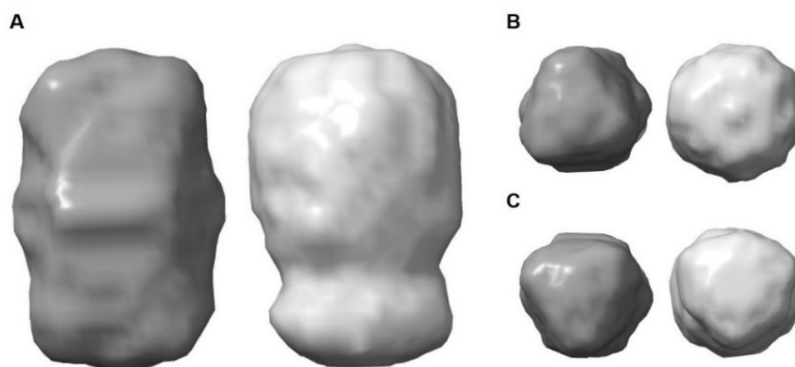
#### Oberflächenmodell von mFI-StreptII für Frame 1200-1250

Die erste Schwierigkeit lag im Auffinden der richtigen Symmetrie und Anisometrie. Daher wurden zunächst mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) 20 Modelle ohne angewandte Symmetrie (P1) jeweils ohne Anisometrie-Vorgabe, in länglicher und flacher Form erstellt. Aufgrund der niedrigeren ICP-Werte und der besseren Übereinstimmung mit den experimentellen Daten deutete dies auf eine längliche Form hin. Es wurden alle potenziellen Symmetrien und Anisometrien getestet (Tabelle 12.3), wobei eine P32-Symmetrie am besten mit den experimentellen Daten übereinstimmte. Aufgrund vorheriger Experimente wurde bereits das Vorliegen von mFI als Tetramer, Hexamer und Oktamer angenommen. Das spätere Erstellen von atomaren Strukturmodellen mit CORAL (Petoukhov et al., 2012) oder SASREF (Petoukhov & Svergun, 2005) lieferte nur mit einer P32-Symmetrie verlässliche Ergebnisse. Auch wenn es sich um die gleiche Anzahl an Monomeren handelt wie die P32-Symmetrie, ist eine C6-Symmetrie unwahrscheinlicher (Tabelle 12.3). In der Natur kommt eine D3 (P32)-Symmetrie rund fünfmal häufiger vor als eine C6-Symmetrie, wie eine Analyse von über 100000 in der Proteindatenbank (PDB) hinterlegten Quartärstrukturen ergab (www.QSbio.org, (Dey et al., 2017; Gaber & Pavšič, 2021)). Zyklische Proteinkomplexe ( $C_n$ -Symmetrie) kommen dennoch am häufigsten in Membranstrukturen vor, während Proteinkomplexe mit dihedraler Symmetrie ( $D_n$ ) häufiger bei löslichen zytoplasmatischen

Enzymen zu finden sind (Goodsell & Olson, 2000; Bergendahl & Marsh, 2017). Eine Struktur eines Kanals mit D3-Symmetrie ist in der PDB nicht hinterlegt, denn typischerweise weisen Kanäle eine zyklische Symmetrie auf ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), weshalb es sich wahrscheinlich nicht um den funktionellen Zustand des Proteins handelt. Durch die zu niedrige Detergenzmenge lagern sich mFI-Monomere vermutlich so zusammen, dass sich das Oligomer wie ein lösliches Protein verhält, wobei hydrophobe Bereiche im Inneren des Proteins liegen.

Der Vergleich von DAMMIF-Modellen (Franke & Svergun, 2009) verschiedener Symmetrien zeigte eindeutig, dass die Dichtekarten mit P3- und P32-Symmetrie am besten mit der P1-Dichtekarte korrelierten und das Volumen des Modells mit P32 am besten mit dem P1-Modell und den experimentell bestimmten Daten übereinstimmte (Tabelle 6.4).

Die Messung wird in Lösung durchgeführt, weshalb das Protein zufällig orientiert ist. Nach Vergleich der Modelle mit P3- und P32-Symmetrie (Abbildung 7.4) wäre eine mögliche Hypothese, dass es sich um verschiedene Konformationen handelt mit der P3-Symmetrie als „halb-geschlossenen“ Zustand und der P32-Symmetrie als „offenen“ Zustand. Konformationsänderungen in Folge einer Änderung des Membranpotentials oder der Bindung eines Liganden werden bei Kanälen häufig im Bereich des Selektivitätsfilters beobachtet (Bokhovchuk et al., 2018; Hering et al., 2018; Labro & Snyders, 2012; Zhang et al., 2023; Zhao & MacKinnon, 2023).



**Abbildung 7.4: Mögliche Symmetrien bei mFI für Frame 1200-1250.** Abbildung der Dichtekarten der Oberflächenmodelle in P32- und P3-Symmetrie von vorne (A), oben (B) und unten (C). Es ist jeweils die Dichtekarte des *damaver*-Modells des größten Clusters mit einer Auflösung von 15 Å dargestellt. Das mit SUPCOMB (Kozin & Svergun, 2001) bestimmte NSD zwischen den Modellen liegt bei 0,36.

Das P32-Modell (Abbildung 6.15, Abbildung 7.4) hat eine maximale Ausdehnung  $D_{\max}$  von 13,59 nm, das P3-Modell einen  $D_{\max}$  von 13,24 nm, womit die Modelle etwas größer sind als der experimentell bestimmte  $D_{\max}$  von 12,6 nm. Die Gyrationradien stimmen exakt mit dem aus der  $P(r)$ -Funktion ermitteltem  $R_g$  überein und der NSD von 0,36 zeigt die Übereinstimmung der Oberflächenmodelle.

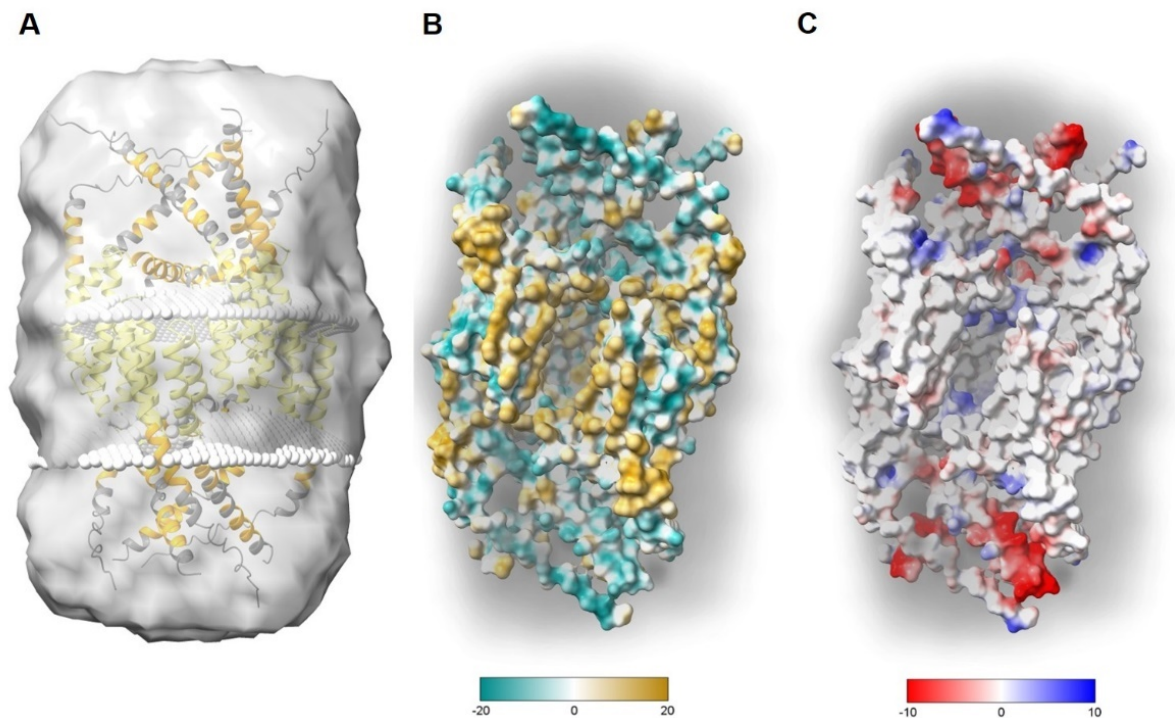
### Strukturmodell von mFI für Frame 1200-1250

Für das Tetramer von mFI wurde ein Homologie-Modell erstellt. Es ist davon auszugehen, dass es sich beim Hexamer nicht um die aktive Form des Proteins handelt, weshalb das Protein eine andere Konformation, wie die von AlphaFold (Jumper et al., 2021, AF-Q8BG21-

F1) vorhergesagte Struktur annehmen könnte. Deshalb wurde hier weiterhin das AlphaFold-Modell von mFI verwendet und mit CORAL (Petoukhov et al., 2012) und SASREF (Petoukhov & Svergun, 2005) 10 bzw. 20 Strukturmodelle erstellt. Es wurde das Strukturmodell gewählt, dessen mit CRY SOL (Franke et al., 2017) und FoXS-Server (Schneidman-Duhovny et al., 2013; 2016) berechnete theoretische Streukurve am besten mit der experimentell bestimmten Streukurve übereinstimmte.

Es wurde die Hydrophobizität (Abbildung 7.5B) und das elektrostatische Potential des Modells (Abbildung 7.5C) untersucht. Die Position einzelner Reste sollte an dieser Stelle allerdings wegen der unzuverlässigen Strukturvorhersage von AlphaFold mit niedrigem pLDDT nicht diskutiert werden. Negativ geladene Reste befinden sich vor allem im C-Terminus, positiv geladene Reste zeigen sich vorwiegend an den Außenseiten der Membran. Dies widerspricht der „*positive inside*“ Regel, nach der positiv geladene Reste im zytoplasmatischen Bereich der Membran liegen (von Heijne, 1992), während sie im Modell wegen der symmetrischen Anordnung auf beiden Seiten der Membran vorzufinden sind. Die Annahme verschiedener Orientierungen von mFI in der Membran ist denkbar, da auch Server zur Vorhersage der Topologie unterschiedliche Ergebnisse liefern (Tabelle 12.15). MFI besitzt sowohl im N- als auch im C-Terminus mehr negativ als positiv geladene Aminosäuren, sodass unterschiedliche Orientierungen in der Membran denkbar sind (Baker et al., 2017).

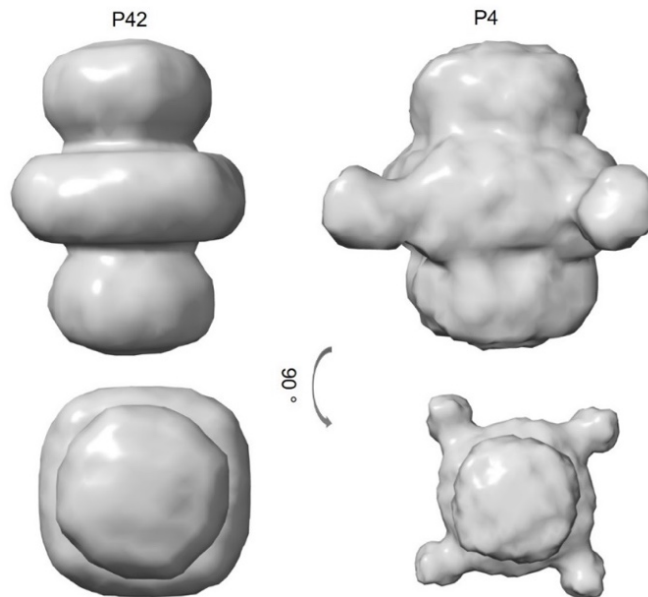
Hydrophobe Reste finden sich vorwiegend innerhalb der vorhergesagten Membranregion, während hydrophile Reste außerhalb liegen. Dabei zeigen die hydrophoben Bereiche der mFI-Monomere zueinander, während die hydrophileren Bereiche nach außen gerichtet sind. Dies könnte erklären, warum mFI auch ohne Detergenz im Puffer stabil bleibt (Abbildung 12.30) und sich wie ein lösliches Protein anordnet. Mit Hilfe des PPM 3.0-Servers (Lomize et al., 2021) wurde die Orientierung des Proteins in einer gekrümmten Membran bestimmt, wobei die Membrandicke 29 Å beträgt (Abbildung 7.5A). Die mit Hilfe des Membrain-Servers (Yin et al., 2018) vorhergesagten amphipathischen Helices liegen teilweise auf der Membranoberfläche. Diese reine Strukturvorhersage müsste durch eine experimentell bestimmte Struktur bestätigt werden.



**Abbildung 7.5: Analyse des aus den SEC-SAXS-Daten (Frame 1200-1250) ermittelten Strukturmodells von mFI.** **A** Darstellung der Position einer gekrümmten Membran in weiß, berechnet mit PPM 3.0 (Lomize et al., 2021). In die Membran eingebettete Reste sind gelb gefärbt, aliphatische Helices orange. **B** Analyse der Hydrophobizität. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb gefärbt, hydrophile grün (Ghose et al., 1998). **C** Darstellung des elektrostatischen Potentials. Negativ geladene Aminosäuren sind rot gefärbt, positiv geladene blau. Die Abbildungen wurden mit ChimeraX erstellt.

### Oberflächenmodell für Frame 1250-1300

Auch nach Testen verschiedener Symmetrien und Anisometrien (Tabelle 12.5) und dem Verfeinern von DAMMIF-Modellen (Franke & Svergun, 2009, Tabelle 12.4) kristallisierte sich keine eindeutige Symmetrie oder Anisometrie heraus, weshalb verschiedene getestet wurden. Gleichzeitig wurden mit SASREF (Petoukhov & Svergun, 2005) unter Verwendung des AlphaFold-Modells Strukturmodelle mit verschiedenen Symmetrien erstellt, theoretische Streukurven mit dem FoXS-Server (Schneidman-Duhovny et al., 2013, 2016) berechnet und mit den experimentellen Streukurven verglichen. Daraus ergab sich, dass es sich um ein Oktamer mit P42- oder P4-Symmetrie handelt (Tabelle 12.5). Beide Modelle stimmen gut mit den experimentellen Daten überein (Tabelle 6.2), wobei der Vergleich der P42- und P4-Oberflächenmodelle in Abbildung 7.6 gezeigt ist.



**Abbildung 7.6: Mögliche Symmetrien von mFI für Frame 1250-1300.** Abbildung der Dichtekarten der Oberflächenmodelle in P42- und P4-Symmetrie in länglicher Form. Es ist jeweils die Dichtekarte des *damaver*-Modells aus 17 Modellen mit einer Auflösung von 16 Å dargestellt. Das P42-Modell hat eine Ausdehnung von 11,78 nm, das P4-Modell von 11,66 nm.

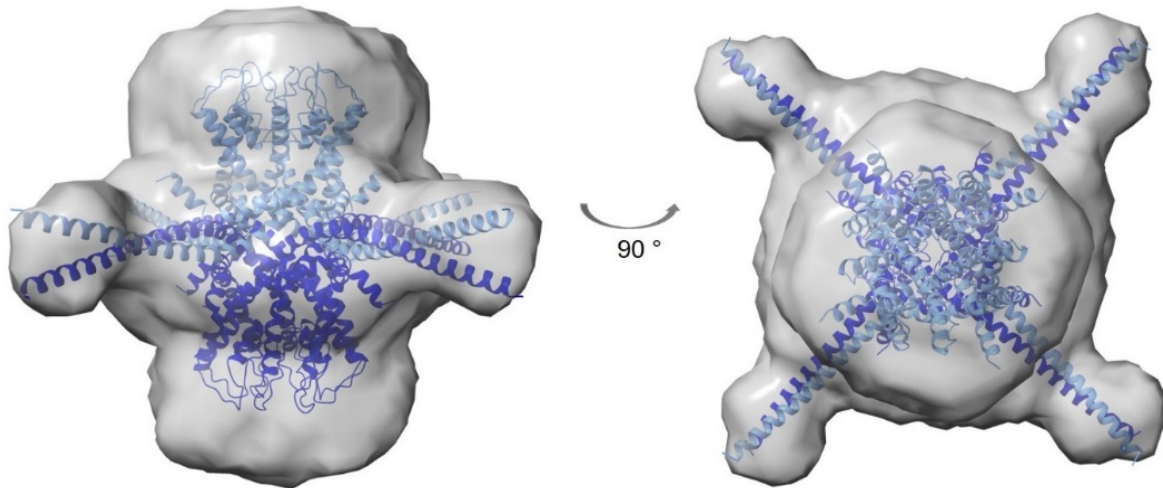
Wie bereits für Frame 1200-1250 gezeigt, ist auch in der Mitte des Peaks (Frame 1250-1300) das Vorliegen von mFI in verschiedenen Konformationen möglich. Das Vorliegen von mFI als Oktamer stimmt mit den Ergebnissen der nativen PAGE überein. Das in der SEC mit Dreifach-Detektion bestimmte Molekulargewicht von 133 kDa liegt unter dem theoretischen Molekulargewicht eines Oktamers von 157 kDa. Allerdings ist mit beiden erwähnten Methoden bei der Bestimmung des Molekulargewichts von einer Abweichung von 10 % auszugehen (Gimpl et al., 2016; Piiadov et al., 2019) und der Anteil des Detergenz am Molekulargewicht unbekannt. Aus Abbildung 7.2 wird eine Zunahme des Einflusses der Detergenzmizelle bei Frame 1250-1300 ersichtlich, weshalb das Schneiden der Daten möglicherweise das Erstellen von Oberflächenmodellen stärker beeinflusst. Jedoch konnte mit den ungeschnittenen Daten (Tabelle 12.1) kein Strukturmodell erstellt werden. Zur Bildung eines Oktamers müssen zwei Tetramere miteinander interagieren. Es wird vermutet, dass in dem Oberflächenmodell in P42-Symmetrie verschiedene Orientierungen der Tetramere zueinander enthalten sind, während das P4-Modell nur eine Orientierung repräsentiert.

### Strukturmodell für Frame 1250-1300

Mittels FoXS-Server (Schneidman-Duhovny et al., 2013; 2016) wurde unter Verwendung des AlphaFold-Modells ein Oktamer mit zwei Domänen in P4-Symmetrie als am wahrscheinlichsten ermittelt, weshalb 10 Modelle aus zwei Tetrameren mit SASREF (Petoukhov & Svergun, 2005) erstellt wurden. Auch wenn die Strukturmodelle zu den experimentellen Daten passen, stimmen sie nicht mit den durch DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) erstellten Oberflächenmodellen überein. Da die SAXS-Daten aufgrund ihrer guten Qualität verlässlich sind, spricht dies für eine falsche Vorhersage durch AlphaFold. Daher



wurde das selbst erstellte Homologie-Modell (Kapitel 6.2.9) verwendet, wobei der Fit manuell in ChimeraX erfolgte. Das in das Oberflächenmodell in P4-Symmetrie angepasste Homologiemodell ist in Abbildung 7.7 gezeigt. Die Ausbuchtungen in der Mitte des Oberflächenmodells bieten Platz für die langen C-Termini des Homologiemodells.



**Abbildung 7.7: Oberflächen- und Strukturmodell von einem mFI-Oktamer in P4-Symmetrie.** Dargestellt ist das *damaver*-Modell in P4-Symmetrie und das selbst erstellte Homologie-Modell von mFI auf Grundlage des TRPV5-Kanals. Die Anpassung erfolgte mit ChimeraX, wobei 0,54 % der Atome außerhalb der Dichtekarte liegen.

Wie mFI in dieser Konformation in der Zelle vorliegen könnte, ist unklar. Dass im P4-Modell die hydrophoben Bereiche der beiden Tetramere getrennt voneinander vorliegen und die hydrophileren N- und C-Termini von mFI dazwischen liegen, lässt die Interaktion zweier in verschiedenen Membranen lokalisierten Tetramere vermuten. Das sich in der Plasmamembran befindende mFI könnte mit mFI in synaptischen Vesikeln interagieren. Auch könnte diese Art der Interaktion eine Rolle bei der Zellkompetition spielen, wo durch Interaktion der C-Termini verschiedener mFI-Isoformen ein Stimulus weitergegeben werden könnte. Die mFI-Isoformen mFweA und mFweD gelten als Gewinner-Isoformen, während es sich bei mFweB und mFweE um Verlierer-Isoformen handelt (Petrova et al., 2012). Wegen des fehlenden C-Terminus bei den beiden letztgenannten (Abbildung 7.27, Abbildung 12.1) kann möglicherweise nur eine Interaktion zwischen Gewinner-, aber nicht zwischen Verlierer-Isoformen stattfinden und durch das Ausbleiben der Interaktion kein Signal zum Überleben der Zelle weitergegeben werden, was schließlich zur Apoptose führt.

Möglich ist aber auch, dass mFI in der Zelle als Tetramer vorliegt und es nur durch die hohe Konzentration des Proteins zur Interaktion der Tetramere kommt. Dafür spricht, dass im nativen Gel (Abbildung 6.9) auch eine Bande auf Höhe eines Tetramers detektiert wurde. Außerdem verstärkte sich beim Crosslinking mit DSS die Bande auf Höhe eines Tetramers im Gel der nativen PAGE (Abbildung 12.8).

### Oberflächen- und Strukturmodell für Frame 1300-1350

Da sich aus den Modellen ohne Symmetrie keine bevorzugte Anisometrie ablesen lässt, wurden verschiedene Symmetrien getestet (Atsas 2.8.1, 3.2.1, (Franke & Svergun, 2009)).

Alle Symmetrien wiesen gute statistische Werte mit ähnlichen Ausdehnungen und Volumina auf (Tabelle 12.6). Für die Modelle in P1-Symmetrie wurde ein Molekulargewicht von etwa 168 kDa bestimmt, was für das Vorhandensein eines Oktamers im hinteren Teil des Peaks bei Frame 1300-1350 spricht.

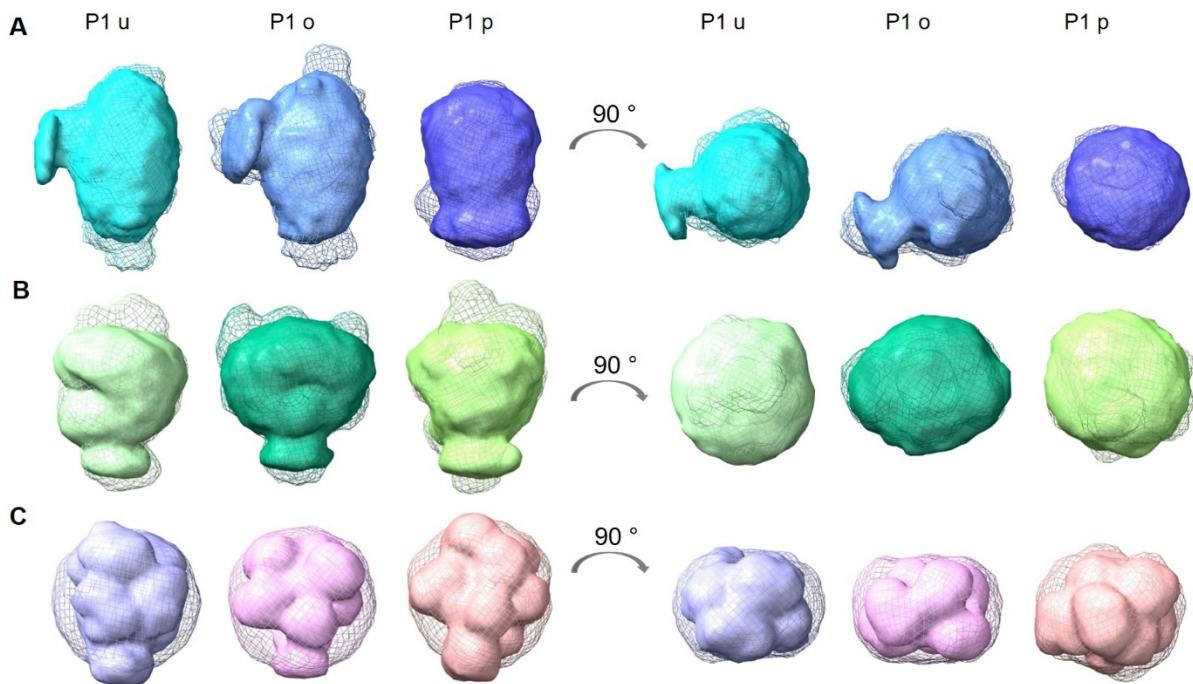
Beim Vergleich der Modelle ohne Symmetrie aus den geschnittenen ( $s = 1,2$ ) und ungeschnittenen Daten ( $s = 2,28$ ) zeigte sich, dass die Modelle aus den geschnittenen Daten nicht wie angenommen eine flache, sondern eine längliche Orientierung aufweisen (Abbildung 7.8C). Dadurch wird von SASREF und CORAL (Petoukhov et al., 2012) eine falsche Orientierung beim Erstellen der Strukturmodelle angenommen. Gleiches gilt für die Verwendung des Homologie-Modells. Mit den ungeschnittenen Daten konnten allerdings weder Oberflächen- noch Strukturmodelle passend zu den experimentellen Daten erstellt werden (Tabelle 12.7). Vermutlich stört die Anwesenheit der höheren Menge Detergenz, da Detergenzmizellen dynamisch sind und somit in verschiedenen Formen in Lösung vorliegen (Slotboom et al., 2008).

### Fazit

Zu berücksichtigen sind die Unterschiede in der Proteinkonzentration, die im vorderen und hinteren Teil des Peaks niedriger ausfällt als in der Peakmitte. Es wäre möglich, dass mFI bei einer höheren Proteinkonzentration zur Oktamerisierung neigt, während es bei niedrigeren Konzentrationen als Tetramer vorliegt. Dieser Effekt ließe sich auch auf die Detergenzkonzentration zurückführen, sodass eine zu niedrige Detergenzkonzentration zur Bildung eines Hexamers führt.

In Abbildung 7.8 sind die aus den geschnittenen und ungeschnittenen Streukurven berechneten Oberflächenmodelle ohne Symmetrie mit verschiedenen Anisometrien gezeigt. Die zugehörigen Ergebnisse der ungeschnittenen Daten aus DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) finden sich in Tabelle 12.2.





**Abbildung 7.8: Oberflächenmodelle ohne Symmetrie (P1).** Dargestellt sind die Dichtekarten der *damaver*-Modelle der jeweils größten Cluster aus 20 Modellen mit einer Auflösung von 15 Å. **A** *Damaver*-Modelle aus Frame 1200-1250 **B** *Damaver*-Modelle aus Frame 1250-1300. Die Oberflächenmodelle der geschnittenen Daten sind als Oberfläche dargestellt, die Modelle der ungeschnittenen Daten als Gitter. **C** *Damaver*-Modelle aus Frame 1300-1350. Links ist die Seitenansicht gezeigt, rechts die Aufsicht. Die Oberflächenmodelle der geschnittenen Daten sind als Gitter dargestellt, die Modelle der ungeschnittenen Daten als Oberfläche. Die Abbildung wurde mit ChimeraX (Goddard et al., 2018) erstellt.

Für die Modelle aus Frame 1200-1250 (Abbildung 7.8A) und Frame 1250-1300 (Abbildung 7.8B) wird ersichtlich, dass das Schneiden der Daten keinen Einfluss auf die Form der Modelle hatte. Für Frame 1300-1350 sind zur besseren Veranschaulichung die Modelle der geschnittenen Daten als Gitter, die Modelle der ungeschnittenen Daten als Oberfläche dargestellt. Obwohl sie gut übereinstimmen (Abbildung 7.8C), sorgt die runde Form der Modelle der geschnittenen Daten für eine falsche Orientierung der später erstellten Strukturmodelle, die deshalb nicht gezeigt sind.

Bei Calcium-Kanälen handelt es sich in der Regel um Homo- oder Hetero-Oligomere. Vier Transmembrandomänen aus vier Untereinheiten bilden bei VGCCs die Pore (Sather & McCleskey, 2003). TRPV5 und TRPV6 enthalten sechs Transmembrandomänen und bilden ein Homo- oder Heterotetramer, wobei jeweils eine Transmembrandomäne zur Bildung der Pore beiträgt (Hoenderop et al., 2003; Owsianik et al., 2006). Auch CRACM/Orai1 Proteine bilden Dimere oder Tetramere, wobei jeweils ein Monomer mit einer Transmembrandomäne zur Bildung der Pore beiträgt (Vig et al., 2006).

Das homolog zu TRPV5 erstellte Tetramer-Modell zeigt, dass jedes mFI-Monomer mit einer Transmembrandomäne zur Bildung einer Pore beitragen könnte, wobei das EAP-Motiv zum Inneren der Pore gerichtet ist. Somit muss es sich bei den Modellen mit der vierfachen Symmetrie um den physiologischen Zustand des Proteins handeln.

Eine weitere Methode zeigte, dass mFI als Hexamer und Oktamer in verschiedenen Oligomierzuständen vorliegt. Die durchgeführten SSM-Experimente bestätigten, dass es sich bei mFI um einen Calcium-Kanal handelt. Dazu muss mFI ein Tetramer bilden, was zu der Annahme führt, dass es sich beim Hexamer nicht um den funktionellen Zustand des Proteins handelt.

### 7.3.3.3 Einfluss der Detergenzkonzentration und des pH-Wertes

Da aus der in 6.2.5.1 beschriebenen HPLC-SAXS-Messung ein Anstieg des Anteils an Detergenz im Peakverlauf mit zunehmendem Retentionsvolumen erkennbar ist und dies gleichzeitig mit unterschiedlichen Oligomerisierungszuständen einhergeht, wurde eine Korrelation dieser Beobachtung weiter untersucht. Die HPLC-SAXS-Messung wurde mit einer Fos12-Konzentration von 0,05 % durchgeführt, was nur knapp über der CMC von 0,047 % liegt. Der folgende Vergleich der Messungen berücksichtigte die Auswertung von Frame 1200-1250, da die Detergenzkonzentration in diesem Bereich des Peaks am wahrscheinlichsten bei 0,05 % und in der Mitte des Peaks vermutlich höher liegt. Es erfolgten weitere Messungen mit doppelter (0,1 % Fos12) und fünffacher (0,25 % Fos12) CMC. Der Überschuss an Detergenz führte zu einer leichten Rechtsverschiebung des Intensitätspeaks (Abbildung 6.20). Mit zunehmender Fos12-Konzentration nahmen der Gyrationradius und die maximale Ausdehnung leicht ab (Tabelle 12.9). Der Vergleich mit den bei  $s \sim 1,2\text{-}1,4 \text{ nm}^{-1}$  geschnittenen Daten, was den Einfluss der Fos12-Mizelle zum Oberflächenmodell minimieren sollte, zeigt die gleiche Tendenz (Tabelle 6.6, Tabelle 12.9). Die acht in die Oberflächenmodelle mit P4-Symmetrie passenden Monomere sprechen für das eigentliche Vorhandensein eines Oktamers in beiden höheren Detergenzkonzentrationen.

Zwei Faktoren könnten Einfluss auf das geringere Volumen und die geringere Ausdehnung der Oberflächenmodelle des Oktamers haben. Während die Messung in 0,05 % Fos12 bei einem pH-Wert von 4,5 durchgeführt wurde, erfolgten die Messungen in 0,1 und 0,25 % Fos12 bei einem pH-Wert von 8, sodass der Einfluss des pH-Wertes ebenfalls berücksichtigt werden muss. mFI besitzt vor allem im C-Terminus saure Aminosäurereste, die bei einem pH-Wert von 8 negativ geladen und bei einem pH-Wert von 4,5 eher neutral vorliegen. Die negative Ladung erlaubt die Bindung positiv geladener Ionen, wie auch von im Puffer befindlichem Calcium, was zu einer Konformationsänderung führen kann. Der pH-Wert könnte auch unabhängig von Calcium einen Einfluss haben. Mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 5,39 hat mFI bei einem pH-Wert von 4,5 eine Nettoladung von etwa 4,6, während die Ladung bei einem pH-Wert von 8 bei etwa -5,4 liegt ([www.proteinpi.ch](http://www.proteinpi.ch), Abbildung 7.25). Sowohl die Bindung von Calcium als auch die Ladung von mFI könnte zu einer veränderten Interaktion der Monomere untereinander führen, was ein kompakteres Oligomer bewirkt.

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses der Detergenzkonzentration und des pH-Wertes wären hochaufgelöste Strukturmodelle nötig. Außerdem sollte die Calcium-Affinität bei

verschiedenen pH-Werten bestimmt werden. Durchgeführte Experimente mittels Microscale-Thermophorese und isothermer Titrationskalorimetrie waren allerdings nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

## **7.4 Strukturelle Analyse von mFI-StreptII**

### **7.4.1 Kristallisation von mFI-StreptII**

Das Testen verschiedener Protein-, Detergenz- und Salzkonzentrationen, pH-Werte und Detergenzien, die limitierte Proteolyse oder kleine Amphiphile, das Verwenden verschiedener Kristallisationstechniken und unterschiedlicher Kristallisations-Screens führte zu einer Vielzahl von Kristallen in über 15000 getesteten Bedingungen (Tabelle 12.12). Mit über 2000 Kristallen wurden Röntgenbeugungsexperimente an verschiedenen Beamlines des ESRF und SLS ohne Detektion einer für Proteine typischen Röntgendiffraktion durchgeführt. Auch Optimierungsversuche vielversprechender Bedingungen waren erfolglos. Dabei handelte es sich um zum Kristallwachstum führende Bedingungen mit Kristallen ohne Diffraction. Auch das Testen verschiedener Kryo-Schutzbedingungen führte zu keiner Proteindiffraction. Nach Auflösen einiger Kristalle in Probenpuffer konnte bei anschließender Analyse im Western-Blot mFI nachgewiesen werden (Abbildung 6.23), was das Vorhandensein von Proteinkristallen bestätigte. Da kein Kristall eine Diffraction aufwies, gab es keinerlei Anhaltspunkte für weitere Optimierungsversuche, die zudem aufgrund sehr langer Inkubationszeiten der Ansätze von mehreren Monaten limitiert waren.

Die fehlende Bildung beugender Kristalle kann eine Vielzahl von Gründen haben, deren Ursache einerseits die Kristallisation von Membranproteinen im Allgemeinen, andererseits die mögliche Struktur von mFI selbst sein kann.

Die Solubilisierung von Proteinen aus der Membran kann die Kristallisation verhindernde Änderungen mit sich bringen, da das Entfernen nativer Lipide zu einer Konformationsänderung führen kann. Außerdem handelt es sich bei mFI um ein eukaryotisches, heterolog produziertes Protein, sodass durch das Fehlen eukaryotischer Membranbestandteile wie PIP<sub>2</sub> mFI möglicherweise nicht in der Konformation vorliegt wie in der Maus. Durch verschiedene Methoden wurde das Vorliegen von mFI in verschiedenen Oligomierzuständen bereits gezeigt, wobei die Oligomere zusätzlich verschiedene Konformationen annehmen könnten. Dies kann die Bildung eines intakten Kristallgitters verhindern. Nachteilig wirkt sich auch die Koelution von Detergenz bei der SEC aus, was zu einer zu hohen Detergenzkonzentration nach dem Aufkonzentrieren des Proteins führen könnte. Obwohl das Protein entweder dialysiert oder nach dem Aufkonzentrieren mit Detergenz-freiem Puffer verdünnt wurde, spricht das Vorhandensein eines großen Anteils an Phasentrennung (Abbildung 6.22) jedoch für eine zu hohe Detergenzkonzentration. Wird ein Großteil des Proteins von Detergenz bedeckt, verhindert dies die Ausbildung von Kristallkontakten (Newby et al., 2009).

Trotz der hohen Stabilität von mFI in Fos12 und dessen erfolgreicher Einsatz bei der Solubilisierung von Membranproteinen (Eshaghi et al., 2005; Newstead et al., 2007; White et al., 2007) gibt es nur wenige in Fos12 kristallisierte Proteine. Dazu gehören beispielsweise die Oxidase A (Ma et al., 2004) oder OmpF (Kefala et al., 2010), sodass sich Fos12 generell nicht zur Kristallisation eignen könnte.

Außerdem weist mFI flexible N- und C-Termini auf. Einerseits handelt es sich bei diesen, abgesehen von einem Bereich um Exon 3, um die einzigen Bereiche von mFI, die nicht in der Membran liegen und damit an der Ausbildung von Kristallkontakten beteiligt sein könnten, andererseits könnte die Flexibilität in diesen Bereichen den Aufbau eines intakten Kristallgitters verhindern.

Die *in-meso* Kristallisation unter Verwendung von Bizellen könnte die Problematik mit dem Detergenz vermeiden (Faham & Bowie, 2002). Diese für mFI bereits getestete Methode (Lafontaine, 2017) führte ebenfalls nicht zu beugenden Kristallen. Wegen der weiterhin bestehenden Problematik verschiedener Oligomerezustände in der Probe wurde die Bizellen-Technik vorerst nicht weiterverfolgt.

Beim Erhalt schwach beugender Kristalle könnten diese durch wiederholtes *Seeding* optimiert werden. Dabei soll die Zugabe initial erhaltener Kristalle zu einer Kristallisationslösung die Kristallqualität und damit die Diffraktion verbessern (He et al., 2020).

Für mFI als Oligomer eignet sich die Methode der Kryo-EM besser zur Aufklärung der Struktur, da der Zustand in Lösung untersucht wird. Aus einem Kryo-EM Datensatz von guter Qualität ließen sich außerdem hochaufgelöste Strukturen verschiedener Oligomerezustände getrennt analysieren.

### **7.4.2 Kryo-EM von mFI-StrepII**

Nachdem gezeigt wurde, dass es sich bei mFI vorwiegend um ein Hexamer mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa handelt, kam die Kryo-EM zur Aufklärung der Proteinstruktur in Betracht. Sie war lange nur für Proteine ab 200 kDa geeignet, inzwischen wurden auch kleinere Proteine rekonstruiert (Wu et al., 2020). Je kleiner ein Protein ist, umso schlechter ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgrund der geringeren Anzahl zum Signal beitragender streuender Atome. Deshalb stellt auch das Molekulargewicht von mFI mit rund 80-160 kDa eine Herausforderung dar.

#### **7.4.2.1 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StrepII in PMAL-C8**

Wie bereits vermutet, handelt es sich um nicht-rekonstituiertes, unter anderem als Hexamer ohne sichtbare Detergenzmizelle vorliegendes Protein (Abbildung 12.35). Eine weitere Auswertung des Datensatzes war nicht möglich, da die 2D-Klassen nach mehreren Runden der 2D-Klassifizierung aufgrund der Heterogenität der Partikel und des geringen Kontrastes kollabierten.

#### 7.4.2.2 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StreptII in Fos12 mit Barium

Da festgestellt wurde, dass die Rekonstitution in PMAL-C8 nicht funktioniert, wurde ein weiterer Kryo-EM Datensatz in Fos12 aufgenommen. Die in 0,05 % Fos12 durchgeführte SEC hielt den Anteil an freiem Detergenz in der Probe gering, da dieses den Kontrast verschlechtern und zu einem dickeren Eis führen kann (Zoonens & Popot, 2014). Zusätzlich wurde das Protein vor der SEC mit 1 mM PIP<sub>2</sub> zum Erreichen eines nativeren Zustandes versetzt, nachdem eine Bindung von PIP<sub>2</sub> für dFwe gezeigt werden konnte (Li et al., 2020). Die SEC wurde mit 10 mM EDTA zur Entfernung von Calcium aus der Probe durchgeführt. Vor dem Frieren erfolgte die Zugabe von 2 mM BaCl<sub>2</sub> oder YbCl<sub>3</sub>. Aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte sollten die Ionen zur Verstärkung des Signals beitragen und das kleine Protein besser sichtbar machen. Nach der 2D-Klassifizierung wurde aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an einzelnen Punkten, die vermutlich auf Barium zurückzuführen sind, sichtbar, dass mFI in verschiedenen Oligomierzuständen vorliegen könnte (Abbildung 12.36). Eine andere Erklärung wäre die unzureichende Sättigung des Proteins mit Barium, wodurch eine unterschiedliche Anzahl an Ionen an mFI gebunden hat. Da die Dichte des Bariums zu stark war, ging die Dichte des Proteins verloren, was eine weitere Auswertung des Datensatzes verhinderte.

#### 7.4.2.3 Kryo-Elektronenmikroskopie von mFI-StreptII in DDM/CHS

Die Auswertung der Daten nach negativer Kontrastierung von mFI in DDM und CHS erwies sich bislang als am vielversprechendsten, da eine für Membranproteine typische Mizelle in den 2D-Klassen sichtbar war, die eine Aussparung in der Mitte aufwies (Abbildung 12.39). Somit lag mFI erstmals vollständig solubilisiert vor, weshalb von einer dem Homologiemodell ähnelnden Konformation mit zwei Transmembrandomänen ausgegangen werden kann. Dass nach Aufnahme eines Datensatzes keine Protein-Merkmale erkennbar waren (Daten nicht gezeigt), könnte auf das verwendete 200 keV TEM zurückzuführen sein. Ein 300 keV TEM könnte den Kontrast verbessern.

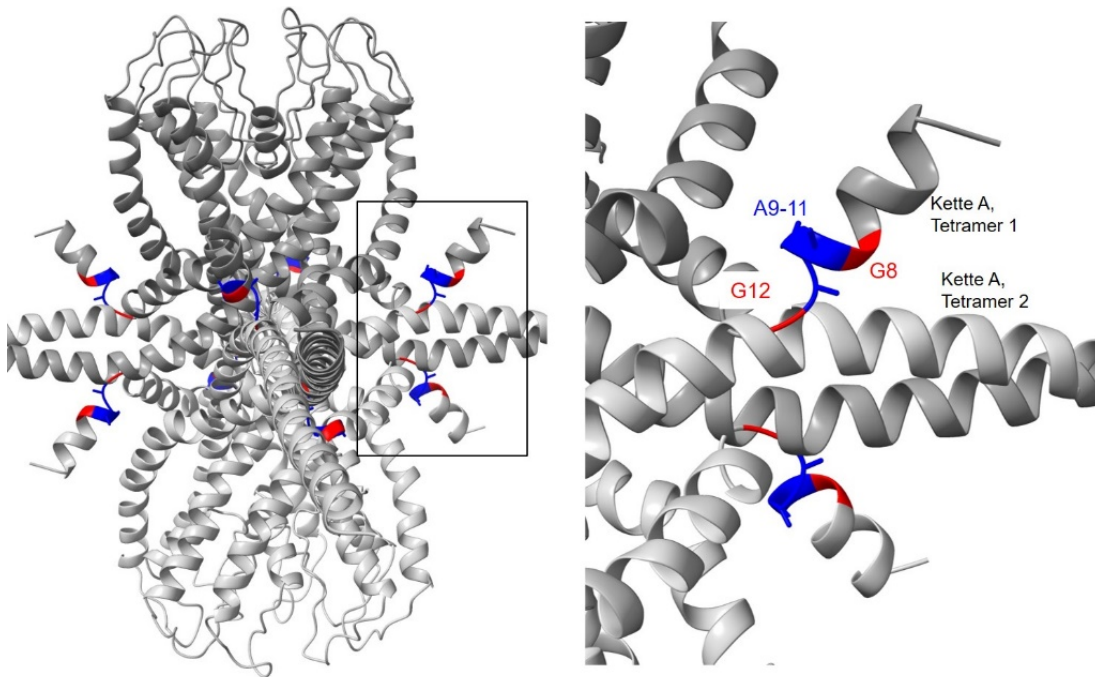
### 7.5 Herstellung von mFI-StreptII-Varianten für eine verbesserte Kristallisierbarkeit

Bei der Herstellung von mFI-Varianten wurden zwei Strategien verfolgt, nämlich die Verhinderung der Oligomerisierung und das Entfernen flexibler Bereiche. Im Folgenden soll der Grund für die ausbleibende verbesserte Kristallisierbarkeit der hergestellten Varianten diskutiert werden.

#### 7.5.1 mFI(G812L)-StreptII

Durch Mutation der Aminosäuren G8 und G12 zu Leucin sollte eine mögliche Interaktion der N-Termini von mFI beeinträchtigt und so die Oligomerisierung verhindert werden, da das GxxxG-Motiv die Helix-Helix-Interaktionen begünstigt (Kleiger et al., 2002).

Die Analog zu 6xHis-SUMO-mFI-StrepII durchgeführte Expression und Reinigung der G812L-Variante wies keine Unterschiede zu mFI auf. Erst bei der abschließend durchgeführten SEC zeigte sich bei Analyse der Peakfraktionen im SDS-Gel, dass die sonst vorhandene starke Bande bei etwa 35 kDa viel schwächer war und die Bande bei etwa 20 kDa dominierte (Abbildung 6.39). Die daraufhin erfolgte Molekulargewichtsbestimmung durch eine SEC in Kombination mit RI- und RALS-Messung ergab ein Molekulargewicht von 67 kDa, was einem Trimer entsprechen könnte (Abbildung 6.40). Bei der durchgeführten Messung war mFI in PMAL-C8 rekonstituiert, was für die Dissoziation eines Hexamers in Trimere spricht. Unbekannt war der Anteil an noch vorhandenem Fos12 oder PMAL-C8, sodass es sich mit einer Abweichung von 10 % (Gimpl et al., 2016) auch um ein Tetramer handeln könnte. An dieser Stelle wäre die Wiederholung der Messung in Fos12 interessant gewesen, um eine Dissoziation von mFI(G812L)-StrepII als Oktamer in Tetramere zu untersuchen. In Abbildung 7.9 ist das Homologiemodell des Oktamers mit zueinander zeigenden N-Termini dargestellt. Da es sich nur um eine Homologiemodell handelt, wäre eine andere Position der flexiblen N- und C-Termini ebenfalls denkbar. Eine Interaktion des einen Tetramers mit dem anderen über das GxxxG-Motiv ist jedoch vorstellbar. Kommt es durch Einführen der Leucine in das Motiv zu einer räumlichen Trennung der N-Termini, könnte die Interaktion zwischen den Tetrameren unterbrochen werden und diese dissoziieren. Es ist unklar, ob diese Interaktion auch eine physiologische Relevanz hat oder lediglich durch die Entfernung des Proteins aus der Membran möglich wird. Interaktionen zwischen zwei Oligomeren wurden nur in *Tight Junctions* gezeigt. Hier interagieren beispielsweise Claudin-, Connexin- oder Aquaporin-Protomere zur Bildung eines parazellulären Kanals miteinander (Fromm et al., 2017; Suzuki et al., 2015). Bei mFI wäre die Interaktion zweier Protomere im Rahmen der Zell-Kompetition zur Weitergabe eines Stimulus an eine benachbarte Zelle denkbar.



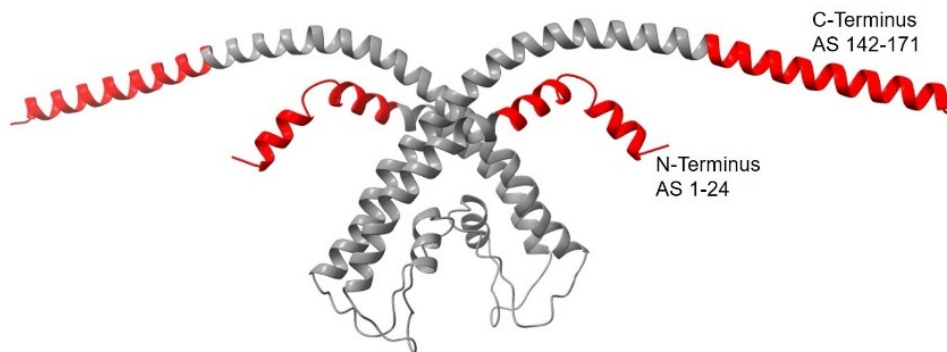
**Abbildung 7.9: Homologiemodell von mFI und Markierung des GxxxG-Motivs.** Die Erstellung des Modells erfolgte nach HPLC-SAXS-Messung mit SASREF und SREFLEX unter Verwendung des Homologie-Modells von mFI. G8 und G12 sind rot markiert, A9-11 sind blau markiert. Die Abbildung wurde mit ChimeraX erstellt.

Das schnelle Ausfallen des Proteins bei Inkubation bei 4 °C lässt auf eine geringere Stabilität schließen. Zusätzlich wurde ein N-terminaler Abbau eines klar definierten Bereichs der Variante beobachtet (Abbildung 6.41). Die Kristallisation von mFI(G812L)-StreptII führte nicht zur gewünschten Verbesserung und es konnten keine streuenden Kristalle produziert werden. Dennoch liefert die Variante einen weiteren Hinweis auf die Struktur des mFI-Oligomers und zeigt, dass die N-Termini zweier Oligomere zueinander gerichtet sind und eine Interaktion begünstigen.

### 7.5.2 Herstellung verkürzter mFI-StreptII-Konstrukte

Mit Hilfe des XtalPred-Servers (Slabinski et al., 2007) wurden in mFI ungeordnete Bereiche vorhergesagt, die die Kristallisation verhindern könnten und deshalb entfernt werden sollten. Dementsprechend wurden durch eine Omega-PCR die Aminosäuren 1-24, 142-171 oder beide Bereiche entfernt. Die mFIdC-StreptII-Variante (Deletion von AS 142-171) und SUMO-dNmFIdC-StreptII-Variante (Deletion von AS 1-14 und 142-171) waren stabil und verhielten sich wie das Volllängen-Protein, abgesehen von erwartungsgemäß tiefer laufenden Banden im SDS-Gel (Abbildung 12.24, Abbildung 12.26). Die Auswertung einer mit mFIdC-StreptII durchgeführten HPLC-SAXS-Messung war aufgrund der koeludierenden Fos12-Mizelle nicht möglich. Im Verlauf des Intensitätspeaks fiel das Molekulargewicht stark ab (Abbildung 12.25), sodass auch hier weiterhin ein dynamisches Oligomerisierungsverhalten vorzuliegen scheint. Bei der Reinigung von SUMO-dNmFIdC-StreptII war der SUMO-Verdau durch die SUMO-Protease Ulp1 nicht erfolgreich. Da Ulp1 die Struktur und nicht die Sequenz erkennt, könnte dies für eine fehlerhafte Faltung des SUMO-Anhängsel sprechen. In Abbildung 7.10 sind die

durch Omega-PCR entfernten Bereiche im Homologie-Modell von mFI rot markiert. Am C-Terminus wäre vermutlich das Entfernen weiterer Aminosäuren möglich. Der N-Terminus von mFI endet nach Entfernen der Aminosäuren 1-24 möglicherweise in der Membran, was die korrekte Faltung des SUMO-Anhängsels verhindern könnte, das ohne eine flexible Verbindung auf der Membran oder der Detergenzmizelle liegen müsste.



**Abbildung 7.10: Homologie-Modell von mFI mit Markierung der flexiblen Bereiche.** Zur Herstellung der verkürzten Varianten mFIdC-StrepII und SUMO-dNmFIdC-StrepII wurden die rot markierten Bereiche über Omega-PCR entfernt. Die Abbildung wurde mit ChimeraX erstellt.

Möglicherweise ist das SUMO-Anhängsel durch das Fehlen eines Linkers auch nicht zugänglich. Weil es als lösliche Domäne die Kristallisation durch Herstellen weiterer Kristallkontakte begünstigen könnte und gleichzeitig die ungeordneten Bereiche von mFI entfernt wurden, galt das Konstrukt als vielversprechender Kandidat für eine erfolgreiche Kristallisation. Allerdings führte auch hier keiner der getesteten 165 Kristalle zu einem Diffraktionsbild.

Dies lässt darauf schließen, dass nicht die möglichen ungeordneten Bereiche, sondern das Vorhandensein verschiedener Oligomerezustände die Kristallisation von mFI behindern.

## 7.6 Interaktion von mFI-StrepII und Calmodulin

Eine weitere Strategie zur Optimierung der Kristallisation war die Kokristallisation mit weiteren Proteinen, die möglicherweise einen bestimmten Oligomerezustand stabilisieren könnten. Hierzu kam Calmodulin in Frage, bei dem es sich um einen typischen Regulator von Calcium-Kanälen mit einer Rolle bei der Auslösung der Endozytose handelt (Saimi & Kung, 1994; Wu et al., 2014). Die Funktion von mFI als Calcium-Kanal und seine Bedeutung bei der Endozytose sprechen für eine Interaktion der beiden Proteine.

Calmodulin besteht aus einem N-Lappen (AS 1-76) und einem C-Lappen (AS 81-146), die jeweils mit ihren zwei EF-Händen zwei Calcium-Ionen binden. Dies erlaubt die energetisch ungünstige Exposition hydrophober Reste gegenüber der wässrigen Umgebung, die dadurch Zielproteine binden können (Kuboniwa et al., 1995).

### 7.6.1 Identifikation der Calmodulin-Bindestelle

Die Calmodulin-Bindestelle wurde mit Hilfe der Calmodulin *Target Database* (Yap et al., 2000) identifiziert, wobei die mFI-Sequenz SALGKKGDaisyARI (AS 136-151) mit einem Score von



9 die höchste Wahrscheinlichkeit für eine CaM-Bindung aufweist. Trotz fehlender definierter Konsensus-Sequenz für CaM-Bindestellen weisen sie charakteristische Merkmale wie die Neigung zu Helices, eine positive Nettoladung der Binderegion und zwei hydrophobe Ankerreste (F, I, L, V oder W) mit einem bestimmten Abstand auf, auf dessen Grundlage die Klassifizierung der Bindestellen erfolgt (Tidow & Nissen, 2013). Die Reste zwischen den hydrophoben Ankerresten sind aufgrund der Flexibilität der zentralen CaM-Helix in der Sequenz und Anzahl variabel (Persechini & Kretsinger, 1988; Mruk et al., 2014), wobei Kanäle häufig ein 1-10-Motiv aufweisen (Lau et al., 2012; Mruk et al., 2014). Zur näheren Eingrenzung des Bindemotivs wurde mit verschiedenen mFI-Peptiden gearbeitet. Für P1 wurde ein 1-12-Motiv in den Resten 4-15 und für P2 ein 1-14-Motiv in den Resten 3-16 vorhergesagt, wohingegen in P3 und P4 kein Motiv gefunden wurde (Mruk et al., 2014; <https://cam.umassmed.edu/>). Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um den Abstand zwischen den Ankerresten.

### 7.6.2 Interaktion von Calmodulin und Flower-Peptiden

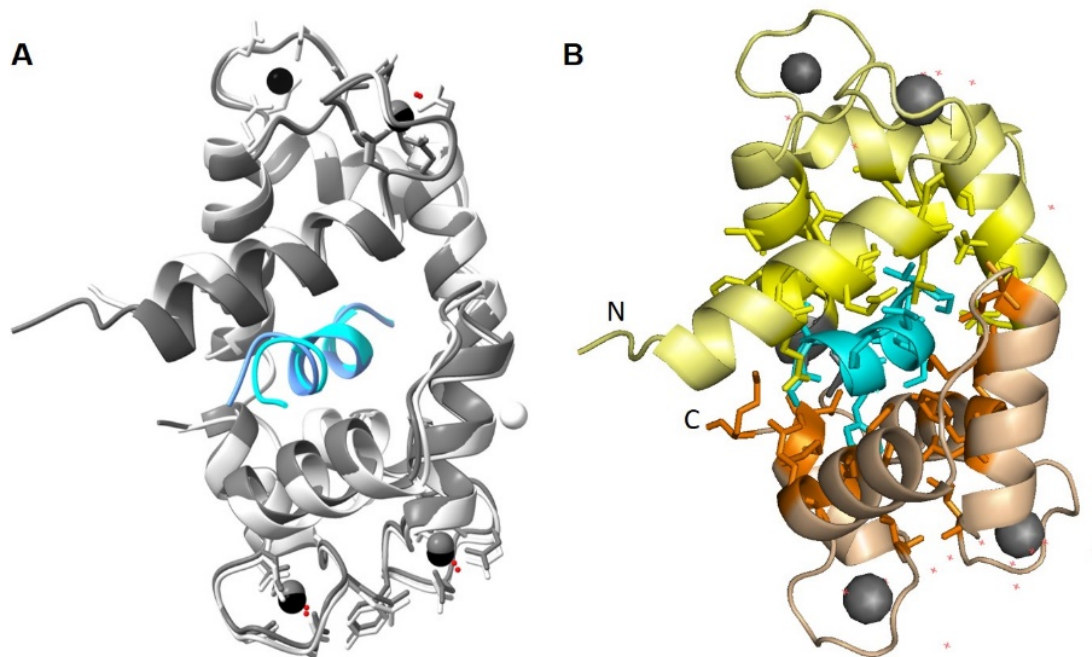
Die vier getesteten, von der AG Jung (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, UdS) hergestellten Peptide decken den C-Terminus von mFI ab. Mittels GST-Pulldown-Assay wurde eine Interaktion mit P1 (AIAFATGVLYGLSALGKKGD) und P2 (GVLYGLSALGKKGDAISYAR) nachgewiesen (Abbildung 6.42), was zu der Erkenntnis passt, dass P3 und P4 kein klassisches CaM-Bindemotiv aufweisen. Weiterhin wurde mittels SEC die Calcium-Abhängigkeit der Bindung gezeigt (Urbansky, 2017).

### 7.6.3 Kristallisation, Datensätze und Struktur von CaM mit mFI-Peptiden

Eine Kristallstruktur von CaM mit mFI-Peptiden sollte Aufschluss über die genaue Interaktion von CaM und mFI liefern. Außerdem kann diese Kristallstruktur später zur Strukturaufklärung eines mFI-CaM-Komplexes bei der Lösung des Phasenproblems durch molekularen Ersatz dienen.

Die Strukturen des CaM-P1- und CaM-P2-Komplexes konnte anhand der gesammelten Diffraktionsdaten (Tabelle 6.7) durch molekularen Ersatz basierend auf einer CaM-Struktur, aus der ein TRPV1-Peptid entfernt wurde (Lau et al, 2012; PDB: 3SUI), gelöst werden. Die Struktur des CaM-P1-Komplexes wurde mit einer Auflösung von 2,15 Å aufgeklärt, während für den CaM-P2-Komplex eine Auflösung von 1,87 Å erreicht wurde. Wegen der Identifizierung der gleichen Aminosäuren (GVLYGLSALG) in beiden Strukturen wurde aufgrund der besseren Auflösung die CaM-P2-Struktur genauer analysiert.

In Abbildung 7.11A sind die Kristallstrukturen für CaM-P1 und CaM-P2 übereinander gelagert und in der Cartoon-Darstellung abgebildet. Der RMSD-Wert (*root mean square deviation*) von 0,731 Å zeigt die hohe Übereinstimmung der beiden Strukturen an.



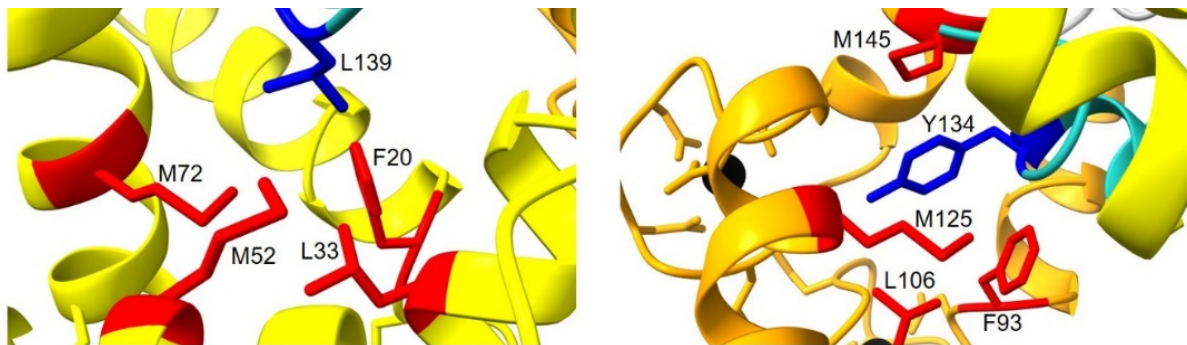
**Abbildung 7.11: Kristallstruktur von CaM-P1 und CaM-P2 bei 2,15 bzw. 1,87 Å Auflösung in Cartoon-Darstellung.** **A** Überlagerung der Kristallstruktur von CaM-P1 und CaM-P2. In hellgrau ist die Struktur von CaM-P1 dargestellt, in dunkelgrau von CaM-P2. Das Peptid ist blau gefärbt und die Calcium-Ionen schwarz. Die Aminosäurereste der EF-Hände, die Calcium binden, sind durch Stäbchen dargestellt. **B** Darstellung der Struktur von CaM-P2, wobei der N-Lappen gelb und der C-Lappen orange gefärbt ist. Die mit dem Peptid interagierenden Aminosäuren sind durch die Stäbchen-Darstellung hervorgehoben. Die Abbildungen wurden mit Chimera (A) und PyMOL (B) erstellt (Pettersen et al., 2004; Lilkova, 2015).

Die Peptide sind antiparallel orientiert, sodass der N-Terminus mit dem CaM-C-Lappen und der C-Terminus mit dem CaM-N-Lappen interagiert. In Abbildung 7.11B ist die CaM-P2-Struktur dargestellt. Mittels PyMOL (Lilkova, 2015) wurden interagierende Reste identifiziert, die sich in Abbildung 7.11B durch die Stäbchen-Darstellung der entsprechenden Aminosäuren hervorheben und in der Aminosäuresequenz in Abbildung 7.12 farblich markiert sind.

Die Struktur von CaM mit einem TRPV1-Peptid (Lau et al., 2012), mit der der molekulare Ersatz durchgeführt wurde, entspricht der Gesamtstruktur von CaM mit mFI-Peptid (RMSD 1,153 Å). Weitere Strukturen von Calcium-CaM-Peptid-Komplexen weisen eine ähnliche Struktur auf, dazu zählt beispielsweise die CaM-abhängige Kinase Kinase (CaMKK) (Kurokawa et al., 2001) oder die endotheliale Stickoxid-Synthase (Aoyagi et al., 2003).

Das Peptid wird durch Interaktion der zwei Anker-Reste Y134 und L139 mit Resten der hydrophoben Tasche von N- und C-Lappen verankert (Abbildung 7.12). Die Reste F20, L33, M52 und M72 bilden die FLMM<sub>N</sub>-Tetrade und interagieren mit L139, während die Reste F93, L106, M125 und M145 die FLMM<sub>C</sub>-Tetrade bilden und mit Y134 interagieren. Einen vergleichbaren Aufbau zeigt auch der CaM-TRPV1-Peptid-Komplex (Lau et al., 2012), allerdings liegt beim mFI-Peptid anstatt des 1-10-Motivs ungewöhnlicherweise ein sehr kurzes 1-6-Motiv vor, wobei dieser Abstand bekannterweise nur bei einem 1-5-10-Motiv vorkommt (Tidow & Nissen, 2013). Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, dass CaM durch seine konformelle Flexibilität nicht nur eine Vielzahl von Zielproteinen binden kann, sondern auch für das Passen einer Vielzahl spezifischer Peptidsequenzen in das gleiche CaM-Gerüst (Lau et al., 2012).

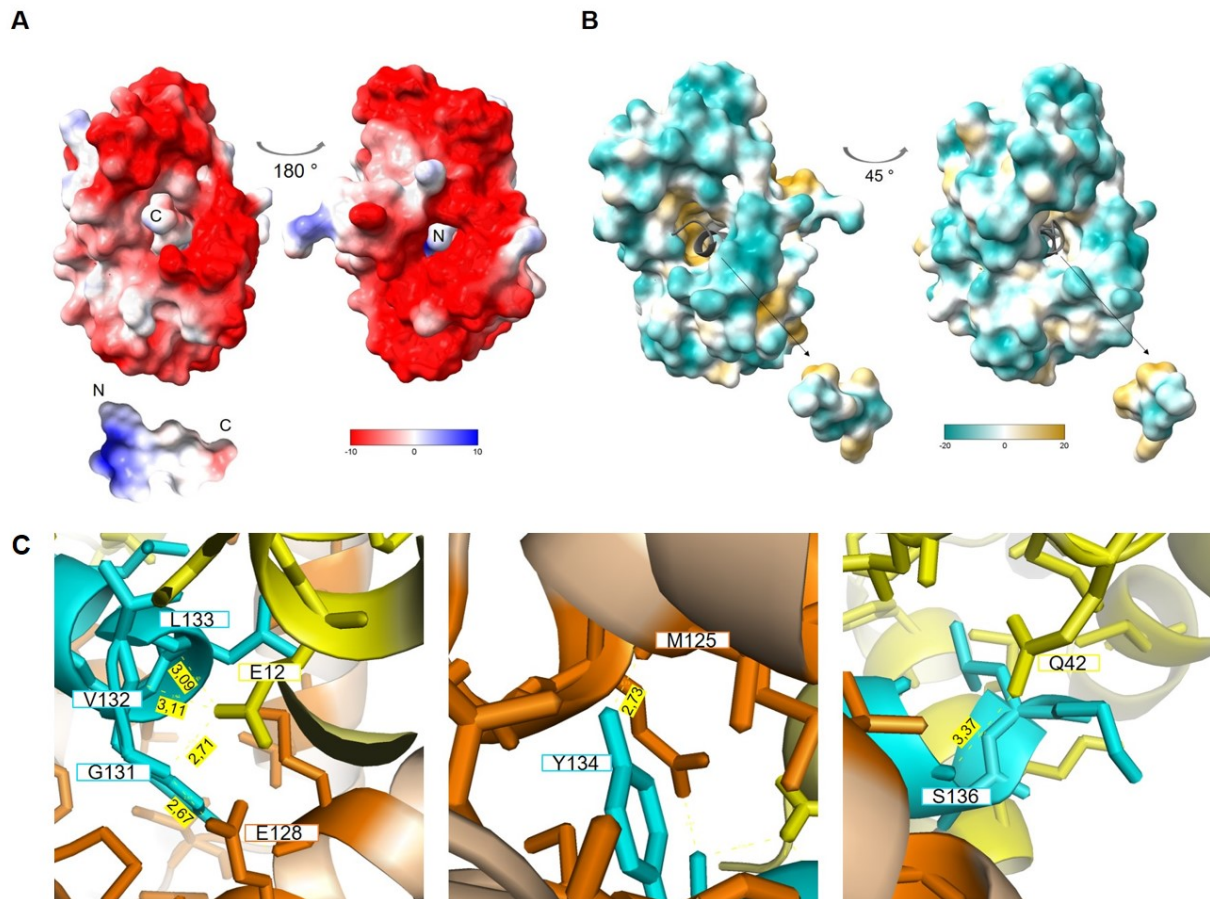
Bei Y134 handelt es sich um keinen typischen hydrophoben Ankerrest, weshalb hier stärker der hydrophobe, aromatische Ring für die Interaktion verantwortlich ist als die hydrophile OH-Gruppe.



MADQLTEEQI AEFKEAFSLF DKDGDGTITT KELGTVMRSL GQNPTEAELQ  
 DMINEVDADG NGTIDFPEFL TMMARKMKDT DSEEEIREAF RVFDKDGNGY  
 ISAAELRHVM TNLGEKLTDE EVDEMIREAD IDGDGQVNYE EFVQMTAK

**Abbildung 7.12: FLMM<sub>N</sub>- und FLMM<sub>C</sub>-Tetrade von CaM mit den interagierenden Ankerresten L139 und Y134 des mFI-Peptids.** In rot sind die CaM-Reste der hydrophoben Taschen markiert, die interagierenden Aminosäuren des Peptids sind blau gefärbt. Die Abbildung wurde mit Chimera (Pettersen et al., 2004) erstellt. Die mittels PyMOL identifizierten Schnittstellen-Reste sind in der abgebildeten Sequenz farblich markiert, wobei die interagierenden Reste des N-Lappens gelb, des C-Lappens orange und der Tetrade rot markiert sind. Reste der Tetraden sind unterstrichen.

Abbildung 7.13A zeigt die Orientierung des positiveren N-Terminus des Peptids zur elektronegativeren Öffnung von CaM und das Herausragen des negativeren C-Terminus aus der weniger positiven Öffnung von CaM. Gleichzeitig ist die hydrophobere Seite des Peptids zur hydrophoben Seite von CaM orientiert (Abbildung 7.13B). Diese zwei Faktoren könnten für die Orientierung des Peptids sorgen.



**Abbildung 7.13: Analyse der CaM-mFI-Peptid-Struktur.** **A** Analyse der Schnittstelle zwischen CaM und mFI-Peptid in Hinblick auf das elektrostatische Potential. Der elektropositive N-Terminus des Peptids ist zur elektronegativeren Öffnung von CaM orientiert. **B** Analyse der Schnittstelle zwischen CaM und mFI-Peptid in Hinblick auf die Hydrophobizität. Der hydrophobe Bereich des Peptids ist zur hydrophoben Tasche von CaM orientiert. **C** Wasserstoffbrücken zwischen CaM und P2, die mittels PyMOL (Lilkova, 2015) bestimmt wurden. Die Bindungslängen sind in Å angegeben.

Zusätzlich wird die Interaktion zwischen CaM und Peptid über Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt, insbesondere im N-Terminus des Peptids mit den Aminosäuren G131, V132 und L133, die mit einer Glutaminsäure des N-Lappens (E12) und des C-Lappens (E128) interagieren (Abbildung 7.13C).

Nach Eingrenzung der CaM-Bindestelle in mFI wurde die Konservierung der Bindestelle in anderen Isoformen und Homologen untersucht. Die Sequenz des in der Struktur identifizierten Peptids ist in Flower-Proteinen aus *Drosophila*, der Maus und dem Menschen hoch konserviert (Abbildung 7.14). Interessanterweise fehlt die CaM-Bindestelle in den mFI-Isoformen mFweB und mFweE, wobei vor allem mFweB eine Rolle als Verlierer-Isoform hat (Petrova et al., 2012).



dFweUbi	121	FGLASLFGSGLIFGT	GVVYGMALGKK	ASAEDMRAAAQQT	FG-----GNTPAQT----	169
dFweLoseA	121	FGLASLFGSGLIFGT	GVVYGMALGKK	ASREDMAAAATSPT	QMAGSQAGGQMOMGG----	176
dFweLoseB	121	FGLASLFGSGLIFGT	GVVYGMALGKN	KHIFLVRNYI-----	-----	157
<b>mFweA</b>	115	LTLTLLGNIAFAT	GVLYGLSALG	KKGDAISYARIQQ	QRQQAD--EEK-----LAETF	167
mFweB	106	-----	-----	-----	-----	106
mFweD	53	LTLTLLGNIAFAT	GVLYGLSALG	KKGDAISYARIQQ	QRQQAD--EEK-----LAETF	105
mFweE	115	PDVRLPNRNTISL	-----	-----	-----	128
hFwe1	74	LTLTLLGNIAFAT	GVLYGLSALG	KKAQTEAGSFAAQ	HPREPGPFSEGTRQAFATPAVV	134
hFwe2	116	LTLTLLGNIAFAT	GVLYGLSALG	KKAQTEAGSFAAQ	HPREPGPFSEGTRQAFATPAVV	176
hFwe3	74	LTLTLLGNIAFAT	GVLYGLSALG	KKGDAISYARIQQ	QRQQAD--EEK-----LAETL	126
hFwe4	116	LTLTLLGNIAFAT	GVLYGLSALG	KKGDAISYARIQQ	QRQQAD--EEK-----LAETL	168

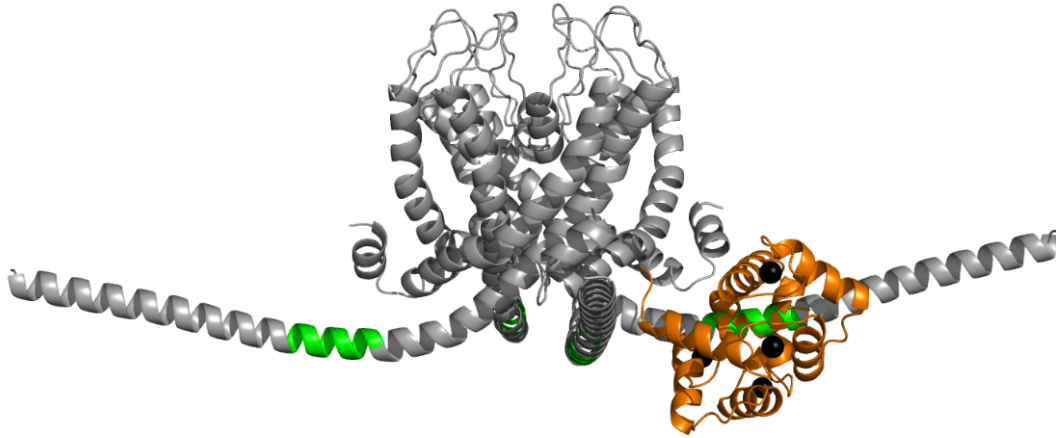
**Abbildung 7.14: Sequenzalinierung im Bereich der CaM-Bindestelle von Flower-Isoformen aus *D. melanogaster*, *M. musculus* und *H. sapiens*.** Die Sequenzalinierung erfolgte mit Clustal Omega (Madeira et al., 2022). Das CaM-Bindemotiv ist hoch konserviert, aber fehlt in den Maus-Isoformen mFweB und mFweE.

In *D. melanogaster* induzierte vor allem die heterologe Expression der Maus-Isoformen mFweB und in geringerem Ausmaß die Isoform mFweE die Apoptose, während die Überexpression von mFweA und mFweD keinen Effekt auf das Überleben der Klone hatte (Petrova et al., 2012). Die Existenz des „Flower-Codes“ (Rhiner et al., 2010) in *D. melanogaster* und in humanen Zellen (Madan et al., 2019), in denen alle Isoformen die CaM-Bindestelle aufweisen, und die Reproduktion des „Flower-Codes“ nach Überexpression muriner Isoformen in *D. melanogaster* zeigt, dass die Zellkompetition in *D. melanogaster* und im Menschen nicht zwingend von einer Interaktion mit Calmodulin abhängt. Im Gegensatz dazu könnte in der Maus eine Abhängigkeit bestehen oder ein anderer Wirkungsmechanismus vorliegen, da nur die Gewinner-Isoformen die CaM-Bindestelle aufweisen. Die auch ohne CaM nachgewiesenen Calcium-Ströme sprechen für eine Inhibierung des Kanals durch CaM. So wäre die Bildung eines Kanals bei allen Isoformen denkbar, aber nur mFweA und mFweD können durch CaM inhibiert werden, was die Zellen vor einem zu starken Ionen-Einstrom schützt. Die Bildung eines funktionsfähigen Kanals durch mFweD erscheint jedoch unwahrscheinlich (Abbildung 7.27, Ravichandran, 2021), sodass die physiologische Funktion der Interaktion von mFI mit CaM noch geklärt werden muss.

#### 7.6.4 Die Interaktion von mFI und CaM ist Calcium-abhängig

Nach dem Nachweis der Interaktion zweier mFI-Peptide mit Calcium-CaM wurde die Interaktion von mFI und CaM untersucht und ein StrepII-Pulldown-Assay in An- und Abwesenheit von Calcium durchgeführt. Eine Calcium-abhängige Interaktion von mFI und CaM konnte gezeigt werden (Abbildung 6.45), eine klare Interaktion durch eine SEC hingegen nicht (Abbildung 12.29). Ursache dafür ist möglicherweise das Vorhandensein von Calcium im Puffer, sodass sich CaM in der geschlossenen Konformation befand, was die Interaktion mit der Helix von mFI erschweren könnte, da CaM um die Helix herumklappen muss. Werden beide Proteine zunächst ohne Calcium inkubiert und erst zu einem späteren Zeitpunkt Calcium hinzugegeben, könnte dies die Interaktion der beiden Proteine begünstigen. Weitere Kristallisationsansätze sollten auf diese Weise vorbereitet werden.

Andere Kanäle, wie beispielsweise TRPV5, werden ebenfalls durch Interaktion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM inhibiert. Dabei erfolgt die Interaktion über die Blockierung des Ausgangs der Kanal-Pore durch den C-Lappen von CaM (Dang et al., 2019).



**Abbildung 7.15: Homologie-Modell von mFI mit angelagerter  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-P2-Kristallstruktur.** MFI ist in grau dargestellt, das CaM-Bindemotiv ist grün markiert. CaM ist orange dargestellt, die vier Calcium-Ionen in schwarz. Die Abbildung wurde mit PyMOL (Lilkova, 2015) erstellt.

Abbildung 7.15 zeigt das Homologie-Modell von mFI mit der angelagerten Struktur von CaM-P2 am C-Terminus, dessen genaue Position unbekannt ist. Möglich wäre aufgrund seiner aliphatischen Eigenschaft ein Aufliegen auf der Membran. Durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM könnte er von der Membran gelöst werden und so den Ausgang der Pore blockieren. Theoretisch wäre die Bindung von vier CaM-Molekülen an tetrameres mFI möglich, wohingegen bei TRPV5 die Bindung von nur einem oder zwei CaM festgestellt wurde (Dang et al., 2019). Die Stöchiometrie ließe sich über isotherme Titrationskalorimetrie bestimmen. Die durchgeführten Experimente waren allerdings wegen freiem Detergenz oder Amphipol nicht auswertbar (Daten nicht gezeigt).

### 7.6.5 Kokristallisation von mFI und CaM

Nach dem Nachweis der Interaktion von mFI und CaM sollte die Kokristallisation der Proteine mit CaM als leicht zu kristallisierendes, lösliches Protein als Kristallisationschaperon erfolgen. Aus über 8000 getesteten Bedingungen wurden 329 Kristalle geerntet und Röntgendiffraktionsexperimente durchgeführt, wobei keiner dieser Kristalle eine für Proteine typische Röntgenbeugung aufwies. Im Gegensatz zur oft beobachteten Phasentrennung bei Kristallisation von mFI allein lag in ausgewählten Bedingungen am häufigsten ein klarer Tropfen vor (Abbildung 6.46), der auf eine zu niedrige Protein- oder Präzipitationsmittelkonzentration hindeutet. Die fehlende Proteindiffraktion der erhaltenen Kristalle deutet auf ein Problem bei der Kristallpackung hin. Eine durchgeführte SEC des Komplexes, wo nur im hinteren Teil des Peaks eine schwache Koelution beider Proteine beobachtet wurde, könnte den Misserfolg der Kokristallisation erklären. Das Chromatogramm und SDS-Gel zeigen eine schwache Bindung von CaM und mFI, wobei CaM nicht an mFI im Hauptpeak bindet (Abbildung 12.29). Die nur schwache Interaktion könnte die Kristallisation

behindern, wie das SDS-Gel in Abbildung 12.29 vermuten lässt. Geht man davon aus, dass die C-Termini im möglichen Oktamer in der Peakmitte zueinander zeigen, ist eine Bindung von CaM fraglich. Dies würde den Grund für eine Komplexbildung von mFI und CaM nur im hinteren Teil des Peaks mit niedriger mFI-Konzentration erklären, wo mFI als Tetramer vorliegen könnte. Für die Kristallisation sind allerdings hohe Proteinkonzentrationen nötig, die vermutlich zur Bildung der höheren Oligomere führen. Nach Ermittlung einer Möglichkeit zur Stabilisierung des mFI-Tetramers könnte dies zum Erfolg der Kokristallisation von mFI und CaM führen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Aufnahme eines Kryo-EM Datensatzes mit in Proteoliposomen rekonstituiertem mFI. Gebundenes CaM könnte bei Identifizierung der Partikel helfen und bietet im Vergleich zum verwendeten Nanobody den Vorteil, dass es mit einer geringeren Flexibilität näher an der Membranregion bindet.

## **7.7 Nanobodies für mFI-StreptII**

Da Calmodulin sich nicht als Kristallisationschaperon eignete, wurden Nanobodies gegen mFI als klassische Kristallisationschaperone verwendet. Durch ihre hochaffine Bindung sollen sie stabilisierend wirken und eine neue Oberfläche für Kristallkontakte schaffen (Koide, 2009). Die AGs Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM, UdS) und Flockerzi (Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UdS) übernahmen die Herstellung und Selektion der Nanobodies mit zur Verfügung gestelltem gereinigtem mFI.

### **7.7.1 Auswahl geeigneter Nanobodies**

Mit einem StreptII-Pulldown-Assay konnte für die Nanobodies NB14 und NB19 eine starke Bindung und für die Nanobodies NB3, NB30 und NBAa5 eine leichte Bindung nachgewiesen werden (Abbildung 6.48). Während mFI für die erstgenannten ein Epitop im C-Terminus aufweist, wurde im Peptid-Spot-Array (AG Rettig) für NB3 und NB30 das Epitop im Exon 3 bestimmt.

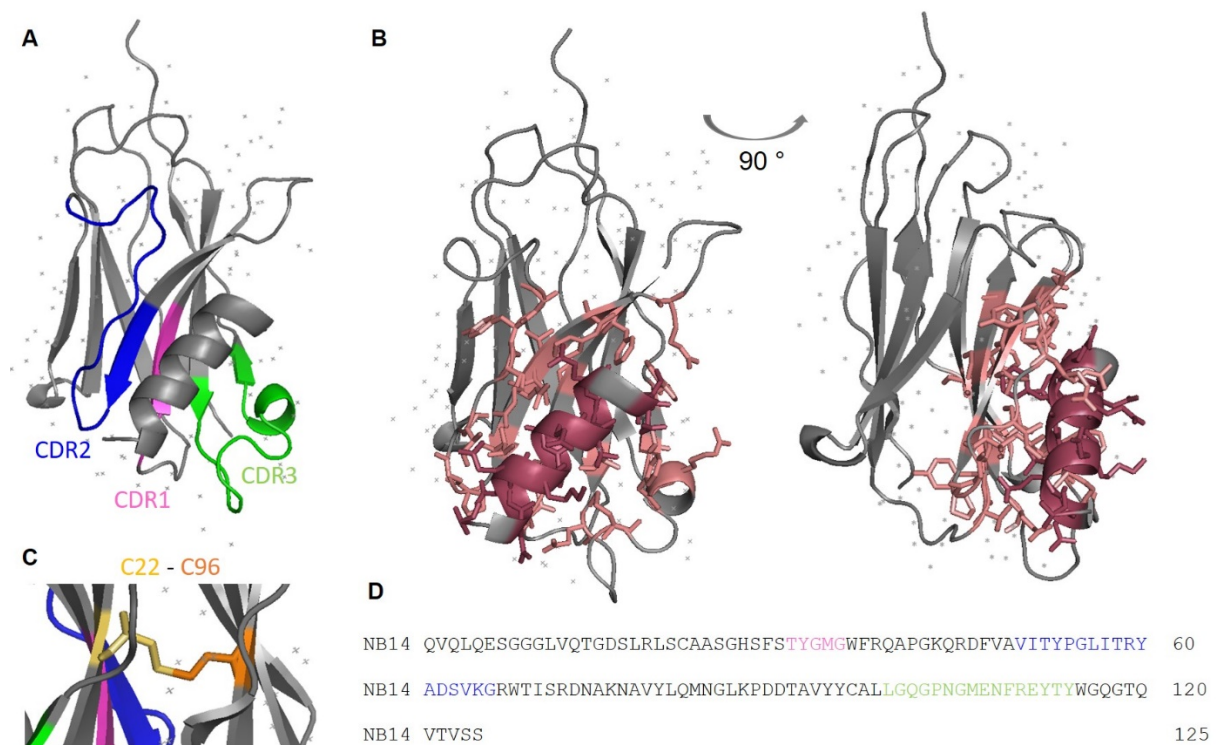
NB14 zeigte im Pulldown-Assay die stärkste Bindung, weshalb er ausführlich charakterisiert und auf die Eignung als Kristallisationschaperon für mFI überprüft wurde. Durch SEC in Kombination mit RI- und RALS-Messung wurde bestätigt, dass es sich um ein monodisperses Monomer von etwa 14 kDa handelt (Abbildung 12.32). Eine SEC des NB14-mFI-Komplexes bestätigte die Bildung eines Komplexes und deutet auf eine 1:1 Bindung hin (Abbildung 6.49).

### **7.7.2 Kokristallisation von NB14 mit mFI-Peptid P4**

Nach der Auswahl von NB14 als geeigneten Kandidaten für die Kokristallisation mit mFI sollte er zunächst mit einem das Epitop enthaltenden mFI-Peptid (hergestellt in der AG Jung, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, UdS) kristallisiert werden. Die Struktur dieses Komplexes sollte nicht nur Aufschluss über den Bindemechanismus des Nanobodies liefern, sondern auch als Suchmodell für die Phasierung mittels molekularen Ersatzes für einen parallel dazu kristallisierten Vollängen-Komplex aus mFI und NB14 dienen.

Nach Ansetzen von über 2500 Kristallisationsbedingungen konnten 193 Kristalle geerntet und vermessen werden. Von einigen eine Röntgenbeugung aufweisenden Kristallen konnten Datensätze aufgenommen werden, wobei der Datensatz mit der besten Auflösung und Statistik analysiert wurde.

Die Struktur des NB14-P4-Komplexes konnte anhand der gesammelten Diffraktionsdaten (Tabelle 6.9) durch molekularen Ersatz, basierend auf einer Strukturvorhersage von NB14 von SWISS-Model (Waterhouse et al., 2018) bis zu einer Auflösung von 1,43 Å gelöst werden. Abbildung 7.16A zeigt die Kristallstruktur in der Cartoon-Darstellung, wobei die die Spezifität vermittelnden CDRs (Bannas et al., 2017) nach dem Farbschema in der Sequenz in Abbildung 7.16D gefärbt sind. Der Nanobody wird durch eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 22 und 96 stabilisiert (Abbildung 7.16C). In Abbildung 7.16B sind die mittels PyMOL (Lilkova, 2015) identifizierten interagierenden Reste in der Liniendarstellung farblich hervorgehoben.

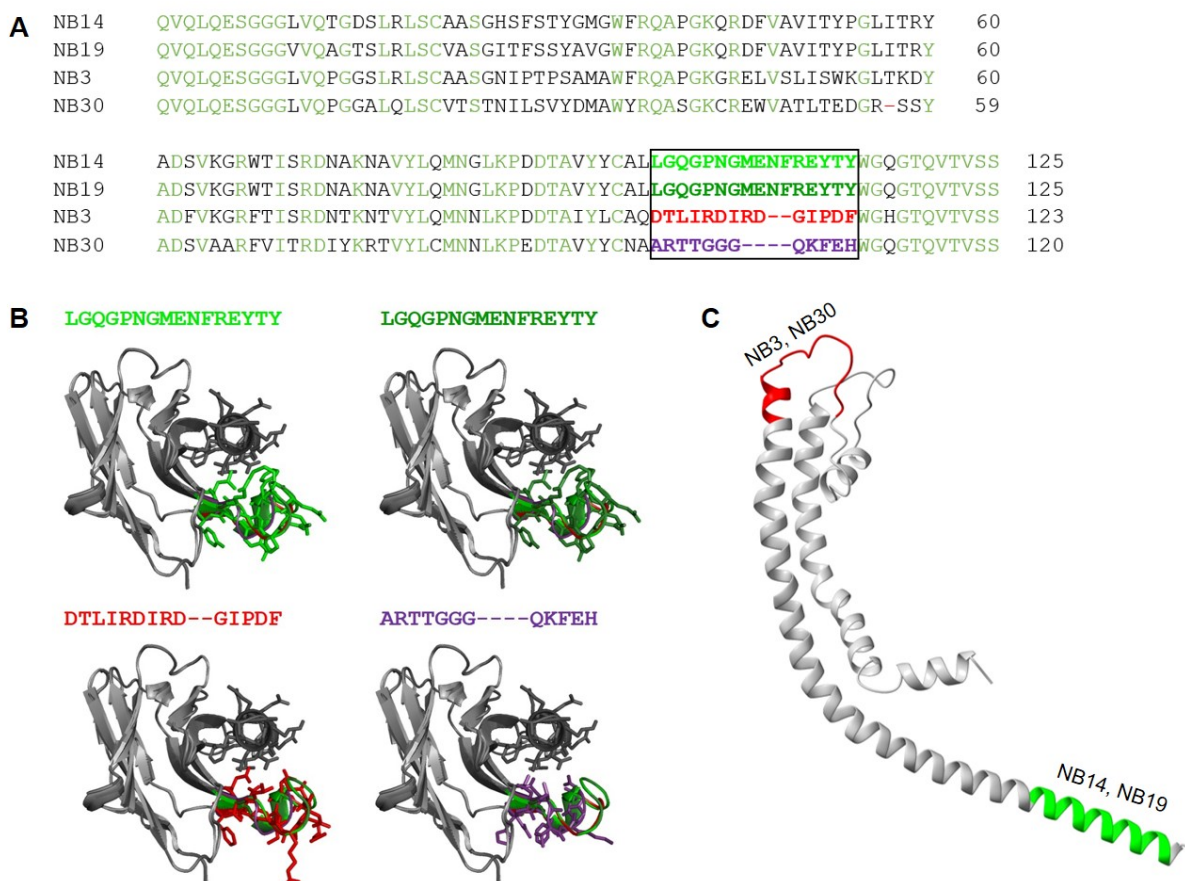


**Abbildung 7.16: Struktur des NB14-P4-Komplexes.** **A** Darstellung der CDRs, wobei CDR1 pink, CDR2 blau und CDR3 grün markiert ist. **B** Schnitstellen-Reste zwischen NB14 und P4 sind durch die Stäbchendarstellung hervorgehoben. **C** Eine Disulfidbrücke zwischen C22 und C96 stabilisiert NB14. Die Abbildungen wurden mit PyMOL erstellt (Lilkova et al., 2015). **D** Aminosäuresequenz von NB14 mit farblicher Markierung der CDRs.

Die Identifizierung der CDRs erfolgte Sequenz-basiert nach Kabat (Abhinandan & Martin, 2008, AG Rettig). Ein Sequenzvergleich der identifizierten bindenden Nanobodies NB3, NB30, NB14 und NB19 zeigt, dass die CDR3 in NB14 und NB19 länger ist (Abbildung 7.17A). Auf Grundlage der NB14-Struktur wurden mit SWISS-Model (Waterhouse et al., 2018) Strukturvorhersagen für NB3, NB30 und NB19 erstellt. Die CDR3 von NB14 und NB19 bettet die Peptid-Helix mit ihrer längeren Schleife ein, während die Schleifen der CDR3 in NB3 und NB30 nicht lang genug sind (Abbildung 7.17B). Dies erklärt den Grund für die schwächere Bindung von NB3 und NB30 im StrepII-Pulldown-Assay (Abbildung 6.48). Auch wenn diese

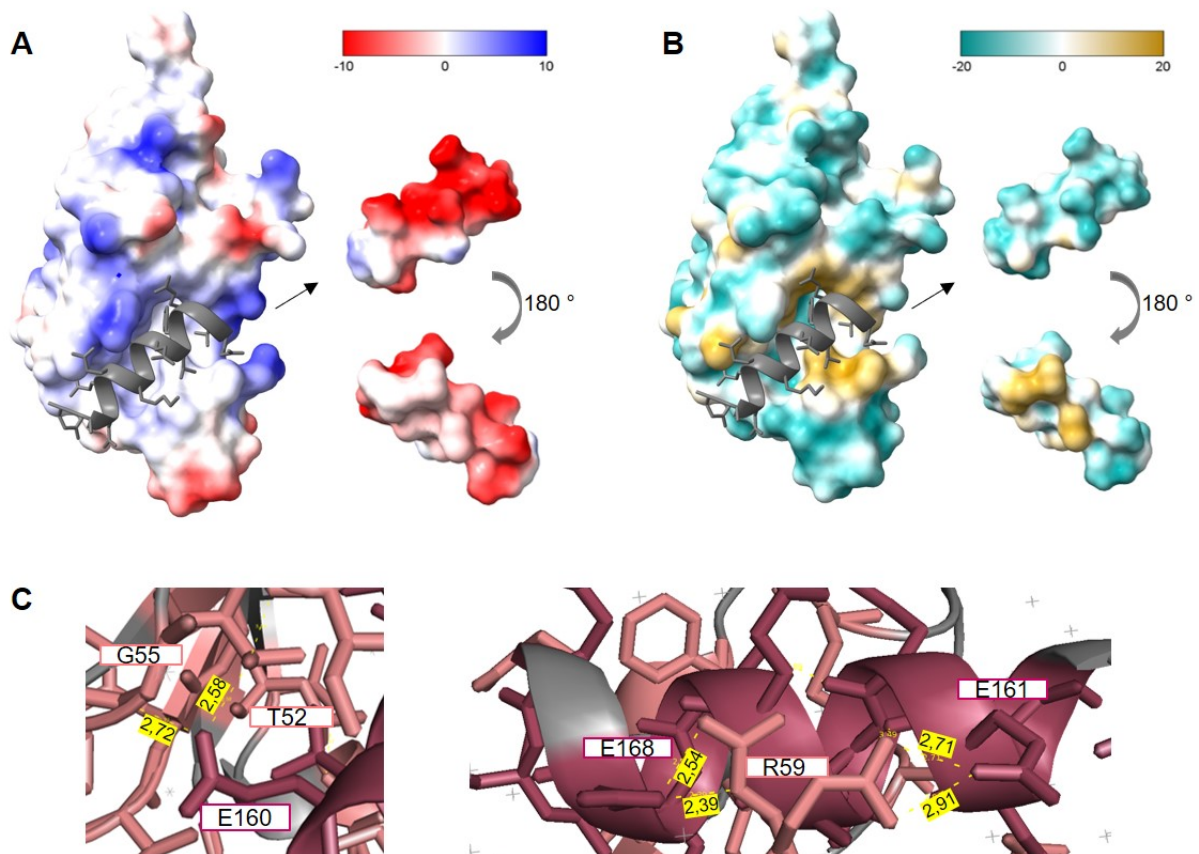


ein anderes Epitop erkennen (Tabelle 6.8, Abbildung 7.17C), sollte es sich dennoch um eine Helix handeln, die von den kürzeren Schleifen der CDR3s weniger gut eingeschlossen wird. Im Homologie-Modell handelt es sich um einen ungeordneten Bereich, der die schwächere Affinität erklären könnte. Möglicherweise ist das Epitop von NB3 und NB30 in Exon 3 auch schlecht zugänglich, da es aufgrund der Nähe zu den Transmembrandomänen durch Detergenz verdeckt sein könnte (Abbildung 7.17C).



**Abbildung 7.17: Sequenzanlagerung ausgewählter Nanobodies und Vergleich der CDR3. A** Sequenzvergleich ausgewählter Nanobodies mit Clustal Omega (Madeira et al., 2022). Identische Aminosäuren sind grün markiert. Die CDR3 ist schwarz umrandet. **B** Anlagerung des NB14-P4-Komplexes an vorhergesagte SWISS-Model-Modelle (Waterhouse et al., 2018) von NB19 (dunkelgrün), NB3 (rot) und NB30 (lila), wobei interagierende Reste jeweils durch die Stäbchendarstellung hervorgehoben sind. **C** Markierung der Epitope im Homologie-Modell von mFl.

Abbildung 7.18A zeigt die Interaktion des elektronegativeren C-Terminus von P4 mit der elektropositiveren Tasche von NB14. Der elektropositivere N-Terminus ragt zum elektroneutralen Bereich der Bindetasche. Die hydrophoben Aminosäuren von P4 interagieren mit hydrophoben Aminosäuren von NB14 in der Bindetasche (Abbildung 7.18B). Somit wird die Interaktion über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt. Zusätzlich bilden die Glutaminsäuren E160, E161 und E168 von mFl in Abbildung 7.18C gezeigte Wasserstoffbrücken aus. Bei R59 in NB14 liegt eine alternative Konformation vor, sodass die Interaktion mit E161 oder E168 in mFl stattfinden kann.



**Abbildung 7.18: Analyse der NB14-mFI-Peptid-Struktur.** **A** Analyse der Schnittstelle zwischen NB14 und mFI-Peptid in Hinblick auf das elektrostatische Potential. Das elektronegative Peptid interagiert mit der elektropositiven Tasche des Nanobodies (Ghose et al., 1998). **B** Analyse der Schnittstelle zwischen NB14 und mFI-Peptid. Hydrophobe Reste aus NB14 und mFI-Peptid sind zueinander gewandt. **C** Wasserstoffbrücken zwischen NB14 und mFI-Peptid, die mittels PyMOL (Lilkova, 2015) bestimmt wurden. Die Bindungslängen sind in Å angegeben.

### 7.7.3 Analyse des mFI-NB14-Komplexes

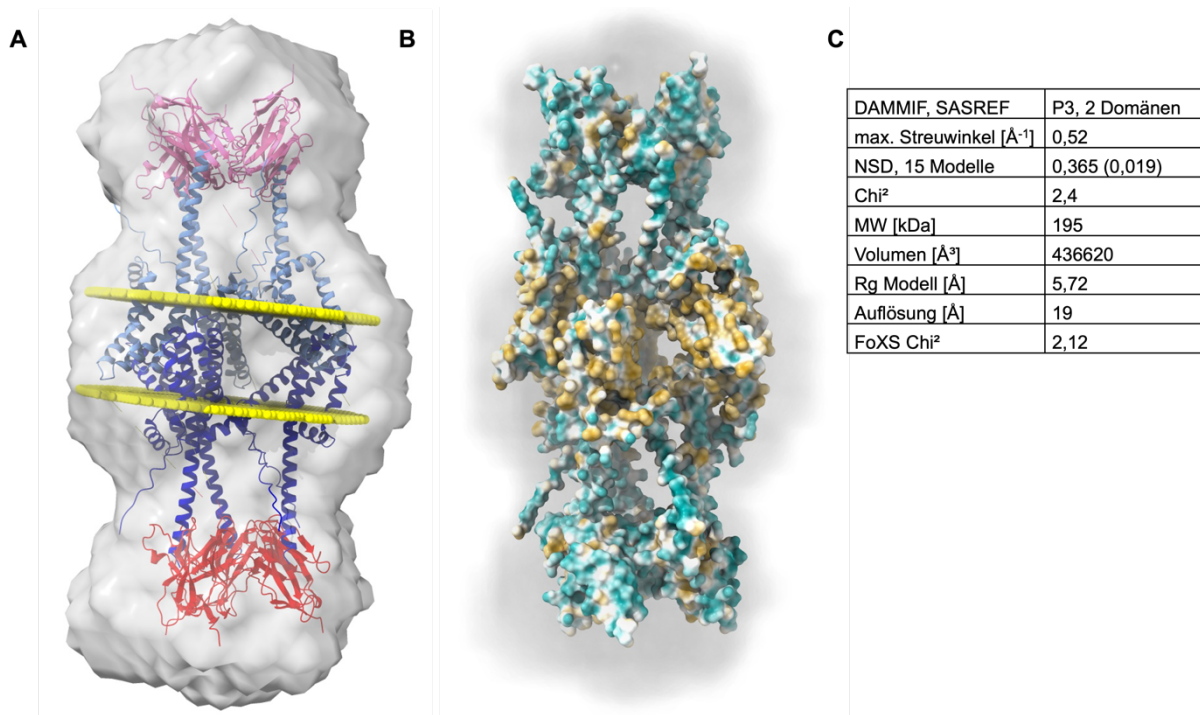
Nachdem die Komplexbildung von mFI und NB14 durch eine SEC gezeigt und die Bindestelle durch Kristallisation und Strukturaufklärung des NB14-mFI-Peptid-Komplexes untersucht wurde, erfolgte die weitere Charakterisierung des Komplexes durch eine HPLC-SAXS-Messung. Dazu wurde in PMAL-C8 rekonstituiertes mFI verwendet, wobei aufgrund vorheriger Experimente (Kapitel 6.2.5.2 und 6.2.7.1) in diesem Zustand von der Bildung eines nicht physiologischen Hexamers mit dreifacher Symmetrie auszugehen ist.

Es wurden HPLC-SAXS-Messungen mit mFI allein und im Komplex mit NB14 durchgeführt, wobei die UV- und Intensitätsprofile der Messung mit mFI allein zwei Peaks aufwiesen. Im Komplex mit NB14 vergrößerte sich der zweite Peak und der  $R_g$  stieg durch die Bindung des Nanobodies in diesem Bereich von 5 auf 6 nm. Trotz guter Datenqualität zeigt die  $P(r)$ -Funktion nicht den gewünschten Verlauf durch einen zu kurz gewählten  $D_{\max}$  (Jacques & Trehwella, 2010). Allerdings ließ sich die genaue Länge nicht bestimmen und die Berechnung von Oberflächenmodellen mit einem größeren  $D_{\max}$  war aufgrund zu hoher  $\chi^2$ -Werte nicht möglich. Aufgrund der hohen Zuverlässigkeit von 84 % wurde die  $P(r)$ -Funktion der geschnittenen Daten verwendet.

Das Oberflächenmodell in P32-Symmetrie (Abbildung 6.55) gibt eine gute Vorstellung über das Aussehen des Komplexes. Es deutet auf die Bindung der Nanobodies am oberen und unteren Ende des mFI-Oligomers und nicht in der Mitte hin. Die Berechnung zahlreicher Strukturmodelle mit SASREF und anschließendem Vergleich der experimentellen Streukurve mit einer theoretischen Streukurve des Modelles (Schneidman-Duhovny et al., 2013, 2016) bestätigten dies. Strukturmodelle mit dreifacher Symmetrie lieferten eine bessere Übereinstimmung mit den experimentellen Daten als eine vierfache Symmetrie (Tabelle 12.11). Dies spricht für eine dreifache Symmetrie von mFI in PMAL-C8 auch mit Bindung der Nanobodies. Es zeigt außerdem, dass das SAXS-Modell von mFI in P32-Symmetrie (Abbildung 6.16) die richtige Orientierung der Monomere aufweist und es sich bei der G812L-Variante eher um ein Tetramer als ein Trimer handelt (Abbildung 6.40).

Zur Berechnung von Strukturmodellen wurde die Kristallstruktur des NB14-P4-Komplexes und das AlphaFold-Modell von mFI verwendet. Zur Gewährleistung der richtigen Anordnung der Proteine wurden zwei Kontakte vorgegeben. Aufgrund der bekannten Bindestelle konnte entsprechend der Interaktion von P4 mit NB14 (Abbildung 7.18C) zwischen den Aminosäuren E160 von mFI und T52 von NB14 sowie E168 von mFI und F47 von NB14 eine Distanz von 2,5 Å vorgegeben werden.

Das SASREF-Modell lieferte ein  $\chi^2$  von 2,4. Der Vergleich der theoretischen Streukurve des Strukturmodells, die mit dem FoXS-Server (Schneidman-Duhovny et al., 2016, 2013) erstellt wurde, mit der experimentellen Streukurve lieferte ein  $\chi^2$  von 2,12 und passt damit nicht optimal zu den experimentellen Daten (Tabelle 12.11). Das Modell mit den zugehörigen Parametern ist dennoch in Abbildung 7.19 gezeigt. Jedes mFI-Trimer hat drei NB14 am C-Terminus gebunden. MFI weist eine ähnliche Konformation auf wie ohne Bindung von Nanobodies.



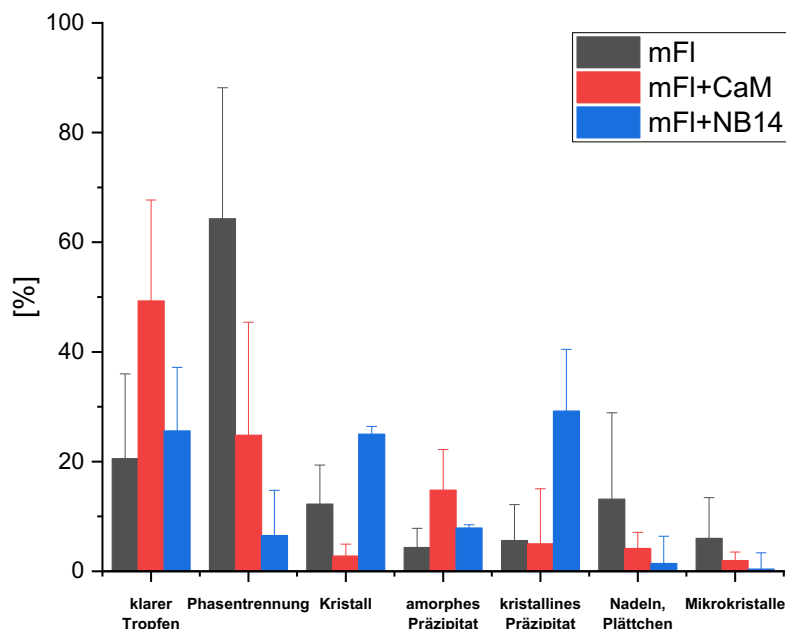
**Abbildung 7.19: Oberflächen- und Strukturmodell des mFI-NB14-Komplexes in P32-Symmetrie.** **A** Ein SASREF-Modell wurde in die Dichtekarte des Oberflächenmodells aus DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) mit einer Auflösung von 15 Å gelegt. Darstellung der möglichen Position einer Membran in gelb, berechnet mit PPM 2.0 (Lomize et al., 2012). Die Dicke der Membran beträgt 33 Å. **B** Hydrophobizität der Aminosäuren. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb gefärbt, hydrophile grün (Ghose et al., 1998). Die Abbildungen wurden mit ChimeraX erstellt (Goddard et al., 2018). **C** Parameter des Strukturmodells. Als Modelle wurden das AlphaFold-Modell und die NB14-P4-Kristallstruktur verwendet.

Die Rekonstitution in PMAL-C8 ist nicht erfolgreich (Kapitel 6.2.3). Eine Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades von der Detergenzkonzentration wurde bereits vermutet und auch die hier durchgeführte Messung zeigt die Bildung eines Hexamers in P32-Symmetrie von mFI ohne oder mit wenig Detergenz oder PMAL-C8 gebunden.

Die Bindung der Nanobodies am Ein- und Ausgang der möglichen Kanalpore von mFI könnte die Kanalaktivität inhibieren, weshalb eine Überprüfung mittels SSM-Elektrophysiologie interessant wäre. Nanobodies zeichnen sich durch eine geringe Toxizität und Immunogenität aus, sind leicht zu produzieren, sehr spezifisch und stabil, was einen Einsatz als Therapeutikum möglich macht (Steeland et al, 2016) und bereits bei der Krebstherapie in klinischen Studien getestet wird (Yang & Shah, 2020). In humanen Krebszellen wurde eine Inhibierung des Tumorwachstums und die Verbesserung der Effizienz einer Chemotherapie durch einen hFWE-*Knockdown* gezeigt (Madan et al., 2019). Ein inhibierender Nanobody könnte den Effekt eines *Knockdowns* imitieren, wobei hierzu ein detailliertes Verständnis über den Wirkungsmechanismus von Flower-Proteinen zum Ausschluss von Nebeneffekten fehlt. Wenn bestimmte hFWE-Isoformen in Krebszellen hochreguliert sind, wäre auch ein Einsatz von markierten mFI-Nanobodies zur Identifizierung und Abgrenzung von Tumorgewebe möglich.

### 7.7.4 Kokristallisation von mFI und NB14

Obwohl die Kokristallisation von mFI und NB14 keine streuenden Kristalle lieferte, waren die erzielten Ergebnisse vielversprechender, wie der Vergleich mit der Kristallisation von mFI allein oder der Kokristallisation mit CaM zeigt (Abbildung 7.20). Bei Kokristallisation mit NB14 lagen in rund 20 % der Bedingungen Kristalle und in rund 30 % der Bedingungen kristallines Präzipitat vor, das als Grundlage zur Optimierung der Kristallisationsbedingung dienen kann. Möglicherweise ist ein umfangreicheres Screening nach der geeigneten Bedingung nötig, wobei bereits über 2000 Bedingungen getestet wurden. Dass sich der Nanobody allein sehr gut kristallisieren lässt, wurde bereits gezeigt. Das Vorhandensein unterschiedlicher mFI-Oligomere oder die Bindung unterschiedlicher Mengen an Nanobody verhindern vermutlich weiterhin die Kristallisation.



**Abbildung 7.20: Vergleich ausgewählter Kristallisationsergebnisse von mFI, mFI mit CaM und mFI mit NB14.** Es wurden jeweils 960 Bedingungen aus zufällig ausgewählten 96-well Kristallisationsscreens ausgewertet und den Ereignissen klarer Tropfen, Phasentrennung, Kristall, amorphes Präzipitat, kristallines Präzipitat, Nadeln, Plättchen und Mikrokristalle zugeordnet.

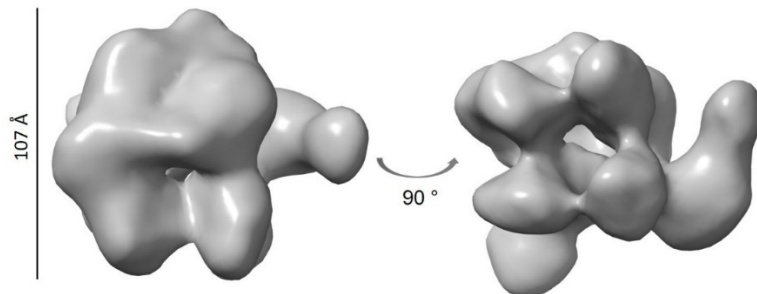
### 7.7.5 Kryo-EM-Modell von mFI im Komplex mit NB14 nach Rekonstitution in Nanodiscs

Von mFI im Komplex mit NB14 nach Rekonstitution in NDs bestehend aus Soy Lipid oder *E. coli* Lipid wurde jeweils ein Datensatz aufgenommen, wobei von NDs aus *E. coli* Lipid 1100 und aus Soy Lipid 8800 Movies aufgenommen wurden.

Die Rekonstitution in die NDs war nicht vollständig erfolgreich, was sich insbesondere bei Nanodiscs aus *E. coli* Lipid durch die hohe Anzahl leerer NDs zeigte. Problematisch ist, dass der Nanobody so weit hinten am C-Terminus bindet, dass sich dessen Flexibilität erhöht und der Nanobody deshalb vermutlich nicht in allen Klassen sichtbar ist. Um einen Nanobody zu erhalten, der näher am Membranteil des Proteins bindet, könnte ein Peptid mit der gewünschten Bindestelle einem Lama zur Produktion spezifischer Nanobodies gegen das Peptid injiziert werden.



Die Größe der NDs wurde unter der Annahme berechnet, dass mFI ein Hexamer ist, weshalb die NDs möglicherweise zu groß und das Protein zu beweglich ist, wenn es sich um ein Tetramer handelt. Bei Klassen von nicht rekonstituiertem Protein in *E. coli* ND sind Tetramere sichtbar (Abbildung 6.58), aus denen ein initiales Modell berechnet wurde (Abbildung 7.21). Auch ohne Vorgabe einer Symmetrie, ist eine Vierfach-Symmetrie erkennbar.



**Abbildung 7.21: Initiales Modell aus der 3D-Klassifizierung von mFI in ND aus *E. coli* PC.** Das Modell wurde aus 15612 Partikeln ohne Anwendung einer Symmetrie erstellt (C1) und besitzt eine Auflösung von 9,4 Å. Es ist deutlich eine Vierfach-Symmetrie erkennbar.

## 7.8 Funktionelle Charakterisierung von mFI-StreptII

### 7.8.1 Nachweis von Calcium-Strömen

Während Calciumströme bei dFwe bereits nachgewiesen wurden (Yao et al., 2009), liegen für mFI bisher keine Ergebnisse vor. Standardmäßig werden die *Patch-* und *Voltage Clamp* Technik zur Charakterisierung von Ionenkanälen verwendet. Möglicherweise sind die Ströme einzelner Kanäle zu langsam oder schwach für eine Detektion. Der Vorteil der SSM-Elektrophysiologie liegt in der gleichzeitigen Aktivierung aller immobilisierten Transporter oder Kanäle auf dem Sensor, sodass ein zu einer messbaren Amplitude führender Summenstrom erzeugt wird (Pintschovius et al., 1999).

Nachdem die Bildung eines Tetramers gezeigt wurde, was für die postulierte Funktion als Calcium-Kanal spricht, sollten mittels SSM-Elektrophysiologie Calcium-Ströme untersucht werden, wozu mFI in Liposomen rekonstituiert wurde. Auch wenn die Methode vor allem bei der Untersuchung aktiver Transportsysteme wie Transportern und Ionenpumpen Anwendung findet (Schulz et al., 2008), können Kanäle durch Anlegen eines Ionengradienten ebenfalls charakterisiert werden (Schulz et al., 2009)

Im Western-Blot wurde die erfolgreiche Rekonstitution von mFI in Proteoliposomen nachgewiesen (Abbildung 6.26).

Testmessungen ergaben die Verwendung geringer Proteinkonzentrationen bzw. hoher LPRs, um nicht das Auflösungslimit des Sensors zu überschreiten, was auch das Verwenden der 1 mm Sensoren mit einer höheren zeitlichen Auflösung erforderlich machte (Abbildung 6.27, Abbildung 6.28).

Wenn es sich bei mFI um einen Kanal handelt, sollte keine Calcium-Sättigung erreicht werden können. Dies konnte nicht eindeutig gezeigt werden, was jedoch auf das Erreichen der Auflösungsgrenze des Sensors bei höheren Calcium-Konzentrationen zurückzuführen ist.

Der Einsatz verschiedener Proteinkonzentrationen sollte Aufschluss über die Notwendigkeit einer bestimmten mFI-Konzentration zur Bildung eines funktionellen Kanals geben. Da mFI abhängig von der Protein- und Detergenzkonzentration in verschiedenen Oligomerezuständen vorliegt, war die Hypothese, dass die Ausbildung eines funktionsfähigen Kanals erst ab einer bestimmten Proteinkonzentration stattfindet. Dies würde sich mit den Beobachtungen für das nur bei hoher synaptischer Aktivität die Bulk-Endozytose auslösende dFwe decken, wenn im Rahmen der Exozytose eine große Menge an dFwe in die Plasmamembran integriert wurde (Yao et al., 2017).

Als Kontrollen für die Messungen dienten nicht-rekonstituiertes Protein und leere Liposomen. Für das reine Protein konnten keine Ströme nachgewiesen werden, während Messungen an Liposomen zu Strömen führten. Die aus Soy Lipid bestehenden Liposomen sind Calcium-durchlässig (Rufini et al., 1992), sodass sich die Peaks in Höhe und Form dennoch von denen der Proteoliposomen unterscheiden. Dies ist auf ein Durchsickern von Calcium-Ionen zurückzuführen, was die um 50 ms höhere langsame Abklingzeit im Vergleich zu Proteoliposomen bestätigt (Abbildung 6.29D).

Durch mFI induzierte Calcium-Ströme konnten eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 6.28). Eine steigende Calcium-Konzentration führt zu stärkeren Strömen, wobei der Anstieg ab einer Konzentration von 1200  $\mu\text{M}$  langsamer ausfällt (Abbildung 6.28A), was auf das Überschreiten der Auflösungsgrenze des Sensors zurückzuführen ist. Die Ströme bei 100 und 300  $\mu\text{M}$  Calcium sind im Vergleich sehr niedrig. Die extrazelluläre Calcium-Konzentration liegt bei etwa 1000-1300  $\mu\text{M}$  (Doherty et al., 2015; Inglebert et al., 2020), die intrazelluläre dagegen nur bei etwa 1  $\mu\text{M}$  (Bagur & Hajnóczky, 2017). Die genaue Calcium-Konzentration an Synapsen ist unbekannt, wobei die Bildung von Calcium-Mikrodomänen mit höheren Calcium-Konzentrationen von 2 bis 4 mM vermutet wird (Forsberg et al., 2019). Dies könnte für eine Aktivierung von mFI ab einer bestimmten Calcium-Konzentration sprechen, wenn sich in Folge des Calcium-Einstroms durch VGCCs im Rahmen der Exozytose die Calcium-Konzentration in der Präsynapse erhöht (Südhof & Rizo, 2011).

Höhere Proteinkonzentrationen führen zu einer Rechtsverschiebung des Peaks (Abbildung 6.28C, D), was ein späteres Einsetzen des Stroms zeigt. Da in dem Fall einer höheren Anzahl von Kanälen die gleiche Menge Calcium zur Verfügung gestellt wird, verzögert sich die Aktivierung, was die Notwendigkeit einer bestimmten Calcium-Konzentration zur optimalen Aktivität bestätigt. Für alle getesteten LPRs wurde eine halbmaximale Stromstärke bei etwa 850  $\mu\text{M}$  Calcium bestimmt (Abbildung 12.15). Bei einer reinen Bindung müsste dieser Wert mit steigender Proteinkonzentration zunehmen.

Da vermutet wurde, dass mFI Calcium sowohl leitet als auch bindet, sollten durch einen biexponentiellen Fit die Abklingzeiten für den transienten Strom der Bindung und den stationären Ionenstrom getrennt durch Berechnung der biexponentiellen Abklingzeit analysiert

werden. Das Auftragen der schnellen Abklingzeiten gegen die Calcium-Konzentration bei verschiedenen LPRs zeigt, dass diese bei LPRs unter 2000 sehr nah an der Auflösungsgrenze des Sensors von 6 ms liegen (Abbildung 6.29A) und sich nur bei LPR2000 analysieren lassen (Abbildung 6.29C). Hier zeigt sich eine konstant bleibende schnelle Abklingzeit bei steigender Calcium-Konzentration. Die langsamen Abklingzeiten schwanken bei den verschiedenen LPRs und Calcium-Konzentrationen (Abbildung 6.29B), sodass keine klare Tendenz festgestellt werden kann. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei hoher Protein- oder Calciumkonzentration aufgrund der schnelleren Reaktionsgeschwindigkeit ein Teil des langsamen Stroms im Peak des schnellen Stroms verschwindet und nicht mehr detektiert werden kann. Bei ausschließlicher Betrachtung der langsamen Abklingzeit bei 1200  $\mu\text{M}$  Calcium zeigt sich eine langsamer werdende Reaktion mit abnehmender Proteinkonzentration (Abbildung 6.29D). Der sigmoidale Kurvenverlauf erlaubte einen logistischen Fit, wodurch eine halbmaximale Abklingzeit bei einer Proteinkonzentration von 0,019 ng/ $\mu\text{L}$  bestimmt werden konnte.

Unter der Annahme, dass sich mFI-Kanäle „fertig zusammengesetzt“ in den Liposomen befinden, würde man einen mit steigender Proteinkonzentration zunehmenden linearen Verlauf der Abklingzeit erwarten. Der sigmoidale Kurvenverlauf als Resultat dieses Experiments spricht für die anfangs gestellte Hypothese der Notwendigkeit einer bestimmten Proteinkonzentration zur Zusammenlagerung funktioneller Kanäle. Allerdings konnte dies eindeutig in Zusammenhang mit dem Überschreiten der Auflösungsgrenze des Sensors gebracht werden, sodass mFI in den Proteoliposomen als Tetramer vorliegen muss, auch wenn aus den HPLC-SAXS-Messungen Modelle mit dihedraler Symmetrie erstellt wurden (Kapitel 6.2.5). Für eine Funktion als Kanal wäre dies ausreichend, da jedes Monomer eine Helix für die Bildung einer Pore zur Verfügung stellen könnte.

Da mit Hilfe der SSM-Elektrophysiologie ermittelte Abklingzeiten von Ionenkanälen bislang nicht veröffentlicht wurden, liegen keine geeigneten Vergleichswerte vor. Für den Zucker/ $\text{H}^+$ -Symporter Xyle wurden beispielsweise schnelle Abklingzeiten im Bereich von 30 ms und langsame Abklingzeiten im Bereich von 100-200 ms bestimmt (Bazzone et al., 2022).

Der Oligomierzustand von mFI in den Proteoliposomen ist unbekannt. Im Western-Blot zur Analyse der Proteoliposomen wurden Banden bei etwa 20, 40, 60 und 80 kDa detektiert. An dieser Stelle wäre die Durchführung eines Western-Blots nach Auftrennung in einem nativen Gel von Vorteil gewesen. Da nicht rekonstituiertes mFI im Western-Blot das gleiche Bandenmuster und die gleiche Bandenintensität zeigt wie rekonstituiertes mFI, ist auch bei rekonstituiertem mFI vom Vorliegen in verschiedenen Oligomierzuständen auszugehen, sodass ein unbekannter Anteil der Proteine wahrscheinlich nicht aktiv ist.



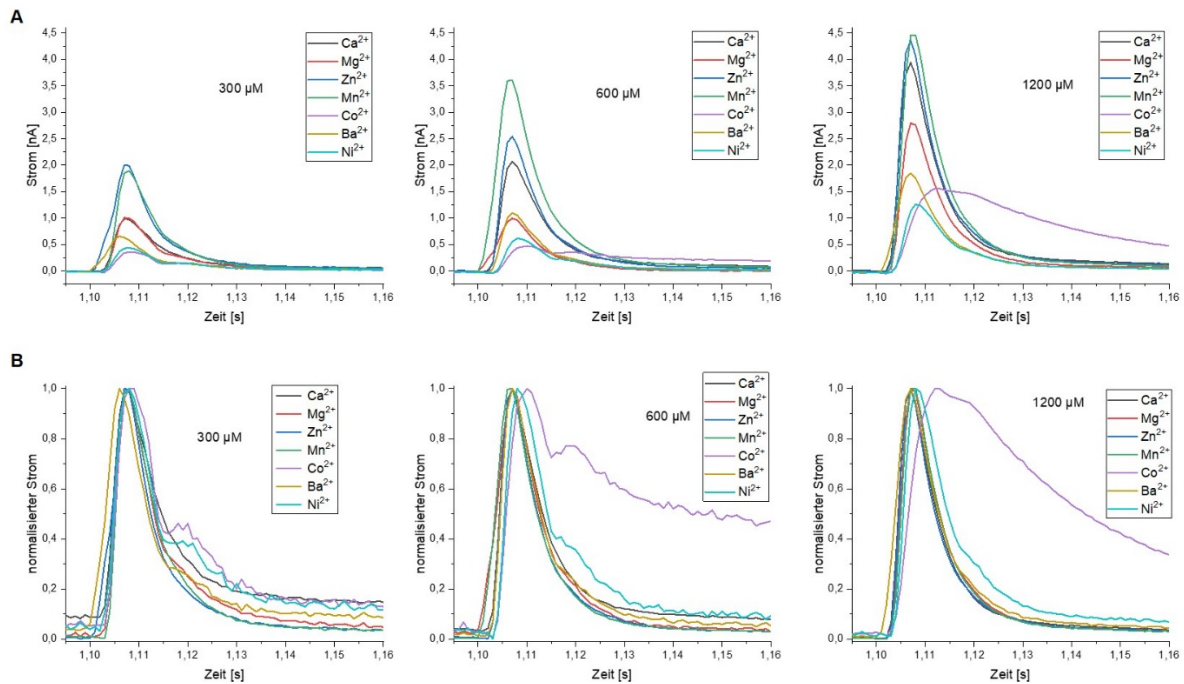
### 7.8.2 Untersuchung der Calcium-Spezifität von mFI

Nach dem Nachweis der Calcium-Ströme sollte die Calcium-Spezifität von mFI untersucht werden. Getestet wurden die zweiwertigen Ionen Mangan, Zink, Nickel und Cobalt, die alle wie Calcium zur vierten Periode des Periodensystems der Elemente gehören, zusätzlich noch die sich in der gleichen Gruppe des Periodensystems wie Calcium befindenden Ionen Magnesium und Barium.

Zuerst wurden die Messungen ohne eine Inkubationszeit zwischen dem Wechsel der Ionen durchgeführt. Dabei wiesen alle Ströme einen bei Magnesium, Nickel, Cobalt und Barium prägnanteren zweiten Peak auf. Mit steigender Ionenkonzentration verlaufen die beiden Peaks zunehmend ineinander, wie in Abbildung 12.17 erkennbar ist. Unter der Annahme, dass der erste Peak durch eine Bindung und der zweite Peak durch einen Ionenstrom ausgelöst wird, ist zunächst davon auszugehen, dass bei allen getesteten Ionen zuerst eine Bindung und dann ein Ionenstrom erfolgt.

Trotz des Einsatzes von Proteoliposomen mit einem LPR von 2000 wurde vermutlich im Vergleich zu den vorher diskutierten Experimenten (Kapitel 7.8.1) eine geringere Menge von dem regenerierten Sensor adsorbiert, was in den niedrigeren Strömen und zwei aufgelösten Peaks resultierte. Die geringere Anzahl an Proteoliposomen verlangsamt die Reaktion und erlaubt die nun bessere Auftrennung der beiden Peaks. Da eine Beeinflussung der Zahl adsorbierter Proteoliposomen nicht möglich ist und zudem unbekannt ist, wie hoch der Anteil an funktionellem Protein in den Proteoliposomen ist, gestaltet sich eine Wiederholung der Experimente unter gleichen Bedingungen schwierig. Die Messungen wurden dennoch auf neuen Sensoren wiederholt, wobei vor jeder Dreifach-Messung eine zusätzliche einminütige Inkubation mit einem neuen Puffer erfolgte. Es sind deutliche Unterschiede in den Peakverläufen und der Höhe der Peaks erkennbar (Abbildung 7.22). Bei Cobalt, Nickel und Barium liegen in den niedrigen Konzentrationen zwei Peaks vor, die für das Stattfinden von zwei Ereignissen sprechen. Die Cobalt-Ströme in der hohen Konzentration nehmen einen unerwarteten Verlauf an. Möglicherweise kommt es zu einer stärkeren Bindung von Cobalt, was in einem sehr breiten Peak resultiert. Die höchsten Ströme wurden durch Zink, gefolgt von Mangan und Calcium erreicht. Erst bei 1200  $\mu\text{M}$  erreichen die Calcium-Ströme das Niveau der Zink- und Mangan-Ströme, während sie bei der niedrigen Konzentration deutlich geringer ausfallen. Dies zeigt wieder die Aktivierung des Kanals ab einer bestimmten Calcium-Konzentration an. Das Normalisieren der Peakpotentiale (Abbildung 6.28B) zeigt, dass nur bei Calcium diese starke Konzentrationsabhängigkeit vorliegt und dass bei Calcium demnach eindeutig ein Ionenstrom erfolgt.

## Diskussion



**Abbildung 7.22:** Durch 300, 600 und 900  $\mu\text{M}$  induzierte Ionenströme an der SSM auf einem 1 mm Sensor. **A** Darstellung der Ionenströme in vergrößerter Ansicht. **B** Normalisierte Ionenströme in vergrößerter Ansicht.

Da die Peaks nicht nur durch Ströme, sondern auch durch Konformationsänderungen hervorgerufen werden können und es keine vergleichbaren Daten zu Ionenströmen in mFI gibt, ist eine sorgfältige Analyse der Daten zur richtigen Interpretation nötig.

Bei Verdopplung der Ionenkonzentration wäre eine Verdopplung des Signals zu erwarten, solange man sich im Auflösungsbereich des Sensors befindet. Deshalb wurde untersucht, ob sich die Ströme und die translozierte Ladung erwartungsgemäß verhalten.

Eine Verdopplung der Stromstärke bei Verdopplung der Ionenkonzentration von 300 auf 600  $\mu\text{M}$  wurde nur durch Calcium und Mangan erreicht. Die Erhöhung der Ionenkonzentration von 600 auf 1200  $\mu\text{M}$  bei Calcium, Magnesium, Cobalt und Nickel führte zu einer Verdopplung der Stromstärke. Eine Vervierfachung der Stromstärke bei Vervierfachung der Ionenkonzentration wurde nur durch Calcium und Cobalt erreicht (Abbildung 12.18A, Tabelle 7.2). In Bezug auf die Ladung wurden die Verdopplung bzw. Vervierfachung des Ladungstransfers nur durch Cobalt erreicht (Abbildung 12.18B), von 300 auf 600  $\mu\text{M}$  auch bei Mangan und von 600 auf 1200  $\mu\text{M}$  bei Magnesium.

Bei Mangan, Nickel und Cobalt handelt es sich um die einzigen der getesteten Ionen, deren 3d-Orbital nicht voll besetzt ist (Tabelle 7.2). Dies macht sie reaktiver, weshalb hier möglicherweise die Ionen effektiver gebunden oder geleitet werden.

Geht man von einem Kanal aus, sollte die gleiche Ionenmenge hineinströmen, die auch wieder beim Wechsel zum nicht-aktivierenden Puffer herausströmt, weshalb zur weiteren Analyse die Differenz der Stromstärke und des Integrals zwischen 1-2 s und 2-3 s berechnet wurde (Abbildung 12.18C, D).

Die ausschließliche Betrachtung der Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  lässt vermuten, dass Calcium, Magnesium, Cobalt, Barium und Nickel nur binden und die Ionen nach Wechsel zum nicht-aktivierendem Puffer wieder vollständig entfernt werden. Bei größer ausfallender Differenz, wie es in der hohen Konzentration von 1200  $\mu\text{M}$  vor allem bei Calcium, Mangan, Zink und Magnesium der Fall ist, könnte man von einem Ionenstrom ausgehen, sodass beim Wechsel zum nicht-aktivierenden Puffer der Ausstrom langsamer stattfindet und daher in der Zeitspanne nicht alle Ionen vollständig entfernt werden (Abbildung 12.18C). Bei großer Differenz beim Ladungstransfer könnte dies dementsprechend für eine Bindung sprechen, was der Fall bei Calcium, Cobalt und Nickel, bei höheren Konzentrationen auch bei Zink und Magnesium ist (Abbildung 12.18D).

Zur weiteren Analyse wurde die biexponentielle Abklingzeit untersucht. Für alle Ionen lag die schnelle Abklingzeit unterhalb der Auflösungsgrenze des Sensors von 6 ms und lässt sich daher nicht interpretieren (Abbildung 6.30C, Abbildung 12.19A). Die langsamen Abklingzeiten bei den verschiedenen Ionenkonzentrationen weisen große Unterschiede auf. Bei 1200  $\mu\text{M}$  zeigen alle getesteten Ionen ähnliche Abklingzeiten, was für ein Überschreiten der Auflösungsgrenze des Sensors spricht (Abbildung 12.19B), weshalb die Abklingzeiten bei 300  $\mu\text{M}$  betrachtet wurden (Abbildung 6.30C). Anhand dieser ergibt sich die Sequenz Calcium < Zink < Magnesium < Mangan < Barium < Nickel < Cobalt mit einer viermal höheren Abklingzeit von Cobalt als von Calcium. Bei gleichzeitiger Betrachtung der Stromstärke zeigt sich, dass vor allem bei Calcium und Zink eine niedrige Abklingzeit mit einer höheren Stromstärke einhergeht. Bei Cobalt und Nickel liegt eine langsame Abklingzeit bei niedriger Stromstärke vor. Dies spricht für einen Ionenstrom bei Calcium und Zink und lediglich eine Bindung von Cobalt und Nickel.

Insgesamt ist eine eindeutige Aussage über das Vorliegen einer Bindung oder eines Ionenstroms schwierig. Eindeutig ist jedoch, dass die verschiedenen Ionen einen unterschiedlichen Effekt auf mFI haben.

Zusammenfassend lassen sich die Ionen also in zwei Gruppen aufteilen. Calcium, Zink, Mangan und Magnesium führen zu einem stärkeren und schnelleren Strom, während Barium, Cobalt und Nickel einen langsameren und schwächeren Strom verursachen.

Für mFI ergeben sich auf Basis der Stromstärke (Abbildung 6.30B), des Ladungstransfers (Abbildung 12.18) und der Abklingzeit (Abbildung 6.30C) die in Tabelle 7.1 dargestellten Permeationsprofile. Daraus resultiert insgesamt die Sequenz Mangan > Calcium > Zink > Magnesium > Barium > Nickel > Cobalt.

**Tabelle 7.1: Permeationsprofile von mFI unter Berücksichtigung der Stromstärke, der Ladung und der Abklingzeit.**

<b>Strom</b>	
300 $\mu\text{M}$	$\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$
600 $\mu\text{M}$	$\text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$
1200 $\mu\text{M}$	$\text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$
<b>Ladung</b>	
300 $\mu\text{M}$	$\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$
600 $\mu\text{M}$	$\text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$
1200 $\mu\text{M}$	$\text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$
<b>Abklingzeit</b>	
300 $\mu\text{M}$	$\text{Ca}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Co}^{2+}$
600 $\mu\text{M}$	$\text{Ni}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Co}^{2+}$
1200 $\mu\text{M}$	$\text{Ca}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Ni}^{2+}$

Von der SSM werden nicht nur Ströme, sondern auch Konformationsänderungen in Folge einer Bindung detektiert. Um ein besseres Verständnis darüber zu erhalten, welche der Ionen binden, wurden die Messungen untersucht, bei denen keine vorherige Inkubation mit den jeweiligen Ionen stattfand und jeweils die drei Einzelmessungen betrachtet. Die Ionen wurden hierbei in der folgenden Reihenfolge getestet: Magnesium  $\rightarrow$  Mangan  $\rightarrow$  Nickel  $\rightarrow$  Cobalt  $\rightarrow$  Zink  $\rightarrow$  Barium  $\rightarrow$  Calcium. Nach Anwendung von Calcium sinken die durch Magnesium gemessenen Ströme von Messung 1 bis 3, während die durch Calcium gemessenen Ströme leicht zunehmen. Daraus könnte man schließen, dass der mFI-Kanal durch die Bindung von Calcium geöffnet wird und anschließend leitet. Dies ermöglicht einen schwachen, bei der Verdrängung von Calcium abnehmenden Magnesium-Strom, was in späteren Messungen bestätigt wurde. Ob Magnesium trotz seines kleinen Atomradius bindet, kann nicht festgestellt werden, denn beim Wechsel von Magnesium zu Mangan bleiben die gemessenen Ströme der Messungen 1 bis 3 auf dem gleichen niedrigen Niveau. Mangan scheint den Kanal ohne eine vorherige Öffnung des Kanals zu passieren, was sich durch konstante Ströme in allen Messungen äußert. Beim Wechsel von Mangan zu Nickel bleiben die gemessenen Ströme der Messungen 1 bis 3 auf gleichem Niveau, wobei sie nach einem Wechsel von Nickel zu Cobalt von Messung 1 bis 3 zunehmen. Dies spricht für eine den Kanal blockierende Bindung von Nickel und einen zunehmenden Cobalt-Strom, sobald Nickel verdrängt ist. Beim Wechsel von Cobalt zu Zink sinken die durch Zink induzierten Ströme bei der niedrigen Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  von Messung 1 bis 3 stark ab, während sie bei 600  $\mu\text{M}$  Zink nur leicht sinken und ab 1200  $\mu\text{M}$  Zink von Messung 1 bis 3 sogar leicht zunehmen. Bei niedrigeren Zink-Konzentrationen könnte eine vorherige Öffnung des Kanals durch Cobalt zum Aufbau eines Stroms notwendig sein, weshalb die gemessenen Ströme von Messung 1 bis 3 bei 300  $\mu\text{M}$  Zink abnehmen, solange Cobalt aus der vorangegangenen Messung noch gebunden ist und langsam verdrängt wird. Dies spricht für eine schwächere Affinität von Zink, sodass erst höhere Zink-Konzentrationen für das Öffnen und Beibehalten eines Stroms ausreichend sind, was sich durch gleichbleibend hohe Ströme bei 1200  $\mu\text{M}$  Zink äußert. Beim Wechsel von Zink zu Barium bleiben die durch Barium gemessenen Ströme auf gleichem Niveau. Bei Verwendung

von 300  $\mu\text{M}$  konnten die Calcium-Ströme nach Anwendung von Barium nicht wiederhergestellt werden. Erst ab 600  $\mu\text{M}$  steigen die Calcium-Ströme von Messung 1 bis 3 leicht an und befinden sich auf dem für Calcium aus vorherigen Messungen erwarteten Niveau. Der nur leichte Anstieg der Calcium-Ströme spricht für eine schwache Bindung von Barium, aber für keine Blockade des Kanals. Barium kann aufgrund seiner niedrigen, unter der von Calcium liegenden Hydrationsenthalpie den Kanal leicht passieren, könnte aber wegen des größeren Atomradius den Kanal für andere Ionen blockieren. Zur Bestätigung der Erklärung zu den Ergebnissen sollte der Effekt der Ionen bei weiteren Messungen in weiteren Reihenfolgen getestet werden. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

**Tabelle 7.2: Zusammenfassung der SSM-Ergebnisse nach Testen verschiedener Ionen.** In der ersten Zeile ist der Atomradius in Ångström angegeben, in der zweiten Zeile die Elektronenkonfiguration. In der dritten Zeile ist die Hydrationsenthalpie in kcal/mol angegeben (Noyes, 1962). Es folgt die Koordinationszahl und die am häufigsten an der Koordination beteiligten Aminosäuren (Dokmanić et al., 2008; Hancock et al., 2004). Betrachtet wurden die einzelnen Messungen mit und ohne vorherige Inkubation mit den jeweiligen Ionen, wobei der höchste Peak als 100 % gesetzt wurde. Die Angaben unter 1, 2 und 3 sind Prozentangaben. Weiterhin ist die normalisierte Stromstärke und die langsame Abklingzeit  $\tau$  in ms angegeben. Außerdem ist die normalisierte Stromstärke und die langsame Abklingzeit in ms ohne Inkubation angegeben. Zuletzt wurde der Faktor berechnet, um den sich die Stromstärke nach Verdopplung bzw. Vervierfachung der Ionenkonzentration erhöht. Bei grün hinterlegten handelt es sich um die besten Werte, gelbe liegen im mittleren Bereich und rote im unteren. Die Präferenz von mFI für die Ionen Calcium, Mangan und Zink wird deutlich.

	Ca <sup>2+</sup>			Mn <sup>2+</sup>			Zn <sup>2+</sup>			Mg <sup>2+</sup>			Co <sup>2+</sup>			Ba <sup>2+</sup>			Ni <sup>2+</sup>		
r, Å	0,99			0,80			0,74			0,65			0,74			1,35			0,72		
Orbital	4s2			3d54s2			3d104s2			3s2			3d74s2			6s2			3d84s2		
ΔH	-394,5			-454,9			-502,4			-473,3			-504,9			-325,5			-517,2		
Koordination	7			6			4 (5, 6)			5, 6			6			9 (8-10)			4, 6		
Aminosäure	4 Asp/Glu			Asp/Glu			4 Cys/His			4 Asp/Glu			Asp/Glu						4 Cys/His		
ohne Inkubation																					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
300 µM	96	98	100	99	100	100	100	81	78	48	100	91	82	95	100	89	98	100	97	91	100
600 µM	98	100	100	98	98	100	100	97	97	96	100	100	90	99	100	98	100	99	100	95	95
1200 µM	98	99	100	98	99	100	99	99	100	100	94	92	92	99	100	100	95	95	100	95	95
mit Inkubation																					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
300 µM	100	95	94	96	98	100	93	98	100	83	100	98	73	95	100	87	100	99	84	100	100
600 µM	96	94	100	89	97	100	83	99	100	89	100	96	85	100	98	91	100	100	86	100	100
1200 µM	97	98	100	95	100	99	91	97	100	90	99	100	89	98	100	89	95	100	87	100	100
300 µM	pA norm	0,32		0,81		1		0,35		0		0,18		0,04		0,04		0,04		0,04	
	tau (ms)	44		99		54		72		156		118		139		139		139		139	
600 µM	pA norm	0,46		1		0,59		0,17		0		0,17		0,04		0,04		0,04		0,04	
	tau (ms)	60		65		94		67		131		114		58		58		58		58	
1200 µM	pA norm	0,84		1		0,94		0,48		0,11		0,22		0		0		0		0	
	tau (ms)	64		70		71		84		77		77		94		94		94		94	
Faktor	Ca <sup>2+</sup>			Mn <sup>2+</sup>			Zn <sup>2+</sup>			Mg <sup>2+</sup>			Co <sup>2+</sup>			Ba <sup>2+</sup>			Ni <sup>2+</sup>		
300→600 µM	2,10			2,07			1,11			1,06			1,33			1,52			1,38		
600→1200 µM	1,91			1,13			1,70			2,56			3,19			1,80			2,02		
300→1200 µM	4,00			2,34			1,88			2,71			4,25			2,73			2,80		

Die Permeabilität Calcium-permeabler Ionenkanäle für andere divalente Ionen wird seit langer Zeit untersucht. In Membranen von Insektenmuskelzellen wurde die Permeation von Mangan, Cadmium, Zink und Beryllium nachgewiesen (Fukuda & Kawa, 1977). Kanäle der Endplatte leiten Cobalt, Nickel, Magnesium und Cadmium (Adams et al., 1980). Spannungs-abhängige und Rezeptor-vermittelte Signalwege ermöglichen den Einstrom von Mangan (Merritt et al., 1989). Der *Calcium release-activated Calcium* Kanal (CRAC), der IP<sub>3</sub>-Rezeptor und VGCCs leiten ebenfalls Mangan (Kamer et al., 2018).

Der TRPM7-Kanal ist nicht nur permeabel für Calcium und Magnesium (Nadler et al., 2001), zusätzlich konnte eine besonders hohe Permeation von Zink, aber auch von anderen essenziellen bivalenten Kationen sowie auch nicht-physiologischen oder toxischen

Metallionen beobachtet werden. Daraus ergab sich ein Permeationsprofil mit der Sequenz Zink  $\cong$  Nickel  $\gg$  Barium  $>$  Cobalt  $>$  Magnesium  $\geq$  Mangan  $\geq$  Strontium  $\geq$  Cadmium  $\geq$  Calcium, wobei Zink und Nickel den Kanal dreimal besser durchdrangen als Calcium. Es wurde gezeigt, dass Mangan, Cobalt und Nickel in Anwesenheit physiologischer Calcium- oder Magnesium-Konzentrationen von TRPM7 geleitet werden können (Monteilh-Zoller et al., 2003). Auch spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle sind durchlässig für Barium (Heldman et al., 1989), wohingegen andere Kanäle durch Barium blockiert werden (Ferreira et al., 1997). VGCCs, NMDA- und AMPA-Rezeptoren sind neben Calcium auch für Zink durchlässig (Inoue et al., 2015). Welche Kationen einen Calcium-Kanal passieren können, ist demnach sehr spezifisch. **Calcium** ist das häufigste Metall im menschlichen Körper (Sakipov et al., 2018) und seine Rolle bei der synaptischen Signalweiterleitung wurde in der Einleitung (Kapitel 3.1-3.4) beschrieben. Die Rolle von mFI bei der Zellkompetition scheint unabhängig von Calcium abzulaufen (Madan et al., 2019; Coelho & Moreno, 2020)

**Mangan** ist ein essenzielles Spurenelement für die Knochenbildung und den Lipid-, Aminosäure- und Kohlenhydratstoffwechsel. Eine Vergiftung mit Mangan führt zu Parkinson-ähnlichen Symptomen (Erikson et al., 2005). Daher wird die Mangan-Aufnahme und -Abgabe streng durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert, wozu neben einer Reihe von Transportern auch Calcium-Kanäle gehören (Lucaciu et al., 1997; Streifel et al., 2013; Chen et al., 2018). Mangan akkumuliert in Hirnregionen mit hoher neuronaler Aktivität und kann über Spannungs-abhängige Calcium-Kanäle in die Zellen gelangen (Petrus et al., 2021).

Neben Mangan sind auch niedrige Konzentrationen an **Zink** für zelluläre Funktionen, Proliferation und Apoptose notwendig (Rudolf & Rudolf, 2017; Lossow et al., 2021). Zink kann beispielsweise über die Carbonyl-Gruppe von Glutamat oder Aspartat oder über die Thiol-Gruppe von Cysteinen koordiniert werden (Gregory et al., 1993). Änderungen in der Zink- und Mangan-Homöostase sind mit zahlreichen kardiovaskulären (Choi et al., 2018) oder neurodegenerativen Krankheiten (Mezzaroba et al., 2019) assoziiert. Zink könnte durch Anreicherung in Amyloid-Plaques zur Pathogenese von Alzheimer beitragen (Lee et al., 2002). Je nach Zelltyp kann Zink apoptotisch oder anti-apoptotisch wirken (Franklin & Costello, 2009), zudem induzieren in einigen Zelltypen niedrige Zink-Konzentrationen die Apoptose, während hohe Konzentrationen sie inhibieren (Provinciali et al., 1995). Zahlreiche Ionenkanäle des zentralen Nervensystems werden durch Zink moduliert und viele an der Karzinogenese oder Tumorgenese beteiligte Kanäle dadurch reguliert (Pan et al., 2017). Die Regulation der durch mFI induzierten Zell-Kompetition und der Endozytose durch Zink ist eine mögliche Hypothese. Mutationen und die veränderte Expression von die Zink- und Mangan-Homöostase regulierenden Kanälen gelten als Kennzeichen vieler Krebsarten (Pan et al., 2017; Murali et al., 2020; Zhang et al., 2022). Die Art und Weise der Modulation der Ionenhomöostase oder der Förderung des Krebswachstums muss noch untersucht werden (Rozenberg et al., 2022).

Mangan steht vorwiegend im Zusammenhang mit der Entstehung metabolischer Krankheiten durch oxidativen Stress (Li & Yang, 2018) und kann deshalb vorerst nicht in einen funktionellen Zusammenhang mit mFI gestellt werden. Aufgrund ihrer niedrigen Hydrationsenthalpie können Mangan-Ionen Calciumkanäle passieren, da sie leichter Wasser durch Liganden des Kanals ersetzen können (Noyes, 1962), sodass die Permeation von Mangan keine funktionelle Bedeutung haben muss.

Ein Überschuss an Zink kann zu neurologischen Krankheiten führen, während ein Mangel Krebs begünstigen kann (Pan et al., 2017). Calcium hat keinen Einfluss bei der hFWE-vermittelten Zellkompetition (Madan et al., 2019), ein Effekt von Mangan und Zink wurde dagegen bislang nicht untersucht. Auch ist Flower mit neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington assoziiert (Coelho et al., 2018), bei denen Änderungen in der Zink- und Mangan-Homöostase ebenfalls eine Rolle spielen (Mezzaroba et al., 2019). Für dFwe wurde eine Ausübung der Funktion bei der Zellkompetition unabhängig von einem Calcium-Einstrom gezeigt (Coelho & Moreno, 2020). Auch hier wurde ein Einfluss von Zink und Mangan nicht untersucht. Zink wurde in hoher Konzentration in synaptischen Endigungen und bestimmten Vesikeln nachgewiesen (Schröder et al., 2000), sodass mFI seine Rolle auch über die Herstellung von Zinkströmen ausüben könnte. Dass die beobachteten Effekte von Zink bei mFI konzentrationsabhängig waren und nur bei der hohen Zink-Konzentration ein konstanter Strom gemessen wurde, könnte für eine enge Regulation der Zink-Homöostase durch mFI sprechen. Eine erhöhte mFweA-Expression könnte Zellen vor Krebs durch zur Verfügung stellen von genügend Zink für die Funktion des Tumorsuppressors p53 (Pan et al., 2017) schützen. Ob es durch eine erhöhte mFweA-Expression bei Krebs zu einem Transport von Zink aus dem Serum und damit einer Anreicherung in den Zellen kommt, ist Spekulation. Die erhöhte Zink-Konzentration könnte folglich Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren aktivieren, die eine wichtige Rolle bei dem Vorantreiben von Krebs spielen (Pan et al., 2017). Wie und ob eine erhöhte mFI-Expression mit der Zink-Homöostase in Verbindung steht, müsste genauer untersucht werden. Aufgrund der Rolle von Flower bei der Zell-Kompetition und der Verbindung zur Entstehung von Krebs (Petrova et al., 2012; Madan et al., 2019) und zum Schutz vor neurodegenerativen Krankheiten (Coelho et al., 2018) ist eine Regulation über Zink jedoch denkbar.

Es wäre eine stärkere Bindung von **Magnesium** an die Carboxyl-Gruppen in Calcium-Bindetaschen aufgrund der höheren Ladungsdichte im Vergleich zu Calcium zu erwarten. Der Energieaufwand für die Bindung des viel kleineren Magnesiums ist jedoch höher und überwiegt die für Magnesium günstige elektrostatische Anziehung (Jing et al., 2018). Dies erklärt die Messung leichter Magnesium-Ströme, solange Calcium aus der vorangegangenen Messung vermutlich noch an mFI gebunden war. An Calcium-Kanälen wirkt Magnesium



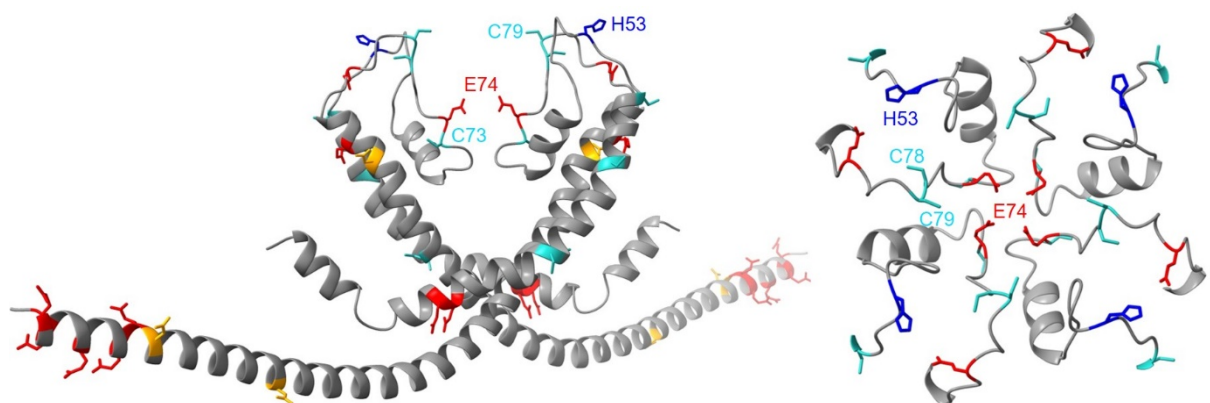
antagonistisch zu Calcium und dient als physiologischer Calciumkanal-Blocker (Touyz, 1991), worauf auch die durchgeführten Experimente hindeuten.

**Cobalt** gehört ebenfalls zu den essenziellen Spurenelementen (Angelova et al., 2014) und ist eher als Calcium-Kanal-Blocker bekannt (Moger, 1983), wobei für TRPM7 eine Permeation von Cobalt gezeigt wurde. Der zur Erhöhung der Cobalt-Konzentration proportionale Anstieg der gemessenen Ströme spricht für eine langsame Permeation von Cobalt. Die im Vergleich zu Calcium, Mangan und Zink niedrigen Ströme konnten mit einer vorherigen Blockierung des Kanals durch Nickel in Verbindung gebracht werden.

Im Vergleich zu Cobalt gilt Nickel als stärkerer Blocker von Calcium-Kanälen (Carbone & Swandulla, 1989) und die Experimente deuten auf eine Blockade von mFI durch **Nickel** hin. Von den getesteten Kationen weist Nickel die größte Hydrationsenthalpie auf (Abbildung 12.18), was das Passieren eines Kanals erschwert und zu einer Blockade führen kann (Anderson, 1983). Bei  $\text{Ca}_v3.2$  T-Typ Calcium-Kanälen ist ein Histidin in der Schleife zwischen zwei Membranhelices für die Blockierung durch Nickel verantwortlich (Kang et al., 2013). Laut Vorhersage durch AlphaFold (Jumper et al., 2021) liegt das Histidin 53 von mFI in der Schleife zwischen Helix 1 und 2 und könnte dort als Bindestelle für Nickel dienen und einen Einstrom verhindern. Auch im selbst erstellten Homologie-Modell liegt His53 in einer wahrscheinlich zugänglichen Schleife am Eingang der Pore (Abbildung 7.23).

**Barium** fungiert als Calcium-Agonist (Nordberg et al., 2007) ohne physiologische Funktion im menschlichen Körper. Die Bindung von Barium durch mFI bestätigte die Auswertung eines Kryo-EM-Datensatzes, bei dem vor der Vitrifizierung 2 mM  $\text{BaCl}_2$  zur Probe (mFI in 0,05 % Fos12) gegeben wurde. In den 2D-Klassen und initialen Modellen war Coulombdichte von einem bis vier Barium-Ionen sichtbar, was eine Bindung von Barium bestätigt (Abbildung 12.36).

In Abbildung 7.23 sind mögliche Ionen-Bindestellen im Homologie-Modell markiert. Häufig dienen Aspartat und Glutamat als Bindestellen für Calcium, Mangan, Magnesium und Cobalt sowie Cystein und Histidin als Bindestellen für Zink und Nickel (Dokmanić et al., 2008).

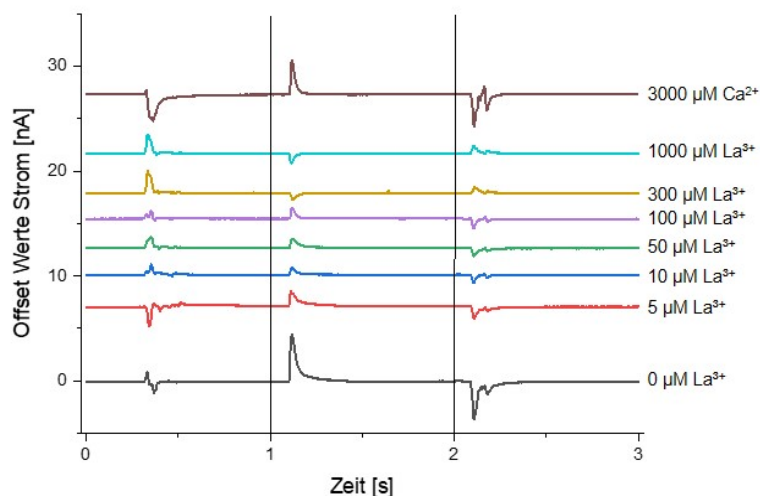


**Abbildung 7.23: Markierung möglicher Ionen-Bindestellen im Homologie-Modell von mFI.** Cysteine sind hellblau gefärbt, Histidin blau, Glutamat rot und Aspartat orange. Links sind zur besseren Übersicht nur die Ketten A und D gezeigt. Rechts ist die Aufsicht des Eingangs der Pore gezeigt.



### 7.8.3 Inhibierung von mFI durch dreiwertige Kationen

Lanthan ist ein typischer Blocker von Calcium-Kanälen (Sather & McCleskey, 2003; Atlas, 2013). Zur Überprüfung der Inhibierung von mFI durch Lanthan wie bei dFwe (Yao et al., 2017) wurden verschiedene Konzentrationen Lanthan dem nicht-aktivierendem und aktivierendem Puffer zugefügt. Die Ströme zwischen 0 und 1 s sind bis zu einer Lanthan-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  negativ, ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  werden sie positiv (Abbildung 7.24). Es wurde jeweils der Mittelwert aus drei Messungen gebildet, wobei die Einzelmessungen zeigen, dass bereits ab einer Lanthan-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nur der Peak der ersten Messung zwischen 0 und 1 s positiv ausfällt. Dies spricht für eine starke Bindung von Lanthan, das nach Beenden der vorherigen Messung nicht vollständig von mFI entfernt wurde. Im Gegensatz dazu nimmt der Peak zwischen 1 und 2 s mit zunehmender Lanthan-Konzentration ab und wird ab 300  $\mu\text{M}$  Lanthan negativ, da kein Calcium-Einstrom stattfinden kann und sich ein Überschuss an positiver Ladung außerhalb der Liposomen befindet. Der Peak zwischen 2 und 3 s ist negativ, solange Calcium ausströmt. Durch die Blockierung durch Lanthan fällt dieser positiv aus, da kein Calcium mehr aus den Liposomen ausströmt und Lanthan wahrscheinlich nicht vollständig von mFI entfernt wird. Erst eine höhere Calcium-Konzentration verdrängt Lanthan und stellt die Ströme wieder her (Abbildung 7.24). Somit kann mFI durch Lanthan reversibel inhibiert werden.



**Abbildung 7.24:** Darstellung der durch 600  $\mu\text{M}$  Calcium induzierten Ströme nach Inhibierung von mFI in versetzter Ansicht.

Bei 500  $\mu\text{M}$  Lanthan wird der Strom zwischen 1 und 2 s positiv, was sich auch bei Wiederholung der Messungen auf anderen Sensoren bestätigte. Eine Erklärung hierzu kann ohne Kenntnis des genauen Mechanismus der Inhibierung nicht gefunden werden.

Da die Gesamtproteinkonzentration auf dem Sensor unbekannt ist, kann die zur Blockade von mFI notwendige Konzentration von Lanthan ( $\text{IC}_{50}$ -Wert) nicht genau angegeben werden.

Bis 10  $\mu\text{M}$  Lanthan verlangsamt sich der Strom, was sich in der steigenden Abklingzeit zeigt (Abbildung 6.32D). Darüber hinaus schwanken die Abklingzeiten, was man auf die vollständige Inhibierung der Ströme zurückführen könnte.

Nach Zugabe von 10 mM Lanthan wurde mit mFI in Fos12 eine SEC durchgeführt. Dies führte zu einem Elutionsprofil mit einem sehr spitzen Peak und deutlich definierteren Banden nach Analyse im SDS-Gel im Vergleich zu mFI mit Calcium. Der Elutionspeak hatte das gleiche Retentionsvolumen wie mFI in Abwesenheit von Lanthan (Abbildung 12.20). Dies spricht für eine feste Bindung von Lanthan an mFI, die eine bestimmte Konformation stabilisiert. Bei Annahme eines sich öffnenden und schließenden Kanals könnte Lanthan einen geschlossenen Zustand stabilisieren. Zur Untersuchung der Bindung eines dreiwertigen Ions an mFI wurden Cryo-EM Grids nach Zugabe von 2 mM  $\text{Yb}^{3+}$  gefroren (Abbildung 6.25). Die Zugabe von Ytterbium führte allerdings zur Aggregation der Teilchen, weshalb auf die Aufnahme eines Datensatzes verzichtet wurde.

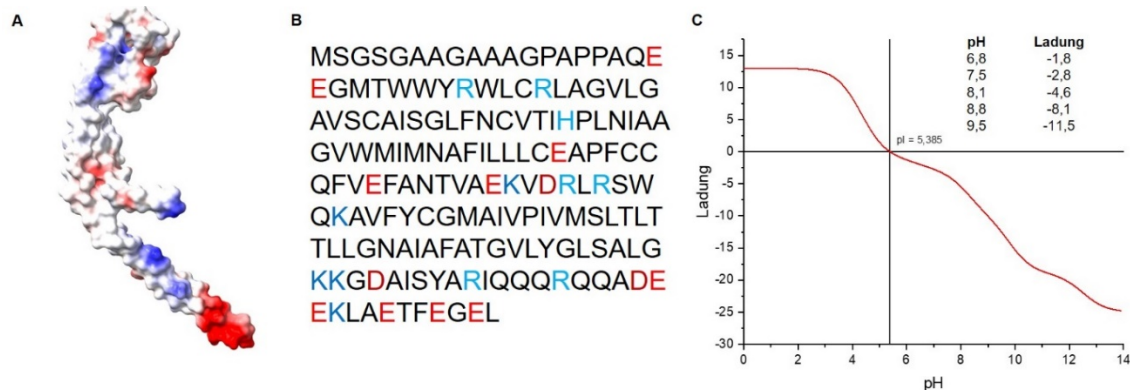
### 7.8.4 Untersuchung der pH-Abhängigkeit von mFI

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit von mFI wurden Puffer mit pH-Werten von 6,8 bis 9,5 getestet. Flower-Proteine wurden an der vesikulären Membran der synaptischen Vesikel und der Plasmamembran lokalisiert (Yao et al., 2009, Chang et al., 2018; Rudd et al., 2023). Im Zytosol liegt der physiologische pH-Wert von 7,2 vor, während der pH-Wert der Endosomen im Laufe der Reifung von 6,3 auf 4,7 absinken kann (Casey et al., 2009). Da mFI an der Plasmamembran als Calcium-Kanal fungieren könnte, wurde bei einem physiologischen pH-Wert eine höhere Aktivität erwartet. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass mFI bei einem pH-Wert von 4,6 am stabilsten ist (Lafontaine, 2017), wobei die höhere Stabilität für eine höhere Aktivität sprechen könnte. Allerdings fielen NDs aus Soy Lipid bei einem pH-Wert von 4,6 aus, weshalb auf das Testen niedrigerer pH-Werte verzichtet wurde.

Mit steigendem pH-Wert wird der Peak höher und schmaler, was auf einen stärkeren und gleichzeitig schnelleren Strom zurückzuführen ist (Abbildung 6.33A, B). Dementsprechend nimmt der Strom bei 1,13 s, also an der Stelle des erwarteten stationären Ionenstroms, mit steigendem pH-Wert in einem sigmoidalen Verlauf ab und liefert einen  $\text{pK}_a$  von 8,8 (Abbildung 6.33C). Das gleiche Ergebnis ergibt sich nach Berechnung der biexponentiellen Abklingzeiten nach Auftragen der langsamen Abklingzeiten gegen den pH-Wert (Abbildung 6.33D). Der nicht linear abfallende Verlauf deutet auf die Abhängigkeit des  $\text{pK}_a$  von einer einzigen Aminosäure hin. Um diese näher einzugrenzen, wurde im Folgeexperiment die Alkylierung mit MTSET durchgeführt.

Auch die Gesamtladung von mFI kann eine Rolle bei der pH-Abhängigkeit spielen. Ab einem pH-Wert von 8,8 nimmt die negative Gesamtladung von mFI sprunghaft zu. Vor allem im C-Terminus von mFI befinden sich gehäuft saure Aminosäuren (Abbildung 7.23, Abbildung 7.25), die bei einem hohen pH-Wert negativ geladen sind und Kationen binden könnten. Eine Konformationsänderung aufgrund des veränderten Ladungszustandes könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Auch wenn der genaue Funktionsmechanismus von mFI nicht bekannt ist,

könnte die Bindung von Ionen am C-Terminus den Ausgang der Pore weiter öffnen, wenn der lange C-Terminus eine andere Konformation annimmt.



**Abbildung 7.25: Markierung basischer und saurer Aminosäuren und Abhängigkeit der Ladung vom pH-Wert.** **A** Homologiemodell von mFI. Darstellung des elektrostatischen Potentials. Negativ geladene Aminosäuren sind rot gefärbt, positiv geladene blau. **B** Aminosäuresequenz von mFI. Basische Aminosäuren sind blau markiert, saure rot. **C** Abhängigkeit der Ladung von mFI vom pH-Wert (www.protpi.ch).

Das Vorhandensein einer pH-Abhängigkeit mit höherer Aktivität bei einem höheren pH-Wert deutet auf eine Kanalaktivität von mFI eher in der Plasmamembran als in Endosomen hin. Weiterhin besteht zwischen der pH-Abhängigkeit von mFI und seiner Rolle bei der Entstehung von Krebs (Madan et al., 2019) und dem Schutz vor neurodegenerativen Krankheiten (Coelho & Moreno, 2019) ein möglicher Zusammenhang. Eine Vielzahl von Calcium-Kanälen sind an der Proliferation von Krebszellen beteiligt, wozu unter anderem auch verschiedene Mitglieder der TRP-Familie wie TRPV6 gehören (Lehen'kyi et al., 2007). Ein erhöhter Calcium-Einstrom führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), was den Zellzyklus vorantreibt und für eine verstärkte Proliferation von Krebszellen führt. Gleichzeitig werden durch einen erhöhten Calcium-Einstrom Zelltod-induzierende Komplexe herunterreguliert, was den Krebszellen eine Apoptose-Resistenz verschafft (Prevarskaya et al., 2014). Die Alkalisierung der Tumorumgebung ist ein Treiber der Tumorprogression. In normalen Zellen liegt der intrazelluläre pH bei 6,99-7,05, in Tumorzellen bei 7,20-7,80. Ein höherer intrazellulärer pH-Wert begünstigt unter anderem die Zellviabilität, das Zellüberleben und den Schutz von Neuronen in Bezug auf die Entstehung neurodegenerativer Krankheiten (Harguindey et al., 2017). Ionenkanäle reagieren unterschiedlich auf die Veränderungen im intra- und extrazellulären pH-Wert. Bei TRPV5 führt beispielsweise eine intrazelluläre Azidierung zu einer verringerten Wahrscheinlichkeit für das Öffnen des Kanals, während ein höherer pH-Wert die Wahrscheinlichkeit erhöhte (Cha et al., 2007). Alzheimer-Patienten weisen eine erhöhte intrazelluläre Azidierung im Gehirn auf, was zum Tod der Neuronen führen kann (Xiong et al., 2008). Da mFI dann eine geringere Aktivität aufweist, könnte dies zur Selektion aufgrund geringerer Fitness führen. Die stärkere Aktivität bei höherem pH-Wert könnte helfen das Tumorwachstum voranzutreiben. Der genaue Funktionsmechanismus von Flower-Proteinen bei der Entstehung von Krebs und dem Schutz vor neurodegenerativen Erkrankungen ist unbekannt. Möglich wäre somit eine Regulation über die Stärke des vom pH-

Wert abhängigen Calcium-Einstroms. Eine Erhöhung des pH-Wertes könnte, ähnlich wie bei TRPV5, die Wahrscheinlichkeit für das Öffnen des Kanals erhöhen. Die Untersuchung einer Calcium-Abhängigkeit der Zellkompetition bei hFWE (Madan et al., 2019) wurde nicht unter Berücksichtigung des pH-Wertes durchgeführt.

### 7.8.5 Substrat-geschützte Alkylierung mit MTSET

Der  $pK_a$  von 8,8 im Gegensatz zu einer linearen pH-Abhängigkeit spricht für die Verantwortung einer einzigen Aminosäure, wofür der potenzielle Selektivitätsfilter E74 von mFI in Frage kommt. Zur Bestätigung wurde eine Substrat-geschützte Alkylierung mit MTSET durchgeführt. C73 liegt im Homologie-Modell bei Betrachtung der Pore unter E74 (Abbildung 7.23). Bei Bindung eines Calcium-Ions an dieser Stelle sollte der Zugang und damit die Alkylierung von C73 durch MTSET verhindert werden. Wird C73 nicht geschützt, sollte der Ionenstrom verändert und eine Verschiebung des  $pK_a$  beobachtet werden können. Die möglichst niedrige Calcium-Konzentration von 300  $\mu$ M sollte verhindern, die Auflösungsgrenze des Sensors zu überschreiten.

Zunächst sollte der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Reaktion abgeschlossen oder fortgeschritten ist. Sogar beim Zeitpunkt 0 war ein Unterschied zwischen mFI ohne Calcium und Substrat-geschütztem mFI erkennbar, was die hohe Sensitivität des Cysteins für MTSET zeigt (Abbildung 6.34). Wurde mFI mit Calcium versetzt, konnte bereits nach 30 s Alkylierungszeit eine leichte Rechtsverschiebung der Peaks beobachtet werden. Nach 10 min Alkylierungszeit ist ein deutlicherer Unterschied in der langsamen Phase der Peaks ab etwa 1,15 s erkennbar (Abbildung 6.34B), weshalb diese Zeit für weitere Experimente gewählt wurde. Alle Messungen fanden nah an der Auflösungsgrenze des Sensors statt. Der höhere Peak bei nicht geschütztem, alkyltem mFI in der langsamen Phase bedeutet deshalb einen stärkeren Ionenstrom. Bei mFI mit Calcium findet ein schwächerer Strom statt. Bestätigt wird dies durch die Berechnung der biexponentiellen Abklingzeiten, die bei Substrat-geschütztem Calcium selbst nach 10 min Alkylierungszeit deutlich niedriger sind mit einer Abklingzeit ohne Calcium bei etwa 105 ms und mit Calcium bei etwa 85 ms. Ohne vorherige Zugabe von Calcium nimmt die Abklingzeit bis zu einer Alkylierungszeit von 6 min sigmoidal ab, während sie bei Substrat-geschütztem Calcium im gleichen Bereich liegen. Dies zeigt die effektivere Dehydrierung der Calciumionen durch das neu entstandene Pseudo-Arginin in Folge der Alkylierung an. Nach 6 min kommt es hier zu einem sprunghaften Anstieg (Abbildung 6.34D), sodass hier vermutlich die Alkylierung aller Cysteine einsetzt. Da zu diesem Zeitpunkt bei beiden Proben nicht alle Cysteine alkylt sind und unbekannt ist, um welche es sich dabei handelt, lassen sich die Ströme und Abklingzeiten nicht genau interpretieren. Nach drei Tagen Alkylierungszeit nähern sich die Abklingzeiten für geschütztes und nicht-geschütztes mFI an, sodass die Alkylierung hier vollständig abgeschlossen sein muss.

Nach Feststellung der geeigneten Alkylierungszeit sollte der Einfluss der Substrat-geschützten Alkylierung auf den  $pK_a$  getestet werden. Die Alkylierung mit MTSET erzeugt aus Cysteinen ein „Pseudo-Arginin“ mit einer positiven Ladung. Die Hypothese war, dass die Änderung der Umgebung des E74 durch die zusätzliche positive Ladung die deprotonierte Form stabilisiert mit dem Resultat eines niedrigeren  $pK_a$  ohne vorherige Zugabe von Calcium im Vergleich zu Substrat-geschütztem mFI. Für mFI ohne MTSET-Behandlung wurde ein  $pK_a$  von 8,8 bestimmt, weshalb folglich pH-Werte zwischen 6,8 und 9,5 getestet wurden.

Wie bei nicht behandeltem mFI nimmt die Stromstärke mit zunehmendem pH-Wert zu. Die ohne Zugabe von Calcium ausgelösten Peaks liegen bei den unterschiedlichen pH-Werten enger zusammen und sind breiter im Vergleich zu den Peaks bei Substrat-geschütztem mFI. Dies bedeutet, dass tendenziell der Ionenstrom verlangsamt ist und dass die Alkylierung im möglichen Selektivitätsfilter mFI weniger sensitiv für pH-Änderungen macht. Es wurde ein  $pK_a$  von 6,5 bestimmt, sodass alle getesteten pH-Werte über dem  $pK_a$  liegen und bei allen Messungen alkyliertes mFI deprotoniert vorliegen sollte. Es wurde vermutet, dass durch die zusätzliche positive Ladung durch das „Pseudo-Arginin“ die deprotonierte Form stabilisiert wird, was einen niedrigeren  $pK_a$  zur Folge haben sollte. Dies bestätigte sich hiermit und spricht für E74 als Selektivitätsfilter, der durch die Bindung von Calcium C73 vor der Alkylierung durch MTSET schützen kann. Bei Substrat-geschütztem mFI lag der  $pK_a$  bei 8,2 und damit etwas niedriger als der  $pK_a$  von unbehandeltem mFI mit 8,8. Dies könnte eine Alkylierung eines geringen Anteils der Kanäle auch vor dem Selektivitätsfilter bedeuten.

Die Experimente deuten stark darauf hin, dass es sich bei E74 um den Selektivitätsfilter handelt. Zur eindeutigen Bestätigung wären Cystein-lose Varianten von mFI nötig, da ein Einfluss der Alkylierung der anderen sechs Cysteine auf den Ionenstrom nicht ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren ist unbekannt, welche der Cysteine tatsächlich alkyliert wurden. Weiterhin wurde der Einfluss der Alkylierung und Substrat-geschützten Alkylierung auf die Ionenspezifität getestet. Insgesamt fielen die Ströme niedriger aus als bei unbehandeltem mFI, wobei Calcium und Zink die stärksten Ströme auslösten. Insbesondere die Zink- und Mangan-Ströme fallen bei den alkylierten Proben deutlich niedriger aus als bei dem Sensor mit unbehandeltem mFI. Durch Magnesium, Cobalt, Barium und Nickel induzierte Ströme waren kaum messbar (Tabelle 7.3, Abbildung 6.36), sodass mFI durch die Alkylierung eine höhere Spezifität für Calcium und Zink erlangt hat. Deutliche Unterschiede sind nur zwischen mit MTSET behandeltem und nicht-behandeltem mFI erkennbar. Die Unterschiede zwischen Substrat-geschütztem und nicht-geschütztem mFI sind gering, wobei die Ströme bei nicht-geschütztem mFI etwas höher ausfallen. Dies lässt sich auf die effektivere Dehydrierung der Ionen durch die zusätzliche positive Ladung bei C73 zurückführen. Die Modifizierung der Cysteine sorgt somit insgesamt für ein spezifischeres mFI, wobei nur bei Calcium und Zink ein stärkerer und bei Mangan ein leichter Ionenstrom ermöglicht wird.

**Tabelle 7.3: Normalisierte Peakpotentiale bei mFI, alkyltem mFI und Substrat-geschütztem alkyltem mFI, die durch verschiedene zweiwertige Ionen in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  ausgelöst wurden.** Unter AS (Aminosäure) sind die Aminosäuren angegeben, durch die die angegebenen Ionen am häufigsten gebunden werden (Dokmanić et al., 2008). Beim normalisierten Peakpotenzial wurden die Daten getrennt normalisiert, in den unteren Zeilen wurde der gesamte Datensatz normalisiert.

	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$
AS	Asp/Glu	Asp/Glu	Cys/His	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Cys/His
normalisiertes Peakpotenzial							
- MTS	0,32	0,81	1	0,35	0	0,18	0,04
+ MTS - $\text{Ca}^{2+}$	1	0,28	0,97	0,02	0,09	0	0,07
+ MTS + $\text{Ca}^{2+}$	0,98	0,39	1	0,06	0,06	0	0,03
auf gesamten Datensatz normalisiert							
- MTS	0,42	0,83	1	0,44	0,14	0,30	0,17
+ MTS - $\text{Ca}^{2+}$	0,34	0,10	0,33	0,01	0,04	0	0,03
+ MTS + $\text{Ca}^{2+}$	0,28	0,11	0,29	0,02	0,02	0	0,01

Die Alkylierung hatte nur einen geringen Einfluss auf die Stärke der Calcium-Ströme. Deutliche Unterschiede hingegen liegen bei der langsamen Abklingzeit vor, die bei mFI ohne MTS-Behandlung bei etwa 45 ms, bei alkyltem mFI mit Calcium bei 65 ms und bei alkyltem mFI ohne Calcium bei 105 ms liegt (Abbildung 6.36). Dies zeigt, dass durch die Alkylierung eine effektivere Dehydrierung der Calcium-Ionen und damit ein höherer Ionenfluss ermöglicht wird, was in einer langsameren Abklingzeit resultiert. Die niedrigen Peaks verhinderten eine Berechnung der biexponentiellen Abklingzeiten aller getesteten Ionen, die daher nur bedingt aussagekräftig sind. Insgesamt waren sie tendenziell für unbehandeltes mFI niedriger und für Substrat-geschütztes, alkyltes mFI höher. Allerdings fehlt der Vergleich mit nicht-geschütztem, alkyltem mFI für eine eindeutige Interpretation der Abklingzeiten. Zu beachten ist auch, dass eine nicht immer gleiche Menge an Proteoliposomen auf dem Sensor zu Unterschieden in der Stromstärke führen kann. Daher lässt sich nur sicher schlussfolgern, dass die Alkylierung zu einer veränderten Ionenspezifität führt, wobei eine Erklärung nur mit Kenntnis der Art der Koordination in mFI gegeben werden kann.

#### 7.8.6 Die Y104A-Variante zeigt eine veränderte Kanalaktivität

Eine Mutation des hochkonservierten Tyrosins 104 (Y104A) konnte den Endozytosedefekt in Flower-Knockout Zellen nach Wiedereinführung nicht wiederherstellen (Ravichandran, 2021). Durch SSM-Elektrophysiologie sollte überprüft werden, ob die Variante zur Herstellung eines Ionenstroms in der Lage ist. Trotz der Annahme von zwei Transmembrandomänen wies die Analyse mittels Protter darauf hin, dass es durch die Mutation zu einer Konformationsänderung in Form einer Umlagerung der Helices kommen könnte, wobei sich die Zahl der Transmembrandomänen von drei auf vier erhöhte (Abbildung 12.21). Durch Einführung der hydrophoben Aminosäure Alanin entsteht ein größerer hydrophober Bereich. Zudem liegen Tyrosine häufig am Ende einer Transmembranelix (Baker et al., 2017), sodass der Server Protter (Omasits et al., 2014) eine andere Topologie vorhersagt. Bei der Reinigung (Abbildung 12.22) verhielt sich die Variante wie mFI und zeigte in einer nativen PAGE und einer HPLC-SAXS-Messung ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten wie mFI (Abbildung 12.23). Da die

Variante das gleiche Laufverhalten im SDS- und nativen Gel zeigt, wird von einer ähnlichen Faltung wie mFI ausgegangen. Ein Einbau von mFI(Y104A)-StreptII in Liposomen wurde mittels Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 6.26) und auch hier zeigten sich Banden auf der gleichen Höhe wie mFI.

Die Peakmaxima der Ströme der Y104A-Variante liegen weiter links und die Ströme fallen niedriger aus (Abbildung 6.28). Die dementsprechend niedrigste Abklingzeit (Abbildung 6.29D) lässt das Vorliegen einer schnell stattfindenden Bindung und keines Ionenstroms vermuten. Unklar ist jedoch, ob sich die gleiche Menge Proteoliposomen auf den Sensoren befindet. Bei Wiederholung der Messungen variierte die Position des Maximums der Y104A-Variante und lag auch rechts der Maxima der WT-Ströme, jedoch lag immer ein Unterschied in der Peakposition im Vergleich zu mFI vor. Da bei mFI von einer Entstehung der Peaks durch eine Bindung und einen Ionenstrom ausgegangen wird, ist aufgrund fehlender Vergleichsmessungen das Aussehen eines Peaks einer reinen Bindung oder eines reinen Ionenstroms unbekannt.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach Messungen auf 3 mm Sensoren, wo bei der Y104A-Variante die durch Calcium induzierten Peaks niedriger ausfielen und die schnelle Abklingzeit nur bei der Variante deutlich unter der Auflösungsgrenze des Sensors lag (Abbildung 12.16), was für einen fehlenden Ionenstrom spricht.

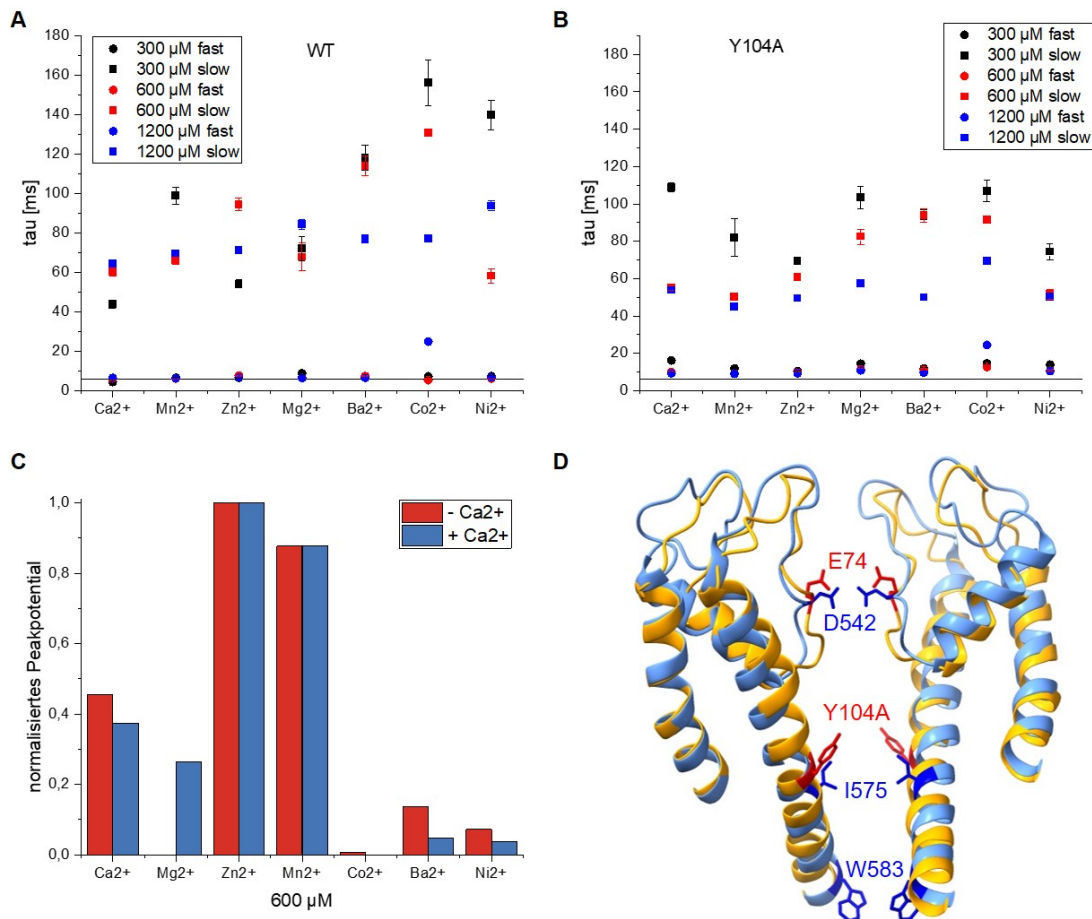
Dass bei der Y104A-Variante nur eine Bindung von Calcium, aber kein Ionenstrom stattfindet, würde zum beobachteten Endozytose-Defekt der Variante passen (Ravichandran, 2021).

Da gezeigt wurde, dass mFI auch andere Ionen binden oder leiten kann, wurden die Ionen auch bei der Y104A-Variante getestet. Beim Testen der verschiedenen Ionen stellten sich ebenfalls Unterschiede zwischen mFI-WT und der Y104A-Variante heraus (Abbildung 6.31, Abbildung 7.26). Die mit Abstand höchsten Ströme wurden durch Zink induziert, gefolgt von Mangan. Bei allen drei getesteten Ionenkonzentrationen von 300, 600 und 1200  $\mu\text{M}$  lieferte Zink die höchsten Ströme. Bei einer Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  waren die Peakpotentiale von Calcium und Mangan im Vergleich zu den anderen Konzentrationen vergleichsweise höher. Bei Magnesium, Cobalt, Barium und Nickel waren die Ströme bei allen getesteten Konzentrationen auf einem sehr niedrigen Niveau (Abbildung 6.31B). Bis auf Zink wiesen die Ströme aller getesteten Ionen einen zweiten Peak auf. Auch bei Messungen auf 3 mm Sensoren war das Peakpotenzial von Zink viermal höher als von Calcium (Abbildung 12.16). Deutliche Unterschiede zeigen sich auch bei Berechnung der biexponentiellen Abklingzeiten (Abbildung 7.26), wobei bei mFI in allen Konzentrationen bei Calcium die niedrigste Abklingzeit vorlag. Im Gegensatz dazu wies mFI(Y104A) bei Calcium in der niedrigsten Konzentration die höchste Abklingzeit auf. In der höchsten Konzentration von 1200  $\mu\text{M}$  weisen die Abklingzeiten bei beiden Proteinen einen ähnlichen Verlauf auf, was dafürspricht, dass diese Peaks hauptsächlich die Bindung der Ionen repräsentieren. Bei mFI(Y104A) liegt bei 300  $\mu\text{M}$  Zink die



## Diskussion

niedrigste Abklingzeit mit einem gleichzeitigen Maximum der Stromstärke vor. Dies deutet darauf hin, dass ein Zink-Strom erfolgt. Es ist aufgrund der schnellen Abklingzeit zu vermuten, dass auch Mangan durch den Kanal strömt. Insgesamt liegen die schnellen Abklingzeiten bei der Y104A-Variante höher als bei mFI und die langsamen Abklingzeiten fallen tendenziell niedriger aus. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Anteil des Ionenstroms am Peak fehlt und nur eine Bindung sichtbar ist, was in einem anfangs langsamer abfallenden Peak und einer schneller abfallenden langsamen Phase resultiert (Abbildung 7.26A, B).



**Abbildung 7.26: Vergleich der biexponentiellen Abklingzeiten von mFI-WT und der Y104A-Variante.** **A** Biexponentielle Abklingzeiten von mFI für verschiedene zweiwertige Ionen. **B** Biexponentielle Abklingzeiten der Y104A-Variante für verschiedene zweiwertige Ionen. **C** Normalisierte Peakpotentiale verschiedener zweiwertiger Ionen von mFI(Y104A) nach vorheriger Inkubation mit Magnesium (-Ca<sup>2+</sup>) und Calcium (+Ca<sup>2+</sup>). **D** Überlagerung der Porenregionen von mFI (orange) und TRPV5 (blau, PDB: 6DMR). TRPV5 besitzt einen Selektivitätsfilter (D542) sowie einen unteren Ausgang der Pore, der durch I575 und W583 definiert wird (Hughes et al., 2018). Y104 von mFI liegt auf der Höhe von I575 und könnte für die Weiterleitung der Ionen durch den Kanal sorgen.

Durch Magnesium ausgelöste Ströme waren zunächst nicht messbar. Allerdings erfolgte hierbei eine weitere Messung mit Magnesium im Vorfeld. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei Messungen mit mFI-WT beobachtet. Daher wurden die Messungen mit einer vorherigen Inkubation mit Calcium wiederholt. Dies ermöglichte einen Magnesiumstrom (Abbildung 7.26C) und bestätigte die Vermutung, dass Magnesium den Kanal nur passieren kann, wenn er sich durch ein anderes zweiwertiges Ion wie Calcium in einem geöffneten Zustand befindet. Die Ergebnisse zur Spezifität der Y104A-Variante sind in Tabelle 7.4 zusammengefasst.



**Tabelle 7.4: Permeationsprofile von mFI(Y104A) unter Berücksichtigung der Stromstärke, der Ladung und der Abklingzeit.**

<b>Strom</b>	Y104A
300 $\mu$ M	$\text{Zn}^{2+} \gg \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Co}^{2+}$
600 $\mu$ M	$\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+} = \text{Co}^{2+}$
1200 $\mu$ M	$\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} = \text{Ni}^{2+}$
<b>Ladung</b>	
300 $\mu$ M	$\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > > \text{Ni}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Co}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$
600 $\mu$ M	$\text{Zn}^{2+} = \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \gg \text{Ni}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$
1200 $\mu$ M	$\text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$
<b>Abklingzeit</b>	
300 $\mu$ M	$\text{Zn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$
600 $\mu$ M	$\text{Mn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$
1200 $\mu$ M	$\text{Mn}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Co}^{2+}$

In Bezug auf die Stromstärke und die translozierte Ladung liegt eine deutliche Präferenz für Zink und Mangan vor. Ein Magnesium-Strom ist nur bei einer durch Calcium geöffneten Pore möglich. Eine Permeation der Ionen Barium, Nickel und Cobalt findet wahrscheinlich nicht statt. Somit zeigen die Ergebnisse eine veränderte Spezifität der Y104A-Variante und deuten auf eine Veränderung der Calcium-Spezifität zu einer Zink-Spezifität hin. Es wird vermutet, dass die Bindung der Ionen in den Peaks der Y104A-Variante stärker sichtbar ist als ein Strom. Abbildung 7.26D zeigt die Überlagerung der Porenregion von TRPV5 und mFI. Bei ähnlicher Funktion von Y104A wie I575 in TRPV5 (Hughes et al., 2018) ist ein Eintritt der Ionen in die Pore sehr wahrscheinlich. Die Weitergabe der Ionen Richtung Ausgang der Pore findet durch die Mutation vermutlich nicht effizient genug statt, weshalb in der gemessenen Zeitspanne nur die Bindung stattfindet. Daher ist erst ab einer höheren Calcium-Konzentration ein Ionenstrom messbar. Zink wird in der Regel über Cysteine und Histidine koordiniert (Dokmanić et al., 2008), sodass für Zink-Ionen ein anderer, durch die Mutation nicht beeinflusster Weg durch den Kanal denkbar wäre. Zur abschließenden Klärung wären hochaufgelöste Strukturen beider Proteine nötig.

### Fazit

Folgende Schlüsse lassen sich aus den durchgeführten SSM-Experimenten ziehen: Erstmals konnten Calcium-Ströme bei mFI nachgewiesen werden, wobei die Ströme nur bei geringer Protein- und Ionenkonzentration interpretierbar sind. Wie bei dFwe konnten die Ströme durch Lanthan inhibiert werden. MFI ist nicht Calcium-spezifisch und weist das Permeationsprofil Mangan > Calcium > Zink > Magnesium > Cobalt > Barium > Nickel auf. Es zeigte sich eine pH-Abhängigkeit mit einem  $\text{pK}_a$  von 8,8. Die Substrat-geschützte Alkylierung mit MTSET deutet darauf hin, dass es sich bei E74 um den für den  $\text{pK}_a$  verantwortlichen Selektivitätsfilter handelt. Die Alkylierung mit MTSET verlangsamt den Strom und führt zu einer Herabsetzung des  $\text{pK}_a$  um zwei pH-Einheiten. Die vorherige Zugabe von Calcium schützt wahrscheinlich den Selektivitätsfilter vor der Alkylierung. Die Y104A-Mutation verändert die Calcium-Spezifität zu einer Zink-Spezifität.

Die Experimente sprechen für die Richtigkeit des auf der Grundlage von TRPV5 erstellen Homologie-Modells für mFI und bestätigen auch die Vermutung, dass es sich bei einem Tetramer um die funktionelle Form des Proteins handeln muss, während das Hexamer möglicherweise nur ein Artefakt der Reinigungsstrategie darstellt.

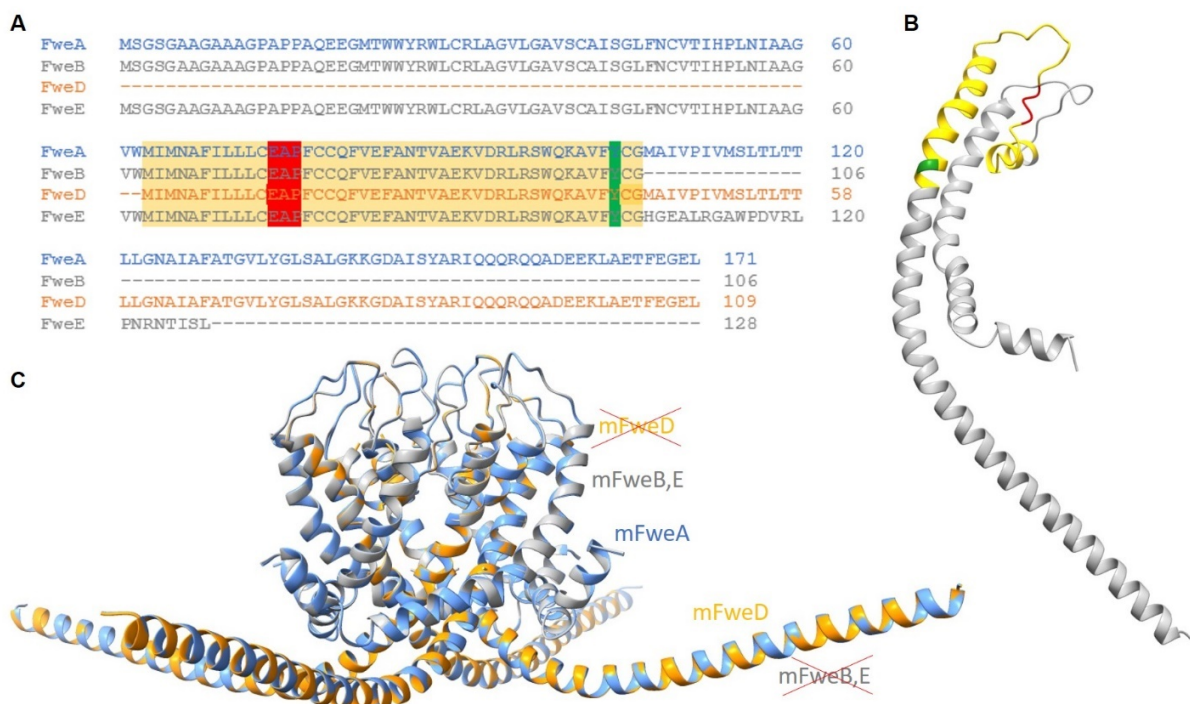
### 7.9 Homologie-Modell von mFI

Das AlphaFold-Modell passt sehr gut in das experimentell bestimmte SAXS-Modell mit niedriger Detergenzkonzentration. Aufgrund der aus den SAXS-Experimenten erhaltenen Modelle mit dihedraler Symmetrie wurde zunächst vermutet, dass sich zwei mFI-Tetramere in der Membran zusammenfinden und nur so einen aktiven Kanal bilden. Diese Hypothese wurde nach der Untersuchung der Calcium-Ströme bei verschiedenen LPRs wieder verworfen. Die langsame Abklingzeit bei 1200  $\mu\text{M}$  Calcium weist mit steigendem LPR einen sigmoidalen Verlauf auf (Abbildung 6.29D). Die Abklingzeiten bei den übrigen Calcium-Konzentrationen schwanken jedoch (Abbildung 6.29B), sodass der sigmoidale Verlauf auf die Überschreitung der Auflösungsgrenze des Sensors und nicht auf das Zusammenlagern von mFI-Tetrameren zurückzuführen ist. Die SSM-Experimente zeigten somit, dass sich mFI als fertiger Kanal in der Membran befinden muss, was Membran-durchspannende Helices voraussetzt.

Darum scheint die Vorhersage von AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022) mit vier Transmembrandomänen möglicherweise nicht den physiologischen Zustand des Proteins zu repräsentieren. Eine Lipiddoppelschicht hat eine Dicke von etwa 25-35 Å (Lewis & Engelman, 1983). Die zweite Helix im AlphaFold-Modell ist 23 Aminosäuren lang, die dritte besteht nur aus 17 Aminosäuren, was für eine Transmembranhelix eher kurz ist (McKay et al., 2018). Im Modell ist der mögliche Selektivitätsfilter E74 zur ersten Transmembrandomäne hin gerichtet und wäre damit in einer Pore nicht zugänglich. Aufgrund der Sequenzhomologie mit dem Selektivitätsfilter von TRPV5/6 (Yao et al., 2009) wurde daher ein eigenes Homologie-Modell zu TRPV5 unter Anleitung von Dr. Madej erstellt (Abbildung 6.37).

Die bislang durchgeführten Experimente sprechen für die Richtigkeit des Homologie-Modells. Um zu untersuchen, ob alle vier mFI-Isoformen zur Bildung eines Kanals in der Lage wären, wurden mit Hilfe von SWISS-Model (Waterhouse et al., 2018) Strukturmodelle der Isoformen erstellt. Der Vergleich der Modelle der verschiedenen Isoformen, bei denen das selbst erstellte Homologie-Modell als Vorlage genutzt wurde, zeigt die gleiche Sequenz und Struktur der Isoformen im Bereich der möglichen Porenregion. In diesem, eine 100 %-ige Sequenzidentität zwischen den Isoformen aufweisenden Bereich (AS 63-106 in mFweA) (Abbildung 7.27B) befindet sich auch der Selektivitätsfilter E74 sowie das konservierte Y104 am möglichen Ausgang der Pore. Der C-Terminus von mFwe weist keine Sequenzidentität zu den anderen Isoformen auf, weshalb dieser Bereich nicht gemodelt wurde und die Modelle von mFweB und mFweE identisch sind. Entsprechend stimmen die Modelle der Isoformen im Bereich der Porenregion überein und unterscheiden sich nur im N- bzw. C-Terminus (Abbildung 7.27C).

Während bei mFweE und mFweB der lange C-Terminus fehlt, wird bei mFweD der N-Terminus durch alternatives Spleißen entfernt. Beide Regionen erscheinen zur Bildung eines Kanals nicht essenziell, weshalb aufgrund der in allen Modellen vorhandenen Porenregion die Bildung eines Ionenkanals bei allen Isoformen denkbar wäre. Ob mFweD aufgrund des fehlenden N-Terminus zur Bildung einer stabilen Pore fähig ist, ist fraglich. Die Fähigkeit der einzelnen Isoformen zur Wiederherstellung der Syb2 (Synaptobrevin 2) Endozytose wurde getestet (Ravichandran, 2021), wobei nur die Isoform mFweD nicht in der Lage war, den Endozytose-Defekt der Knockout-Zellen wiederherzustellen. Dies spricht für die fehlende Möglichkeit von mFweD zur Bildung einer stabilen Pore und eine Ursache des Endozytosedefekts in einer fehlenden Kanalfunktion. MFweB zeigte einen stärkeren Effekt bei der Wiederherstellung der Endozytose als mFweE. Man kann spekulieren, dass die zusätzlichen Aminosäuren im C-Terminus von mFweE mit zwei enthaltenden Prolinen eine den Ausgang der Pore blockierende Konformation annehmen. Für genauere Aussagen wäre die Analyse hochaufgelöster Strukturen aller Isoformen nötig. Dennoch passen auch diese Strukturmodelle zu den beschriebenen Beobachtungen (Ravichandran, 2021).



**Abbildung 7.27: Alinierung der Sequenzen und Strukturmodelle von mFweA und seiner Isoformen.** **A** Sequenzanlagerung der mFI-Isoformen. Identische Bereiche sind gelb hinterlegt. **B** Kette A des Homologie-Modells von mFIA. Die aus der Sequenzalinierung identifizierten identischen Bereiche sind gelb markiert. Der Selektivitätsfilter EAP ist rot markiert und der Bereich in Exon 3 gelb. **C** Anlagerung der durch SWISS-Model (Waterhouse et al., 2018) erstellten Strukturmodelle der Isoformen. MFweA ist in blau dargestellt, mFweB und E in grau und mFweD in gelb. Rote Kreuze kennzeichnen nicht vorhandene Regionen, wobei bei mFweB und E der C-Terminus, bei mFweD der N-Terminus fehlt.

### 7.10 Fazit

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine hochaufgelöste Struktur von mFI erhalten wurde, konnten aus der Vielzahl an durchgeführten Experimenten Hinweise auf die Struktur gewonnen werden. Es wird angenommen, dass der physiologische Zustand des Proteins in der Membran ein Tetramer ist. Der Nachweis von Calcium-Strömen und die Interaktion mit Calmodulin unterstützen die vorgeschlagene Rolle von mFI als Calcium-Kanal bei der Kopplung von Exo- und Endozytose. Obwohl noch unklar ist, ob auch die anderen mFI-Isoformen einen Kanal bilden können, könnte die Funktion als Ionenkanal eine Rolle bei der Zellkompetition spielen, indem die Fähigkeit zur Bildung eines Ionenstroms mFI zu einer „Gewinner“-Isoform macht. Nicht geklärt ist, ob die beobachtete Interaktion zweier mFI-Tetramere dabei eine Rolle spielt. Die Position des Selektivitätsfilters konnte eingegrenzt werden und spricht für das vorgeschlagene Homologiemodell von mFI mit zwei Transmembrandomänen.

Steht dem Protein nicht genug Detergenz zur Verfügung, nimmt es eine andere Konformation an, bei der sich hydrophobe Bereiche zur Erhöhung der Stabilität in Lösung aneinanderlagern, sodass sich mFI wie ein lösliches Protein verhält. Unklar bleibt die physiologische Relevanz dieses Zustandes. In allen gemessenen Kryo-EM Datensätzen sind verschiedene Oligomerformen des Proteins deutlich sichtbar, eine für Membranproteine typische Mizelle allerdings nicht. Trotz zahlreicher Versuche gelang die Isolierung oder spätere Stabilisierung eines definierten Oligomerzustandes nicht, was wahrscheinlich auf die heterologe Produktion in *E. coli* zurückzuführen ist. Zur erfolgreichen Aufklärung der Struktur sollte zukünftig überprüft werden, ob nach Überexpression von mFI in Säugerzellen bezüglich des Oligomerisierungszustandes homogeneres Material erhalten werden kann. Der Nachweis von Ionenströmen bei in Liposomen rekonstituiertem Protein bestätigt, dass sich mFI nach der in dieser Arbeit optimierten Reinigungsmethode in einer Lipidumgebung in einem funktionellen Zustand befindet.

Nach Etablierung der SSM-basierten Elektrophysiologie als Methode zur funktionellen Charakterisierung von mFI konnten erstmals Calcium-Ströme bei mFI nachgewiesen werden. Dies bietet nun die Grundlage für weitere Analysen wie das Testen von Inhibitoren mit therapeutischem Potenzial.

## Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Abhinandan, K. R., & Martin, A. C. R. (2008). Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. *Mol Immunol*, 45(14), 3832–3839.
- Adams, D. J., Dwyer, T. M., & Hille, B. (1980). The permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations. *J Gen Physiol*, 75(5), 493–510.
- Adams, P. D., Pannu, N. S., Read, R. J., & Brunger, A. T. (1999). Extending the limits of molecular replacement through combined simulated annealing and maximum-likelihood refinement. *Acta Crystallogr D*, 55(1), 181–190.
- Alabi, A. A., & Tsien, R. W. (2013). Perspectives on kiss-and-run: Role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annu Rev Physiol*, 75, 393–422.
- Alberts, B., Johnson, A. D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2011). *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH.
- Anderson, M. (1983). Mn ions pass through calcium channels. A possible explanation. *J Gen Physiol*, 81(6), 805–827.
- Angelova, M. G., Petkova-Marinova, T. V., Pogorielov, M. V., Loboda, A. N., Nedkova-Kolarova, V. N., & Bozhinova, A. N. (2014). Trace Element Status (Iron, Zinc, Copper, Chromium, Cobalt, and Nickel) in Iron-Deficiency Anaemia of Children under 3 Years. *Anemia*, 718089.
- Anggono, V., & Robinson, P. J. (2007). Syndapin I and endophilin I bind overlapping proline-rich regions of dynamin I: role in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurochem*, 120(3), 931–943.
- Aoyagi, M., Arvai, A. S., Tainer, J. A., & Getzoff, E. D. (2003). Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *EMBO J*, 22(4), 766–775.
- Arachea, B. T., Sun, Z., Potente, N., Malik, R., Isailovic, D., & Viola, R. E. (2012). Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins. *Protein Expr Purif*, 86(1), 12–20.
- Arkhipova, V., Guskov, A., & Slotboom, D. J. (2017). Analysis of the quality of crystallographic data and the limitations of structural models. *J Gen Physiol*, 149(12), 1091–1103.
- Arleth, L., Vestergaard Jensen, G., Huda, P., Skou, S., Shang, W., & Chakravarthy, S. (2017). Combined SAXS and microfluidics for time-resolved structural studies of biomolecules. *Acta Crystallogr A*, 73(a2), C609–C609.
- Arnold, F. H. (1991). Metal-Affinity Separations: A New Dimension in Protein Processing. *Biotechnology*, 9(2), 151–156.
- Arnold, M. G., Adhikari, P., Kang, B., & Xu, H. (2017). Munc18a clusters SNARE-bearing liposomes prior to trans-SNARE zippering. *Biochem J*, 474(19), 3339–3354.
- Arpino, G., Somasundaram, A., Shin, W., Ge, L., Villareal, S., Chan, C. Y., Ashery, U., Shupliakov, O., Taraska, J. W., & Wu, L. G. (2022). Clathrin-mediated endocytosis cooperates with bulk endocytosis to generate vesicles. *Science*, 25(2).
- Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N., Rettig, J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J*, 19(14), 3586–3596.
- Atlas, D. (2013). The Voltage-Gated Calcium Channel Functions as the Molecular Switch of Synaptic Transmission. *Annu Rev Biochem*, 82, 607–635.
- Bagur, R., & Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell*, 66(6), 780–788.
- Baker, J. A., Wong, W. C., Eisenhaber, B., Warwicker, J., & Eisenhaber, F. (2017). Charged residues next to transmembrane regions revisited: ‘Positive-inside rule’ is complemented by the ‘negative inside depletion/outside enrichment rule’. *BMC Biology*, 15(1), 66.

- Bannas, P., Hambach, J., & Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front Immunol*, 8(1603).
- Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., & Leslie, A. G. W. (2011). iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D*, 67(4), 271–281.
- Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V., & Sligar, S. G. (2002). Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett*, 2(8), 853–856.
- Bazzone, A., Tesmer, L., Kurt, D., Kaback, H. R., Fendler, K., & Madej, M. G. (2022). Investigation of sugar binding kinetics of the E. coli sugar/H<sup>+</sup> symporter Xyle using solid-supported membrane-based electrophysiology. *J Biol Chem*, 298(2), 101505.
- Benita, Y. (2003). Regionalized GC content of template DNA as a predictor of PCR success. *Nucleic Acids Res*, 31(16), e99.
- Benvenuti, M., & Mangani, S. (2007). Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. *Nat Protoc*, 2(7), 1633–1651.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2006). *Stryer Biochemie* (6. Auflage). Springer Berlin Heidelberg.
- Bergendahl, L. T., & Marsh, J. A. (2017). Functional determinants of protein assembly into homomeric complexes. *Sci Rep*, 7(1), 4932.
- Bernadó, P. (2010). Effect of interdomain dynamics on the structure determination of modular proteins by small-angle scattering. *Eur Biophys J*, 39(5), 769–780.
- Bernsel, A., Viklund, H., Falk, J., Lindahl, E., Von Heijne, G., & Elofsson, A. (2008). Prediction of membrane-protein topology from first principles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(20), 7177–7181.
- Bertero, M. G., Rothery, R. A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J. H., & Strynadka, N. C. J. (2003). Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat Struct Mol Biol*, 10(9), 681–687.
- Besl, P., & McKay, N. (1992). A method for Registration of 3-D shapes. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 14(2), 239–256.
- Billen, B., Brams, M., Debaveye, S., Remeeva, A., Alpizar, Y. A., Waelkens, E., Kreir, M., Brüggemann, A., Talavera, K., Nilius, B., Voets, T., & Ulens, C. (2015). Different ligands of the TRPV3 cation channel cause distinct conformational changes as revealed by intrinsic tryptophan fluorescence quenching. *J Biol Chem*, 290(20), 12964–12974.
- Blommel, P. G., Becker, K. J., Duvnjak, P., & Fox, B. G. (2007). Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition. *Biotechnol Prog*, 23(3), 585–598.
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N. K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R. E., Bell, A. W., Bergeron, J. J., & McPherson, P. S. (2004). Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(11), 3833–3838.
- Bokhovchuk, F. M., Bate, N., Kovalevskaya, N. v., Goult, B. T., Spronk, C. A. E. M., & Vuister, G. W. (2018). The Structural Basis of Calcium-Dependent Inactivation of the Transient Receptor Potential Vanilloid 5 Channel. *Biochemistry*, 57(18), 2623–2635.
- Boyce, K., Sivers, F., Higgins, D. G. (2014). Simple chained guide trees give high-quality protein multiple sequence alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(29), 10556–61.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239–259.
- Bragg, W. H., & Bragg, W. L. (1913). The Reflection of X-rays by Crystals.
- Bravais, A. (1897). Abhandlung über die Systeme von regelmäßig auf einer Ebene oder im Raum verteilten Punkten. W. Engelmann.

- Brenner, S., & Horne, R. W. (1959). A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta*, 34(C), 103–110.
- Brennich, M. E., Kieffer, J., Bonamis, G., De Maria Antolinos, A., Hutin, S., Pernot, P., & Round, A. (2016). Online data analysis at the ESRF bioSAXS beamline, BM29. *J Appl Crystallogr*, 49, 203–212.
- Brennich, M. E., Round, A. R., & Hutin, S. (2017). Online Size-exclusion and Ion-exchange Chromatography on a SAXS Beamline. *J Vis Exp*, 2017(119), e54861.
- Breyton, C., Javed, W., Vermot, A., Arnaud, C. A., Hajjar, C., Dupuy, J., Petit-Hartlein, I., Le Roy, A., Martel, A., Thépaut, M., Orelle, C., Jault, J. M., Fieschi, F., Porcar, L., & Ebel, C. (2019). Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1861(5), 939–957.
- Brown, N. P., Leroy, C., & Sander, C. (1998). MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer. *Bioinformatics*, 14(4), 380–381.
- Brunger, A. T., Choi, U. B., Lai, Y., Leitz, J., White, K. I., & Zhou, Q. (2019). The pre-synaptic fusion machinery. *Curr Opin Struct Biol*, 54, 179–188.
- Bu, Z., & Engelman, D. M. (1999). A method for determining transmembrane helix association and orientation in detergent micelles using small angle x-ray scattering. *Biophys J*, 77(2), 1064–1073.
- Burkhardt, P., Hattendorf, D. A., Weis, W. I., & Fasshauer, D. (2008). Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide. *EMBO J*, 27(7), 923–933.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., & Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif*, 43(1), 1–9.
- Caffrey, M. (2015). A comprehensive review of the lipid cubic phase or in meso method for crystallizing membrane and soluble proteins and complexes. *Acta Crystallogr F*, 71(Pt 1), 3–18.
- Cano, R., & Tabares, L. (2016). The active and periaxial zone organization and the functional properties of small and large synapses. *Front Synaptic Neurosci*, 8(12).
- Cao, C., Zakharian, E., Borbiri, I., & Rohacs, T. (2013). Interplay between calmodulin and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ca<sup>2+</sup>-induced inactivation of transient receptor potential vanilloid 6 channels. *J Biol Chem*, 288(8), 5278–5290.
- Carbone, E., & Swandulla, D. (1989). Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. *Prog Biophys Mol Biol*, 54(1), 31–58.
- Casas-Tinto, S., Torres, M., & Moreno, E. (2011). The flower code and cancer development. *Clin Transl Oncol*, 13(1), 5–9.
- Casey, J. R., Grinstein, S., & Orlowski, J. (2009). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(1), 50–61.
- Cha, S. K., Jabbar, W., Xie, J., & Huang, C. L. (2007). Regulation of TRPV5 single-channel activity by intracellular pH. *J Membr Biol*, 220(1–3), 79–85.
- Chae, P. S., Rasmussen, S. G. F., Rana, R. R., Gotfryd, K., Chandra, R., Goren, M. A., Kruse, A. C., Nurva, S., Loland, C. J., Pierre, Y., Drew, D., Popot, J. L., Picot, D., Fox, B. G., Guan, L., Gether, U., Byrne, B., Kobilka, B., & Gellman, S. H. (2010). Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods*, 7(12), 1003–1008.
- Chanaday, N. L., Cousin, M. A., Milosevic, I., Watanabe, X. S., Jennifer, X., & Morgan, R. (2019). The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms. *J Neurosci*, 39(42), 8209–8216.
- Chang, H. F., Mannebach, S., Beck, A., Ravichandran, K., Krause, E., Frohnweiler, K., Fecher-Trost, C., Schirra, C., Pattu, V., Flockerzi, V., & Rettig, J. (2018). Cytotoxic granule endocytosis depends on the Flower protein. *J Cell Biol*, 217(2), 667–683.

- Charvolin, D., Picard, M., Huang, L. S., Berry, E. A., & Popot, J. L. (2014). Solution Behavior and Crystallization of Cytochrome bc 1 in the Presence of Amphipols. *J Membr Biol*, 247(9–10), 981–996.
- Chayen, N. E., & Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Methods*, 5(2), 147–153.
- Chen, L., Wang, F., Wang, X., & Liu, Y. G. (2013). Robust one-tube  $\Omega$ -PCR strategy accelerates precise sequence modification of plasmids for functional genomics. *Plant Cell Physiol*, 54(4), 634–642.
- Chen, P., Bornhorst, J., & Aschner, M. (2018). Manganese metabolism in humans. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 23(9), 4665.
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96(6), 1411–1420.
- Chin, D., & Means, A. R. (2000). Calmodulin- a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*.
- Choi, S., Liu, X., & Pan, Z. (2018). Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin*, 39(7), 1120–1132.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., & Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, 2(6), 387–396.
- Clayton, E. L., Anggono, V., Smillie, K. J., Chau, N., Robinson, P. J., & Cousin, M. A. (2009). The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci*, 29(24), 7706–7717.
- Clayton, E. L., & Cousin, M. A. (2009). The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem*, 111(4), 901–914.
- Clayton, E. L., Evans, G. J. O., & Cousin, M. A. (2008). Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J Neurosci*, 28(26), 6627–6632.
- Coelho, D. S., & Moreno, E. (2019). Emerging links between cell competition and Alzheimer's disease. *J Cell Sci*, 132(13).
- Coelho, D. S., & Moreno, E. (2020). Neuronal Selection Based on Relative Fitness Comparison Detects and Eliminates Amyloid- $\beta$ -Induced Hyperactive Neurons in *Drosophila*. *iScience*, 23(9).
- Coelho, D. S., Schwartz, S., Merino, M. M., Hauert, B., Topfel, B., Tieche, C., Rhiner, C., & Moreno, E. (2018). Culling Less Fit Neurons Protects against Amyloid- $\beta$ -Induced Brain Damage and Cognitive and Motor Decline. *Cell Rep*, 25(13), 3661–3673.
- Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I. S., & Tainer, J. A. (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell*, 63(5), 1061–1072.
- Cook, B. L., Steuerwald, D., Kaiser, L., Graveland-Bikker, J., Vanberghem, M., Berke, A. P., Herlihy, K., Pick, H., Vogel, H., & Zhang, S. (2009). Large-scale production and study of a synthetic G protein-coupled receptor: Human olfactory receptor 17-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(29), 11925–11930.
- Cox, M. J., & Weber, P. C. (1988). An investigation of protein crystallization parameters using successive automated grid searches (SAGS). *J Cryst Growth*, 90(1–3), 318–324.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., & Elofsson, A. (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng*, 10(6), 673–676.
- Cuff, J. A., & Barton, G. J. (2000). Application of Multiple Sequence Alignment Profiles to Improve Protein Secondary Structure Prediction. *Proteins*, 40(3), 502–511.
- Da Vela, S., & Svergun, D. I. (2020). Graphical Review Methods, development and applications of small-angle X-ray scattering to characterize biological macromolecules in solution. *Current Res Struct Biol*, 2, 164–170.



- Dang, S., Feng, S., Tien, J., Peters, C. J., Bulkley, D., Lolicato, M., Zhao, J., Zuberbühler, K., Ye, W., Qi, L., Chen, T., Craik, C. S., Nung Jan, Y., Minor Jr, D. L., Cheng, Y., & Yeh Jan, L. (2017). Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Nature*, 552, 426–429.
- Dang, S., Van Goor, M. K., Asarnow, D., Wang, Y. Q., Julius, D., Cheng, Y., & van der Wijk, J. (2019). Structural insight into TRPV5 channel function and modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(18), 8869–8878.
- Danielczak, B., Meister, A., & Keller, S. (2019). Influence of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on nanodisc formation by diisobutylene/maleic acid (DIBMA) copolymer. *Chem Phys Lipids*, 221, 30–38.
- De Carlo, S., & Robin Harris, J. (2011). Negative staining and Cryo-negative Staining of Macromolecules and Viruses for TEM. *Micron*, 42(2), 117–131.
- De Maria Antolinos, A., Pernot, P., Brennich, M. E., Kieffer, J., Bowler, M. W., Delageniere, S., Ohlsson, S., Malbet Monaco, S., Ashton, A., Franke, D., Svergun, D., Mcsweeney, S., Gordon, E., & Round, A. (2015). ISPyB for BioSAXS, the gateway to user autonomy in solution scattering experiments. *Acta Crystallogr D*, 71, 76–85.
- De Sanctis, D., Beteva, A., Caserotto, H., Dobias, F., Gabadinho, J., Giraud, T., Gobbo, A., Guijarro, M., Lentini, M., Lavault, B., Mairs, T., McSweeney, S., Petitdemange, S., Rey-Bakaikoa, V., Surr, J., Thevenneau, P., Leonard, G. A., & Mueller-Dieckmann, C. (2012). ID29: a high-intensity highly automated ESRF beamline for macromolecular crystallography experiments exploiting anomalous scattering. *J Synchrotron Rad*, 19(3), 455–461.
- Deacon, S. E., J Roach, P. C., Postis, V. L., A Wright, G. S., Xia, X., V Phillips, S. E., Paul Knox, J., F Henderson, P. J., McPherson, M. J., Baldwin, S. A., & Mcpherson, M. J. (2008). Reliable scale-up of membrane protein over-expression by bacterial auto-induction: From microwell plates to pilot scale fermentations. *Mol Membr Biol*, 25(8), 588–598.
- Delmar, J. A., Bolla, J. R., Su, C. C., & Yu, E. W. (2015). Crystallization of membrane proteins by vapor diffusion. *Methods Enzymol*, 557, 363–392.
- Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A., & Sligar, S. G. (2004). Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J Am Chem Soc*, 126(11), 3477–3487.
- Desjardins, P., Hansen, J. B., & Allen, M. (2010). Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *J Vis Exp*, 33, 1610.
- Dey, S., Ritchie, D. W., & Levy, E. D. (2017). PDB-wide identification of biological assemblies from conserved quaternary structure geometry. *Nat Methods*, 15(1), 67–72.
- Dickman, D. K., Lu, Z., Meinertzhagen, I. A., & Schwarz, T. L. (2006). Altered synaptic development and active zone spacing in endocytosis mutants. *Curr Biol*, 16(6), 591–598.
- Doherty, A. H., Ghalambor, C. K., & Donahue, S. W. (2015). Evolutionary physiology of bone: Bone metabolism in changing environments. *Physiology*, 30(1), 17–29.
- Dokmanić, I., Šikić, M., & Tomić, S. (2008). Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination. *Acta Crystallogr D*, 64(Pt 3), 257–263.
- Drenth, J. (2012). Introduction to basic crystallography. *International Tables for Crystallography*, 2(1), 45–63.
- Einarson, M. B., Pugacheva, E. N., & Orlinick, J. R. (2007). GST Pull-down. *CSH Protocols*, 2007.
- Elofsson, A., & Von Heijne, G. (2007). Membrane protein structure: prediction versus reality. *Annu Rev Biochem*, 76, 125–140.
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D*, 60, 2126–2132.

- Erikson, K. M., Syversen, T., Aschner, J. L., & Aschner, M. (2005). Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environ Toxicol Pharmacol*, 19(3), 415–421.
- Eshaghi, S., Hedrén, M., Nasser, M., Hammarberg, T., Thornell, A., & Nordlund, P. (2005). An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins. *Protein Sci*, 14(3), 676–683.
- Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D*, 62(1), 72–82.
- Evans, P. R. (2011). An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D*, 67(4), 282–292.
- Evans, P. R., & Murshudov, G. N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D*, 69(7), 1204–1214.
- Faham, S., & Bowie, J. U. (2002). Bicelle crystallization: A new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J Mol Biol*, 316(1), 1–6.
- Fekete, S., Kizekai, L., Sarisozen, Y. T., Lawrence, N., Shiner, S., & Lauber, M. (2022). Investigating the secondary interactions of packing materials for size-exclusion chromatography of therapeutic proteins. *J Chromatogr A*, 1676, 463262.
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F., & Meldolesi, J. (1994). Neurotransmitter release: fusion or ‘kiss-and-run’? *Trends Cell Biol*, 4(1), 1–4.
- Fischer, H., De Oliveira Neto, M., Napolitano, H. B., Polikarpov, I., & Craievich, A. F. (2010). Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *J Appl Crystallogr*, 43(1), 101–109.
- Flot, D., Mairs, T., Giraud, T., Guijarro, M., Lesourd, M., Rey, V., Van Brussel, D., Morawe, C., Borel, C., Hignette, O., Chavanne, J., Nurizzo, D., McSweeney, S., & Mitchell, E. (2010). The ID23-2 structural biology microfocus beamline at the ESRF. *J Synchrotron Rad*, 17(1), 107–118.
- Fluck, E. C., Yazici, A. T., Rohacs, T., & Moiseenkova-Bell, V. Y. (2022). Structural basis of TRPV5 regulation by physiological and pathophysiological modulators. *Cell Rep*, 39(4), 110737.
- Forsberg, M., Seth, H., Björefeldt, A., Lyckenvik, T., Andersson, M., Wasling, P., Zetterberg, H., & Hanse, E. (2019). Ionized calcium in human cerebrospinal fluid and its influence on intrinsic and synaptic excitability of hippocampal pyramidal neurons in the rat. *J Neurochem*, 149(4), 452–470.
- Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., Mertens, H. D. T., Kikhney, A. G., Hajizadeh, N. R., Franklin, J. M., Jeffries, C. M., & Svergun, D. I. (2017). ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J Appl Crystallogr*, 50, 1212–1225.
- Franke, D., & Svergun, D. I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr*, 42(2), 342–346.
- Franklin, R. B., & Costello, L. C. (2009). The Important Role of the Apoptotic Effects of Zinc in the Development of Cancers. *J Cell Biochem*, 106(5), 750.
- Fromm, M., Piontek, J., Rosenthal, R., Günzel, D., & Krug, S. M. (2017). Tight junctions of the proximal tubule and their channel proteins. *Pflugers Arch*, 469(7–8), 877–887.
- Fukuda, J., & Kawa, K. (1977). Permeation of manganese, cadmium, zinc, and beryllium through calcium channels of an insect muscle membrane. *Science*, 196(4287), 309–311.
- Gabadinho, J., Beteva, A., Guijarro, M., Rey-Bakaikoa, V., Spruce, D., Bowler, M. W., Brockhauser, S., Flot, D., Gordon, E. J., Hall, D. R., Lavault, B., McCarthy, A. A., McCarthy, J., Mitchell, E., Monaco, S., Mueller-Dieckmann, C., Nurizzo, D., Ravelli, R. B. G., Thibault, X., ... McSweeney, S. M. (2010). MxCuBE: A synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments. *J Synchrotron Rad*, 17(5), 700–707.

- Gaber, A., & Pavšič, M. (2021). Molecular Sciences Modeling and Structure Determination of Homo-Oligomeric Proteins: An Overview of Challenges and Current Approaches. *Int J Mol Sci*, 22, 9081.
- Gad, H., Löw, P., Zotova, E., Brodin, L., & Shupliakov, O. (1998). Dissociation between Ca<sup>2+</sup>-triggered synaptic vesicle exocytosis and clathrin-mediated endocytosis at a central synapse. *Neuron*, 21(3), 607–616.
- Gallagher, S. R. (2006). One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Curr Protoc Protein Sci*, 75(1).
- Gan, Q., & Watanabe, S. (2018). Synaptic Vesicle Endocytosis in Different Model Systems. *Front. Cell. Neurosci*, 12(171), 171.
- Gao, Q., Wu, G., & Lai, K. W. C. (2020). Cholesterol Modulates the Formation of the A $\beta$  Ion Channel in Lipid Bilayers. *Biochemistry*, 59(8), 992–998.
- Gao, Y., Zorman, S., Gundersen, G., Xi, Z., Ma, L., Sirinakis, G., Rothman, J. E., & Zhang, Y. (2012). Single reconstituted neuronal SNARE complexes zipper in three distinct stages. *Science*, 337(6100), 1340–1343.
- Garavito, R. M., & Ferguson-Miller, S. (2001). Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *J Biol Chem*, 276(35), 32403–32406.
- Garman, E. E., & Mitchell, E. P. (1996). Glycerol concentrations required for cryoprotection of 50 typical protein crystallization solutions. *J Appl Crystallogr*, 29, 584–587.
- Garman, E. F., & Owen, R. L. (2006). Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D*, 62(1), 32–47.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3784–3788.
- Geertsma, E. R., Groeneveld, M., Slotboom, D. J., & Poolman, B. (2008). Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(15), 5722–5727.
- Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., & Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: A hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem*, 391(1), 391–403.
- Ghamghami, E., Abri Aghdam, M., Reza Tohidkia, M., AhmadiKhah, A., Khanmohammadi, M., Mehdipour, T., Mokhtarzadeh, A., & Baradaran, B. (2020). Optimization of Tris/EDTA/Sucrose (TES) periplasmic extraction for the recovery of functional scFv antibodies. *AMB Express*, 10(1), 129.
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1998). Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. *J Phys Chem A*, 102(21), 3762–3772.
- Gill, S. C., & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182(2), 319–326.
- Gimpl, K., Klement, J., & Keller, S. (2016). Characterising protein/detergent complexes by triple-detection size-exclusion chromatography. *Biol Proced Online*, 18(4).
- Ginalski, K., Elofsson, A., Fischer, D., & Rychlewski, L. (2003). 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics*, 19(8), 1015–1018.
- Giusti, F., Rieger, J., Catoire, L. J., Qian, S., Calabrese, A. N., Watkinson, T. G., Casiraghi, M., Radford, S. E., Ashcroft, A. E., & Popot, J. L. (2014). Synthesis, Characterization and Applications of a Perdeuterated Amphipol. *J Membr Biol*, 247(9–10), 909–924.
- Glatter, O., & Kratky, O. (1985). Small angle x-ray scattering. *Acta Polymerica*, 36(5), 296–296.
- Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2018). UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci*, 27(1), 14–25.

- Gohon, Y., Giusti, F., Prata, C., Charvolin, D., Timmins, P., Ebel, C., Tribet, C., & Popot, J.-L. (2006). Well-Defined Nanoparticles Formed by Hydrophobic Assembly of a Short and Polydisperse Random Terpolymer, Amphipol A8-35. *Langmuir*, 22(3), 1281–1290.
- Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2000). Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 105–153.
- Gopalakrishna, R., & Anderson, W. B. (1982). Ca<sup>2+</sup>-induced hydrophobic site on calmodulin: Application for purification of calmodulin by phenyl-Sepharose affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun*, 104(2), 830–836.
- Gordon-Shaag, A., Zagotta, W. N., & Gordon, S. E. (2008). Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization in TRP channels. *Channels (Austin)*, 2(2), 125–129.
- Gormal, R. S., Nguyen, T. H., Martin, S., Papadopoulos, A., & Meunier, F. A. (2015). An actomyosin II constricting ring initiates the fission of activity-dependent bulk endosomes in neurosecretory cells. *J Neurosci*, 35(4), 1380–1389.
- Gourdon, P., Lauwring Andersen, J., Langmach Hein, K., Bublit, M., Panyella Pedersen, B., Liu, X.-Y., Yatime, L., Nyblom, M., Terndrup Nielsen, T., Olesen, C., Vuust Møller, J., Nissen, P., & Preben Morth, J. (2011). HiLiDe-Systematic Approach to Membrane Protein Crystallization in Lipid and Detergent. *Cryst Growth Des*, 11, 2098–2106.
- Grabarek, Z. (2006). Structural Basis for Diversity of the EF-hand Calcium-binding Proteins. *J Mol Biol*, 359(3), 509–525.
- Gregory, D. S., Martin, A. C. R., Cheetham, J. C., & Rees, A. R. (1993). The prediction and characterization of metal binding sites in proteins. *Protein Eng*, 6(1), 29–35.
- Griessmeier, K., Cuny, H., Rötzer, K., Griesbeck, O., Harz, H., Biel, M., & Wahl-Schott, C. (2009). Calmodulin is a functional regulator of Cav1.4 L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem*, 284(43), 29809–29816.
- Grobelny, S., Erlkamp, M., Möller, J., Tolan, M., & Winter, R. (2014). Intermolecular interactions in highly concentrated protein solutions upon compression and the role of the solvent. *J Chem Phys*, 141(22), 22D506.
- Groot, T. de, Kovalevskaya, N. V., Verkaart, S., Schilderink, N., Felici, M., Hagen, E. A. E. van der, Bindels, R. J. M., Vuister, G. W., & Hoenderop, J. G. (2011). Molecular Mechanisms of Calmodulin Action on TRPV5 and Modulation by Parathyroid Hormone. *Mol Cell Biol*, 31(14), 2845.
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30 Suppl 1, S162-73.
- Guinier, A., & Fournet, G. (1955). Small angle scattering of X-rays. In *Physics Today* (Vol. 9).
- Guo, J., Zeng, W., Chen, Q., Lee, C., Chen, L., Yang, Y., Cang, C., Ren, D., & Jiang, Y. (2016). Structure of the voltage-gated two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 531, 196–201.
- Güssow, D., & Clackson, T. (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 17(10), 4000.
- Hains, P. G., & Robinson, P. J. (2017). The Impact of Commonly Used Alkylating Agents on Artifactual Peptide Modification. *J Proteome Res*, 16(9), 3443–3447.
- Hall, S. C. L., Tognoloni, C., Charlton, J., Bragginton, É. C., Rothnie, A. J., Sridhar, P., Wheatley, M., Knowles, T. J., Arnold, T., Edler, K. J., & Dafforn, T. R. (2018). An acid-compatible co-polymer for the solubilization of membranes and proteins into lipid bilayer-containing nanoparticles. *Nanoscale*, 10(22), 10609–10619.
- Halling, D. B., Aracena-Parks, P., & Hamilton, S. L. (2006). Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels by Calmodulin. *Sci STKE*, 2006(318).
- Hammel, M. (2012). Validation of macromolecular flexibility in solution by small-angle X-ray scattering (SAXS). *Eur Biophys J*, 41(10), 789–799.

- Han, G. A., Malintan, N. T., Saw, N. M. N., Li, L., Han, L., Meunier, F. A., Collins, B. M., & Sugita, S. (2011). Munc18-1 domain-1 controls vesicle docking and secretion by interacting with syntaxin-1 and chaperoning it to the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 22(21), 4134–4149.
- Hancock, R. D., Siddons, C. J., Oscarson, K. A., & Reibenspies, J. M. (2004). The structure of the 11-coordinate barium complex of the pendant-donor macrocycle 1,4,7,10-tetrakis(carbamoylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane: an analysis of the coordination numbers of barium(II) in its complexes. *Inorg Chim Acta*, 357(3), 723–727.
- Harguindeguy, S., Stanciu, D., Devesa, J., Alfarouk, K., Cardone, R. A., Polo Orozco, J. D., Devesa, P., Rauch, C., Orive, G., Anitua, E., Roger, S., & Reshkin, S. J. (2017). Cellular acidification as a new approach to cancer treatment and to the understanding and therapeutics of neurodegenerative diseases. *Semin Cancer Biol*, 43, 157–179.
- Haucke, V., Neher, E., & Sigrist, S. J. (2011). Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci*, 12(3), 127–138.
- Hayashi, M., Raimondi, A., O'toole, E., Paradise, S., Collesi, C., Cremona, O., Ferguson, S. M., & De Camilli, P. (2008). Cell-and stimulus-dependent heterogeneity of synaptic vesicle endocytic recycling mechanisms revealed by studies of dynamin 1-null neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(6), 2175–2180.
- Hayashi, N., Matsubara, M., Takasaki, A., Titani, K., & Taniguchi, H. (1998). An Expression System of Rat Calmodulin Using T7 Phage Promoter in Escherichia coli. *Protein Expr Purif*, 12(1), 25–28.
- Hayashi, Y., Matsui, H., & Takagi, T. (1989). Membrane protein molecular weight determined by low-angle laser light-scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography. *Methods Enzymol*, 172, 514–528.
- He, Y., Gao, Z., Zhang, T., Sun, J., Ma, Y., Tian, N., & Gong, J. (2020). Seeding Techniques and Optimization of Solution Crystallization Processes. *Org Process Res Dev*, 24(10), 1839–1849.
- Heerssen, H., Fetter, R. D., & Davis, G. W. (2008). Clathrin Dependence of Synaptic-Vesicle Formation at the Drosophila Neuromuscular Junction. *Curr Biol*, 18(6), 401–409.
- Heldman, E., Levine, M., Raveh, L., & Pollard, H. B. (1989). Barium ions enter chromaffin cells via voltage-dependent calcium channels and induce secretion by a mechanism independent of calcium. *J Biol Chem*, 264(14), 7914–7920.
- Henderson, R. (1990). Cryo-protection of protein crystals against radiation damage in electron and X-ray diffraction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 241(1300), 6–8.
- Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., & McMahon, H. T. (2010). FCHo proteins are nucleators of Clathrin-Mediated endocytosis. *Science*, 328(5983), 1281–1284.
- Hering, S., Zangerl-Plessl, E. M., Beyl, S., Hohaus, A., Andranovits, S., & Timin, E. N. (2018). Calcium channel gating. *Pflugers Arch*, 470(9), 1291–1309.
- Heuberger, E. H. M. L., Veenhoff, L. M., Duurkens, R. H., Friesen, R. H. E., & Poolman, B. (2002). Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J Mol Biol*, 317(4), 591–600.
- Heukeshoven, J., & Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6(3), 103–112.
- Heuser, J. E., & Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 57(2), 315–344.
- Hille, B., Dickson, E. J., Kruse, M., Vivas, O., & Suh, B.-C. (2015). Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochim Biophys Acta*, 1851(6), 844–856.
- Hillen, H. (2019). The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 13, 1154.

- Hoenderop, J. G. J., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., & Bindels, R. J. M. (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J*, 22(4), 776–785.
- Hofmann, K., & Stoffel, W. (1993). TMbase-a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem*, 374, 166.
- Höning, S., Ricotta, D., Krauss, M., Späte, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V., & Owen, D. J. (2005). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell*, 18(5), 519–531.
- Huang, C. L., Feng, S., & Hilgemann, D. W. (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*, 391(6669), 803–806.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497–506.
- Hughes, T. E. T., Pumroy, R. A., Yazici, A. T., Kasimova, M. A., Fluck, E. C., Huynh, K. W., Samanta, A., Molugu, S. K., Zhou, Z. H., Carnevale, V., Rohacs, T., & Moiseenkova-Bell, V. Y. (2018). Structural insights on TRPV5 gating by endogenous modulators. *Nat Commun*, 9(1), 4198.
- Huynh, K. W., Cohen, M. R., Jiang, J., Samanta, A., Lodowski, D. T., Zhou, Z. H., & Moiseenkova-Bell, V. Y. (2016). Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM. *Nat Commun*, 7, 11130.
- Inada, T., Kimata, K., & Aiba, H. (1996). Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: Challenge to the cAMP model. *Genes Cells*, 1(3), 293–301.
- Incardona, M. F., Bourenkov, G. P., Levik, K., Pieritz, R. A., Popov, A. N., & Svensson, O. (2009). EDNA: A framework for plugin-based applications applied to X-ray experiment online data analysis. *J Synchrotron Rad*, 16(6), 872–879.
- Inglebert, Y., Aljadeff, J., Brunel, N., & Debanne, D. (2020). Synaptic plasticity rules with physiological calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(52), 33639–33648.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28.
- Inoue, K., O'Bryant, Z., & Xiong, Z.-G. (2015). Zinc-permeable ion channels: effects on intracellular zinc dynamics and potential physiological/pathophysiological significance. *Curr Opin Struct Biol*, 22(10), 1248–1257.
- Itoh, T., & De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta*, 1761(8), 897–912.
- Ivanović, M. T., Hermann, M. R., Wójcik, M., Pérez, J., & Hub, J. S. (2020). Small-Angle X-ray Scattering Curves of Detergent Micelles: Effects of Asymmetry, Shape Fluctuations, Disorder, and Atomic Details. *J Phys Chem Lett*, 11(3), 945–951.
- Jacques, D. A., & Trewella, J. (2010). Small-angle scattering for structural biology-Expanding the frontier while avoiding the pitfalls. *Protein Sci*, 19(4), 642–657.
- Jadot, M., Canfield, W. M., Gregory, W., & Kornfeld, S. (1992). Characterization of the Signal for Rapid Internalization of the Bovine Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor41 Receptor. *J Biol Chem*, 267(16), 11069–11077.
- Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), 201–207.
- Janmey, P. A., Bucki, R., & Radhakrishnan, R. (2018). Regulation of actin assembly by PI(4,5)P2 and other inositol phospholipids: An update on possible mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, 506(2), 307–314.

- Jaroszewski, L. (2009). Protein structure prediction based on sequence similarity. *Methods Mol Biol*, 569, 129–156.
- Jin, Y.-H., Wu, X.-S., Shi, B., Zhang, Z., Guo, X., Gan, X. L., Chen, Z., & Wu, L.-G. (2019). Protein Kinase C and Calmodulin Serve As Calcium Sensors for Calcium-Stimulated Endocytosis at Synapses. *J Neurosci*, 39(48), 9478–9490.
- Jing, Z., Liu, C., Qi, R., & Ren, P. (2018). Many-body effect determines the selectivity for  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(32), E7495–E7501.
- Johnston, L. A. (2014). Socializing with MYC: Cell Competition in Development and as a Model for Premalignant Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(4), 14274.
- Jones, A. J. Y., Gabriel, F., Tandale, A., & Nietlispach, D. (2020). Structure and Dynamics of GPCRs in Lipid Membranes: Physical Principles and Experimental Approaches. *Molecules*, 25(20), 4729.
- Jones, D. T. (2007). Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, 23(5), 538–544.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1994). A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry*, 33(10), 3038–3049.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
- Kabsch, W. (2010). Biological Crystallography. *Acta Crystallogr D*, 66, 125–132.
- Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(5), 313–326.
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2005). An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. *Bioinformatics*, 21, 251–257.
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Res*, 35, 429–432.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., & Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc*, 7(8), 1511–1522.
- Kamer, K. J., Sancak, Y., Fomina, Y., Meisel, J. D., Chaudhuri, D., Grabarek, Z., & Mootha, V. K. (2018). MICU1 imparts the mitochondrial uniporter with the ability to discriminate between  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(34), 7960–7969.
- Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 6(5), 494–500.
- Kang, H. J., Lee, C., & Drew, D. (2013). Breaking the barriers in membrane protein crystallography. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(3), 636–644.
- Karplus, P. A., & Diederichs, K. (2015). Assessing and maximizing data quality in macromolecular crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, 34, 60–68.
- Kefala, G., Ahn, C., Krupa, M., Esquivies, L., Maslennikov, I., Kwiatkowski, W., & Choe, S. (2010). Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12. *Protein Sci*, 19(5), 1117–1125.
- Kelly, B. T., Graham, S. C., Liska, N., Dannhauser, P. N., Höning, S., Ungewickell, E. J., & Owen, D. J. (2014). AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science*, 345(6195), 459.
- Kesidis, A., Depping, P., Lodé, A., Vaitopoulou, A., Bill, R. M., Goddard, A. D., & Rothnie, A. J. (2020). Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts. *Methods*, 180, 3–18.

- Kikhney, A. G., & Svergun, D. I. (2015). A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett*, 589(19 Pt A), 2570–2577.
- Kinnebrew, M., Hussain, S., Schonenbach, N., & Han, S. (2014). The Effect of Detergent on the Oligomerization of a 7-Transmembrane Protein. *Biophys J*, 106(2), 299a–300a.
- Kirchhausen, T. (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem*, 69, 699–727.
- Kleiger, G., Grothe, R., Mallick, P., & Eisenberg, D. (2002). GXXXG and AXXXA: Common R-Helical Interaction Motifs in Proteins, Particularly in Extremophiles. *Biochemistry*, 41, 5990–5997.
- Klenchin, V. A., & Martin, T. F. J. (2000). Priming in exocytosis: Attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie*, 82(5), 399–407.
- Klingauf, J., Kavalali, E. T., & Tsien, R. W. (1998). Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature*, 394(6693), 581–585.
- Knowles, T. J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y.-P., Dafforn, T., & Overduin, M. (2009). Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer. *J Am Chem Soc*, 131(22), 7484–7485.
- Koh, T. W., Korolchuk, V. I., Wairkar, Y. P., Jiao, W., Evergren, E., Pan, H., Zhou, Y., Venken, K. J. T., Shupliakov, O., Robinson, I. M., O’Kane, C. J., & Bellen, H. J. (2007). Eps15 and Dap160 control synaptic vesicle membrane retrieval and synapse development. *J Cell Biol*, 178(2), 309–322.
- Koide, S. (2009). Engineering of recombinant crystallization chaperones. *Curr Opin Struct Biol*, 19(4), 449–457.
- Kokotos, A. C., Peltier, J., Davenport, E. C., Trost, M., & Cousin, M. A. (2019). Activity-dependent bulk endocytosis proteome reveals a key presynaptic role for the monomeric GTPase Rab11. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(6), 2386–2388.
- Kol, S., Braun, C., Thiel, G., Doyle, D. A., Sundstroem, M., Gourdon, P., & Nissen, P. (2013). Heterologous expression and purification of an active human TRPV3 ion channel. *FEBS J*, 280(23), 6010–6021.
- Kolhe, P., Amend, E., & Singh, S. K. (2010). Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation. *Biotechnol Prog*, 26(3), 727–733.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., & Svergun, D. I. (2003). PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr*, 36(5), 1277–1282.
- Koning, R. I., Vader, H., van Nugteren, M., Grocutt, P. A., Yang, W., Renault, L. L., Koster, A. J., Kamp, A. C., & Schwertner, M. (2022). Automated vitrification of cryo-EM samples with controllable sample thickness using suction and real-time optical inspection. *Nat Commun*, 13(1), 2985.
- Kononenko, N. L., Puchkov, D., Classen, G. A., Walter, A. M., Pechstein, A., Sawade, L., Kaempfer, N., Trimbuch, T., Lorenz, D., Rosenmund, C., Maritzen, T., & Haucke, V. (2014). Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*, 82(5), 981–988.
- Korndorfer, I. P. (2002). Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein Sci*, 11(4), 883–893.
- Kosaka, T., & Ikeda, K. (1983). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J Cell Biol*, 97(2), 499.
- Kotov, V., Bartels, K., Veith, K., Josts, I., Subhramanyam, U. K. T., Günther, C., Labahn, J., Marlovits, T. C., Moraes, I., Tidow, H., Löw, C., & Garcia-Alai, M. M. (2019). High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins. *Sci Rep*, 9(1), 10379.



- Kozin, M. B., & Svergun, D. I. (2001). Automated matching of high-and low-resolution structural models. *J Appl Crystallogr*, 34, 33–41.
- Kraft, T. E., Hresko, R. C., & Hruz, P. W. (2015). Expression, purification, and functional characterization of the insulin-responsive facilitative glucose transporter GLUT4. *Protein Sci*, 24, 2008–2019.
- Krauss, I. R., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *Int J Mol Sci*, 14, 11643–11691.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. (2001). Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *J Mol Biol*, 305(3), 567–580.
- Kubicek, J., Schlesinger, R., Baeken, C., Büldt, G., Schäfer, F., & Labahn, J. (2012). Controlled In Meso Phase Crystallization – A Method for the Structural Investigation of Membrane Proteins. *PLoS One*, 7(4), e35458.
- Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B., & Bax, A. (1995). Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat Struct Mol Biol*, 2(9), 768–776.
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2012). Accelerated coomassie blue staining and destaining of SDS-PAGE gels with application of heat. *Methods Mol Biol*, 869, 471–479.
- Kurokawa, H., Osawa, M., Kurihara, H., Katayama, N., Tokumitsu, H., Swindells, M. B., Kainosho, M., & Ikura, M. (2001). Target-induced conformational adaptation of calmodulin revealed by the crystal structure of a complex with nematode Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase peptide. *J Mol Biol*, 312(1), 59–68.
- Kuromi, H., Honda, A., & Kidokoro, Y. (2004). Ca<sup>2+</sup> Influx through Distinct Routes Controls Exocytosis and Endocytosis at Drosophila Presynaptic Terminals. *Neuron*, 41(1), 101–111.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157(1), 105–132.
- Labro, A. J., & Snyders, D. J. (2012). Being flexible: The voltage-controllable activation gate of Kv channels. *Front Pharmacol*, 3(168).
- Ladd, M., & Palmer, R. (2013). Structure Determination by X-ray Crystallography Analysis by X-rays and Neutrons Fifth Edition.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lafontaine, M. (2017). Das mouse Flower-like-Protein - Produktion, Reinigung und Charakterisierung eines putativen Ionenkanals. Universität des Saarlandes.
- Lancki, D. W., Weiss, A., & Fitch, F. W. (1987). Requirements for triggering of lysis by cytolytic T lymphocyte clones. *J Immunol*, 138(11), 3646–3653.
- Landau, E. M., & Rosenbusch, J. P. (1996). Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25), 14532.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*, 26(2), 283–291.
- Lau, S. Y., Procko, E., & Gaudet, R. (2012). Distinct properties of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *J Gen Physiol*, 140(5), 541–555.
- Le Maire, M., Champeil, P., & Møller, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta*, 1508(1–2), 86–111.
- Le Pecq, J. B., & Paoletti, C. (1966). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem*, 17(1), 100–107.
- Lee, A. G. (2009). The effects of lipids on channel function. *J Biol*, 8(9), 1–3.

- Lee, C.-D., Sun, H.-C., Hu, S.-M., Chiu, C.-F., Homhuan, A., Liang, S.-M., Leng, C.-H., & Wang, T.-F. (2008). An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins. *Protein Sci*, 17(7), 1241–1248.
- Lee, J. Y., Cole, T. B., Palmiter, R. D., Suh, S. W., & Koh, J. Y. (2002). From the Cover: Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7705.
- Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*, 26(52), 7380–7385.
- Leibson, P. J., Midthun, D. E., Windebank, K. P., & Abraham, R. T. (1990). Transmembrane signaling during natural killer cell-mediated cytotoxicity. Regulation by protein kinase C activation. *J Immunol*, 145(5), 1498–1504.
- Leslie, A. G. W. (2006). The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D*, 62(1), 48–57.
- Levitan, I., Singh, D. K., & Rosenhouse-Dantsker, A. (2014). Cholesterol binding to ion channels. *Front Physiol*, 5(65).
- Levy, E. D., & Teichmann, S. (2013). Structural, Evolutionary, and Assembly Principles of Protein Oligomerization. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 117, 25–51.
- Lewis, B. A., & Engelman, D. M. (1983). Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J Mol Biol*, 166(2), 211–217.
- Li, L., & Yang, X. (2018). The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions. *Longevity OMAC*, 2018, 1–11.
- Li, T.-N., Chen, Y.-J., Lu, T.-Y., Wang, Y.-T., Lin, H.-C., Yao, K., Yao, C.-K., & Research Fellow, A. (2020). A positive feedback loop between Flower and PI(4,5)P<sub>2</sub> at periaxial zones controls bulk endocytosis in *Drosophila*. *Elife*, 9(e60125).
- Li, Z., Kessler, W., Van Den Heuvel, J., & Rinas, U. (2011). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Adv Appl Microbiol*, 91(4), 1203–1213.
- Liang, K., Wei, L., & Chen, L. (2017). Exocytosis, endocytosis, and their coupling in excitable cells. *Front Mol Neurosci*, 10(109).
- Liang, Q., Zhengzhi, H., Yuan, Z., & Li, H. (2017). Immobilization of Ulp1 protease on NHS-activated Sepharose: a useful tool for cleavage of the SUMO tag of recombinant proteins. *Biotechnol Lett*, 39, 1025–1031.
- Lilko, E. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0* (Schrodinger, LLC).
- Lin, R. C., & Scheller, R. H. (2000). MECHANISMS OF SYNAPTIC VESICLE EXOCYTOSIS. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 19–49.
- Lipfert, J., Columbus, L., Chu, V. B., Lesley, S. A., & Doniach, S. (2007). Size and shape of detergent micelles determined by small-angle X-ray scattering. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(43), 12427–12438.
- Lolo, F. N., Casas-Tintó, S., & Moreno, E. (2012). Cell Competition Time Line: Winners Kill Losers, which Are Extruded and Engulfed by Hemocytes. *Cell Rep*, 2(3), 526–539.
- Lomize, A. L., Spencer, J., Todd, C., & Pogozheva, I. D. (2021). Spatial arrangement of proteins in planar and curved membranes by PPM 3.0. *Protein Sci*, 31(1), 209–220.
- Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2012). OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res*, 40(D1), D370–D376.
- Lopez, P. J., Marchand, I., Joyce, S. A., & Dreyfus, M. (1999). The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol Microbiol*, 33(1), 188–199.

- López-Hernández, T., Takenaka, K., Mori, Y., Kongpracha, P., Nagamori, S., Haucke, V., & Takamori, S. (2022). Clathrin-independent endocytic retrieval of SV proteins mediated by the clathrin adaptor AP-2 at mammalian central synapses. *Elife*, 11(e71198).
- Lossow, K., Schwarz, M., & Kipp, A. P. (2021). Are trace element concentrations suitable biomarkers for the diagnosis of cancer? *Redox Biol*, 42, 101900.
- Lou, X. (2018). Sensing exocytosis and triggering endocytosis at synapses: Synaptic vesicle exocytosis–endocytosis coupling. *Front Cell Neurosci*, 12(66).
- Lucaciu, C. M., Dragu, C., Copăescu, L., & Morariu, V. V. (1997). Manganese transport through human erythrocyte membranes. An EPR study. *Biochim Biophys Acta*, 1328(2), 90–98.
- Luft, J. R., Wolfley, J. R., Said, M. I., Nagel, R. M., Lauricella, A. M., Smith, J. L., Thayer, M. H., Veatch, C. K., Snell, E. H., Malkowski, M. G., & DeTitta, G. T. (2007). Efficient optimization of crystallization conditions by manipulation of drop volume ratio and temperature. *Protein Sci*, 16(4), 715–722.
- Lyons, J. A., Shahsavar, A., Paulsen, P. A., Pedersen, B. P., & Nissen, P. (2016). Expression strategies for structural studies of eukaryotic membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 38, 137–144.
- Ma, C., Li, W., Xu, Y., & Rizo, J. (2011). Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol*, 18(5), 542–549.
- Ma, J., & Xia, D. (2008). The use of blue native PAGE in the evaluation of membrane protein aggregation states for crystallization. *J Appl Crystallogr*, 41, 1150–1160.
- Ma, J., Yoshimura, M., Yamashita, E., Nakagawa, A., Ito, A., & Tsukihara, T. (2004). Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *J Mol Biol*, 338(1), 103–114.
- Ma, Y., Kubicek, J., & Labahn, J. (2013). Expression and Purification of Functional Human Mu Opioid Receptor from *E. coli*. *PLoS One*, 8(2), e56500.
- Macchi, P. (2011). Cryo-Crystallography: Diffraction at Low Temperature and More. *Top Curr Chem*, 315, 33–67.
- Madan, E., Pelham, C. J., Nagane, M., Parker, T. M., Canas-Marques, R., Fazio, K., Shaik, K., Yuan, Y., Henriques, V., Galzerano, A., Yamashita, T., Pinto, M. A. F., Palma, A. M., Camacho, D., Vieira, A., Soldini, D., Nakshatri, H., Post, S. R., Rhiner, C., ... Moreno, E. (2019). Flower isoforms promote competitive growth in cancer. *Nature*, 572(7768), 260–264.
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res*, 50(W1), W276–W279.
- Madej, M. G. (2015). Comparative Sequence-Function Analysis of the Major Facilitator Superfamily: The ‘Mix-and-Match’ Method. *Methods Enzymol*, 557, 521–549.
- Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., Lokamani, I., Yaoita, E., & Yamamoto, T. (2014). Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics*, 11(1), 16.
- Majeed, S., Ahmad, A. B., Sehar, U., & Georgieva, E. R. (2021). Lipid Membrane Mimetics in Functional and Structural Studies of Integral Membrane Proteins. *Membranes*, 11(9), 685.
- Makino, S., Woolford, J. L., Tanford, C., & Webster, R. E. (1975). Interaction of Deoxycholate and of Detergents with the Coat Protein of Bacteriophage f1. *J Biol Chem*, 250(11), 4327–4332.
- Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D., & Butt, T. R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics*, 5(1–2), 75–86.
- Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., Panjkovich, A., Mertens, H. D. T., Gruzinov, A., Borges, C., Jeffries,

- C. M., Svergun, D. I., & Franke, D. (2021). ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr*, 54(1), 343–355.
- Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X., & Butt, T. R. (2006). Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci*, 15(1), 182–189.
- Marciano, S., Dey, D., Listov, D., Fleishman, S. J., Sonn-Segev, A., Mertens, H., Busch, F., Kim, Y., Harvey, S. R., Wysocki, V. H., & Schreiber, G. (2022). Protein quaternary structures in solution are a mixture of multiple forms. *Chem Sci*, 13(39), 11680–11695.
- Marks, B., Stowell, M. H. B., Vallis, Y., Mills, I. G., Gibson, A., Hopkins, C. R., & McMahon, H. T. (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*, 410(6825), 231–235.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 33(2), 491–497.
- McCarthy, A. A., Barrett, R., Beteva, A., Caserotto, H., Dobias, F., Felisaz, F., Giraud, T., Guijarro, M., Janocha, R., Khadrouche, A., Lentini, M., Leonard, G. A., Lopez Marrero, M., Malbet-Monaco, S., McSweeney, S., Nurizzo, D., Papp, G., Rossi, C., Sinoir, J., ... Mueller-Dieckmann, C. (2018). ID30B - a versatile beamline for macromolecular crystallography experiments at the ESRF. *J Synchrotron Rad*, 25(Pt 4), 1249–1260.
- McDonell, M. W., Simon, M. N., & Studier, F. W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, 110(1), 119–146.
- McFerrin, M. B., & Snell, E. H. (2002). The development and application of a method to quantify the quality of cryoprotectant solutions using standard area-detector X-ray images. *J Appl Crystallogr*, 35(5), 538–545.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4), 404–405.
- McKay, M. J., Afrose, F., Koeppe, R. E., & Greathouse, D. V. (2018). Helix formation and stability in membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860(10), 2108–2117.
- McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(8), 517–533.
- McPherson, A., & Cudney, B. (2014). Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallogr F*, 70, 1445–1467.
- McPherson, A., & Gavira, J. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F*, 70, 2–20.
- Merino, M. M., Levayer, R., & Moreno, E. (2016). Survival of the Fittest: Essential Roles of Cell Competition in Development, Aging, and Cancer. *Trends Cell Biol*, 26(10), 776–788.
- Merino, M. M., Rhiner, C., Lopez-Gay, J. M., Buechel, D., Hauert, B., & Moreno, E. (2015). Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. *Cell*, 160(3), 461–476.
- Merino, M. M., Rhiner, C., Portela, M., & Moreno, E. (2013). ‘Fitness fingerprints’ mediate physiological culling of unwanted neurons in drosophila. *Curr Biol*, 23(14), 1300–1309.
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., & Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 212(4489), 1437–1438.
- Merritt, J. E., Jacob, R., & Hallam, T. J. (1989). Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils. *J Biol Chem*, 264(3), 1522–1527.
- Mertens, H. D. T., & Svergun, D. I. (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Funct Genomics*, 172(1), 128–141.

- Mezzaroba, L., Alfieri, D. F., Colado Simão, A. N., & Vissoci Reiche, E. M. (2019). The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *NeuroToxicology*, 74, 230–241.
- Michel, H. (1983). Crystallization of membrane proteins. *Trends Biochem Sci*, 8(2), 56–59.
- Mielnicka, A., & Michaluk, P. (2021). Exocytosis in astrocytes. *Biomolecules*, 11(9), 1367.
- Milne, J. L. S., Borgnia, M. J., Bartesaghi, A., Tran, E. E. H., Earl, L. A., Schauder, D. M., Lengyel, J., Pierson, J., Patwardhan, A., & Subramaniam, S. (2013). Cryo-electron microscopy: A primer for the non-microscopist. *FEBS J*, 280(1), 28–45.
- Mishra, S., Looger, L. L., & Porter, L. L. (2019). Inaccurate secondary structure predictions often indicate protein fold switching. *Protein Sci*, 28(8), 1487–1493.
- Moger, W. H. (1983). Effects of the calcium-channel blockers cobalt, verapamil, and D600 on Leydig cell steroidogenesis. *Biol Reprod*, 28(3), 528–535.
- Mohrmann, R., Dhara, M., & Bruns, D. (2015). Complexins: Small but capable. *Cell Mol Life Sci*, 72(22), 4221–4235.
- Molodenskiy, D. S., Mertens, H. D. T., & Svergun, D. I. (2020). An automated data processing and analysis pipeline for transmembrane proteins in detergent solutions. *Sci Rep*, 10(1), 8081.
- Monteilh-Zoller, M. K., Hermosura, M. C., Nadler, M. J. S., Scharenberg, A. M., Penner, R., & Fleig, A. (2003). TRPM7 Provides an Ion Channel Mechanism for Cellular Entry of Trace Metal Ions. *J Gen Physiol*, 121(1), 49–60.
- Montomerie, S., Cruz, J. A., Shrivastava, S., Arndt, D., Berjanskii, M., & Wishart, D. S. (2008). PROTEUS2: a web server for comprehensive protein structure prediction and structure-based annotation. *Nucleic Acids Res*, 36, W202–W209.
- Montomerie, S., Sundararaj, S., Gallin, W., & Wishart, D. S. (2006). Improving the accuracy of protein secondary structure prediction using structural alignment. *Bioinformatics*, 30(1), 7.
- Moreno, E. (2008). Is cell competition relevant to cancer? *Nat Rev Cancer*, 8(2), 141–147.
- Moreno, E., & Basler, K. (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell*, 117(1), 117–129.
- Moreno, E., Basler, K., & Morata, G. (2002). Cells compete for Decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in Drosophila wing development. *Nature*, 416(6882), 755–759.
- Moreno, E., Fernandez-Marrero, Y., Meyer, P., & Rhiner, C. (2015). Brain regeneration in Drosophila involves comparison of neuronal fitness. *Curr Biol*, 25(7), 955–963.
- Morris, R. J., & Bricogne, G. A. (2003). Biological Crystallography Sheldrick's 1.2 Å rule and beyond. *Acta Crystallogr D*, 59, 615–617.
- Moss, D., Basak, A., & Naylor, C. (2013). Symmetry in crystallography. *Biochem J*, 35(2), 4–7.
- Mossessova, E., & Lima, C. D. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell*, 5(5), 865–876.
- Mruk, K., Farley, B. M., Ritacco, A. W., & Kobertz, W. R. (2014). Calmodulation meta-analysis: Predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *J Gen Physiol*, 144(1), 105–114.
- Müller, F. G., & Lancaster, C. R. D. (2013). Crystallization of membrane proteins. *Methods Mol Biol*, 1033, 67–83.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51(1), 263–273.
- Murali, P., Johnson, B. P., Lu, Z., Climer, L., Scott, D. A., Foulquier, F., Oprea-Ilie, G., Lupashin, V., Drake, R. R., & Abbott, K. L. (2020). Novel role for the Golgi membrane protein TMEM165 in control of migration and invasion for breast carcinoma. *Oncotarget*, 11(28), 2747–2762.

- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D*, 53(Pt 3), 240–255.
- Mus-Veteau, I., Demange, P., & Zito, F. (2014). Membrane Protein Production for Structural Analysis. *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*. Springer New York.
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 82, 775–797.
- Nadler, M. J. S., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A. L., Zhu, Q., Stokes, A. J., Kurosaki, T., Kinet, J. P., Penner, R., Scharenberg, A. M., & Fleig, A. (2001). LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, 411(6837), 590–595.
- Nagy, J. K., Hoffmann, A. K., Keyes, M. H., Gray, D. N., Oxenoid, K., & Sanders, C. R. (2001). Use of amphipathic polymers to deliver a membrane protein to lipid bilayers. *FEBS Lett*, 501(2–3), 115–120.
- Newby, Z. E. R., O'Connell, J. D., Gruswitz, F., Hays, F. A., Harries, W. E. C., Harwood, I. M., Ho, J. D., Lee, J. K., Savage, D. F., Miercke, L. J. W., & Stroud, R. M. (2009). A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nat Protoc*, 4(5), 619–637.
- Newstead, S., Kim, H., Von Heijne, G., Iwata, S., & Drew, D. (2007). High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(35), 13936–13941.
- Nguyen, T. H., Maucourt, G., Sullivan, R. K. P., Schenning, M., Lavidis, N. A., McCluskey, A., Robinson, P. J., & Meunier, F. A. (2012). Actin- and Dynamin-Dependent Maturation of Bulk Endocytosis Restores Neurotransmission following Synaptic Depletion. *PLoS One*, 7(5), e36913.
- Nguyen, T., Qiu, X., Sun, J., & Meunier, F. (2014). From brain function to therapy Bulk endocytosis at neuronal synapses. *Sci China Life Sci*, 57(4), 378–383.
- Nilius, B. (2007). TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1772(8), 805–812.
- Nilius, B., Prenen, J., Vennekens, R., Hoenderop, J. G. J., Bindels, R. J. M., & Droogmans, G. (2001). Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium*, 29(6), 417–428.
- Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J. G. J., Bindels, R. J. M., & Droogmans, G. (2000). Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca<sup>2+</sup> channel ECaC. *J Physiol*, 527 (Pt 2), 239–248.
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., & Friberg, L. T. (2007). Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., & Mierendorf, R. (2011). *Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression*.
- Noyes, R. M. (1962). Thermodynamics of Ion Hydration as a Measure of Effective Dielectric Properties of Water. *J Am Chem Soc*, 84(4), 513–522.
- Nunez, D., Antonescu, C., Mettlen, M., Liu, A., Schmid, S. L., Loerke, D., & Danuser, G. (2011). Hotspots Organize Clathrin-Mediated Endocytosis by Efficient Recruitment and Retention of Nucleating Resources. *Traffic*, 12, 1868–1878.
- Nurizzo, D., Mairs, T., Guijarro, M., Rey, V., Meyer, J., Fajardo, P., Chavanne, J., Biasci, J. C., McSweeney, S., & Mitchell, E. (2006). The ID23-1 structural biology beamline at the ESRF. *J Synchrotron Rad*, 13(3), 227–238.
- Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y., & Walz, T. (2004). Negative Staining and Image Classification-Powerful Tools in Modern Electron Microscopy. *Biol Proced Online*, 6(1), 23–34.
- Oluwole, A. O., Danielczak, B., Meister, A., Babalola, J. O., Vargas, C., & Keller, S. (2017). Solubilization of Membrane Proteins into Functional Lipid-Bilayer Nanodiscs Using a Diisobutylene/Maleic Acid Copolymer. *Angew Chem Int Ed Engl*, 56(7), 1919–1924.

- Olwin, B. B., & Storm, D. R. (1985). Calcium Binding to Complexes of Calmodulin and Calmodulin Binding Proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 24, 1279–1283.
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S., Wollscheid, B., & Albrecht, M. (2014). Sequence analysis Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 30(6), 884–886.
- Ortega, B., Mason, A. K., & Welling, P. A. (2012). A tandem Di-hydrophobic motif mediates clathrin-dependent endocytosis via direct binding to the AP-2 $\alpha$ 2 subunits. *J Biol Chem*, 287(32), 26867–26875.
- Ostermeier, C., & Michel, H. (1997). Crystallization of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 7(5), 697–701.
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., & Nilius, B. (2006). Permeation and Selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68(1), 685–717.
- Paczkowski, J. E., Richardson, B. C., & Fromme, J. C. (2015). Cargo adaptors: Structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol*, 25(7), 408–416.
- Pan, Z., Choi, S., Ouadid-Ahidouch, H., Yang, J. M., Beattie, J. H., & Korichneva, I. (2017). Zinc transporters and dysregulated channels in cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 22(4), 623.
- Panjikovich, A., & Svergun, D. I. (2016). Deciphering conformational transitions of proteins by small angle X-ray scattering and normal mode analysis. *Phys Chem Phys*, 18, 5707.
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G. F., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W. G. J., Kobilka, B. K., & Steyaert, J. (2014). A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc*, 9(3), 674–693.
- Park, J., Cho, O. Y., Kim, J. A., & Chang, S. (2016). Endosome-mediated endocytic mechanism replenishes the majority of synaptic vesicles at mature CNS synapses in an activity-dependent manner. *Sci Rep*, 6, 31807.
- Parker, T. M., Gupta, K., Palma, A. M., Yekelchik, M., Fisher, P. B., Grossman, S. R., Won, K. J., Madan, E., Moreno, E., & Gogna, R. (2021). Cell competition in intratumoral and tumor microenvironment interactions. *EMBO J*, 40(17), e107271.
- Pasquier, C., Promponas, V. J., Palaos, G. A., Hamodrakas, J. S., & Hamodrakas, S. J. (1999). A novel method for predicting transmembrane segments in proteins based on a statistical analysis of the SwissProt database: the PRED-TMR algorithm. *Protein Eng*, 12(5), 381–385.
- Patergnani, S., Danese, A., Bouhamida, E., Aguiari, G., Previati, M., Pinton, P., & Giorgi, C. (2020). Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(21), 1–27.
- Pearse, B. M. F. (1975). Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J Mol Biol*, 97(1), 93–98.
- Peng, J.-B., Suzuki, Y., Gyimesi, G., & Hediger, M. A. (2018). TRPV5 and TRPV6 Calcium-Selective Channels. In Kozak, J.A., Putney, J.W. *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*, Chapter 13 (pp. 241–274). CRC Press/Taylor&Francis.
- Pepke, S., Kinzer-Ursem, T., Mihalas, S., & Kennedy, M. B. (2010). A dynamic model of interactions of Ca<sup>2+</sup>, calmodulin, and catalytic subunits of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *PLoS Comput Biol*, 6(2).
- Pérez, J., & Nishino, Y. (2012). Advances in X-ray scattering: From solution SAXS to achievements with coherent beams. *Curr Opin Struct Biol*, 22(5), 670–678.
- Pernot, P., Round, A., Barrett, R., De, A., Antolinos, M., Gobbo, A., Gordon, E., Huet, J., Me Kieffer, J., Lentini, M., Mattenet, M., Morawe, C., Mueller-Dieckmann, C., Ohlsson, S., Schmid, W., Surr, J., Theveneau, P., Zerrad, L., & Mcsweeney, S. (2013). Synchrotron Radiation Upgraded ESRF BM29 beamline for SAXS on macromolecules in solution. *J Synchrotron Rad*, 20, 660–664.

- Pernot, P., Theveneau, P., Giraud, T., Fernandes, N. R., Nurizzo, D., Spruce, D., Surr, J., McSweeney, S., Round, A., Felisaz, F., Foedinger, L., Gobbo, A., Huet, J., Villard, C., & Cipriani, F. (2010). New beamline dedicated to solution scattering from biological macromolecules at the ESRF. *J Phys Conf Ser*, 247.
- Persechini, A., & Kretsinger, R. H. (1988). The Central Helix of Calmodulin Functions as a Flexible Tether. *J Biol Chem*, 263(25), 12175–1217.
- Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V., & Svergun, D. I. (2012). New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr*, 45, 342–350.
- Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I. (2005). Global Rigid Body Modeling of Macromolecular Complexes against Small-Angle Scattering Data. *Biophys J*, 89(2), 1237.
- Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I. (2015). Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. *Acta Crystallogr D*, 71(Pt 5), 1051–1058.
- Petrova, E., López-Gay, J. M., Rhiner, C., & Moreno, E. (2012). Flower-deficient mice have reduced susceptibility to skin papilloma formation. *Dis Model Mech*, 5(4), 553–561.
- Petrus, E., Saar, G., Daoust, A., Dodd, S., & Koretsky, A. P. (2021). A hierarchy of manganese competition and entry in organotypic hippocampal slice cultures. *NMR Biomed*, 34(4), e4476.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605–1612.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci*, 30(1), 70–82.
- Pickett, J. A., & Edwardson, J. M. (2006). Compound exocytosis: Mechanisms and functional significance. *Traffic*, 7(2), 109–116.
- Piiadov, V., Ares de Araújo, E., Oliveira Neto, M., Craievich, A. F., & Polikarpov, I. (2019). SAXSMoW 2.0: Online calculator of the molecular weight of proteins in dilute solution from experimental SAXS data measured on a relative scale. *Protein Sci*, 28(2), 454.
- Pintschovius, J., Fendler, K., & Bamberg, E. (1999). Charge translocation by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase investigated on solid supported membranes: cytoplasmic cation binding and release. *Biophys J*, 76(2), 827–836.
- Poehling, H. -M., & Neuhoﬀ, V. (1981). Visualization of proteins with a silver “stain”: A critical analysis. *Electrophoresis*, 2(3), 141–147.
- Polovinkin, V., Gushchin, I., Sintsov, M., Round, E., Balandin, T., Chervakov, P., Schevchenko, V., Utrobin, P., Popov, A., Borshchevskiy, V., Mishin, A., Kuklin, A., Willbold, D., Chupin, V., Popot, J. L., & Gordeliy, V. (2014). High-resolution structure of a membrane protein transferred from amphipol to a lipidic mesophase. *J Membr Biol*, 247(9–10), 997–1004.
- Popot, J. L., Althoﬀ, T., Bagnard, D., Banéres, J. L., Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Catoire, L. J., Champeil, P., Charvolin, D., Cocco, M. J., Crémel, G., Dahmane, T., De La Maza, L. M., Ebel, C., Gabel, F., Giusti, F., Gohon, Y., Goormaghtigh, E., Guittet, E., ... Zoonens, M. (2011). Amphipols from A to Z. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 40(1), 379–408.
- Popot, J.-L., & Engelman, D. M. (2000). Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem*, 69, 881–922.
- Popot, J.-L. (2018). The Use of Amphipols for Electron Microscopy. In: Membrane Proteins in Aqueous Solutions. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. *Springer* (pp. 533–590).
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Arch Biochem Biophys*, 258(2), 58.



- Porod, G. (1951). *Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen I. Teil*. 124(2).
- Porod, G. (1982). General theory. *Small angle x-ray scattering*, 36(5), 17–51.
- Portela, M., Casas-Tinto, S., Rhiner, C., López-Gay, J. M., Domínguez, O., Soldini, D., & Moreno, E. (2010). Drosophila SPARC is a self-protective signal expressed by loser cells during cell competition. *Dev Cell*, 19(4), 562–573.
- Prevarskaya, N., Ouadid-Ahidouch, H., Skryma, R., & Shuba, Y. (2014). Remodelling of Ca<sup>2+</sup> transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1638).
- Prichard, K. L., O'Brien, N. S., Murcia, S. R., Baker, J. R., & McCluskey, A. (2022). Role of Clathrin and Dynamin in Clathrin Mediated Endocytosis/Synaptic Vesicle Recycling and Implications in Neurological Diseases. *Front Cell Neurosci*, 15(754110).
- Privé, G. G. (2007). Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods*, 41(4), 388–397.
- Putnam, C. D. (2016). Guinier peak analysis for visual and automated inspection of small-angle X-ray scattering data. *J Appl Crystallogr*, 49, 1412–1419.
- Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L., & Tainer, J. A. (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys*, 40(3), 191–285.
- Radian, R., & Kanner, B. I. (1985). Reconstitution and purification of the sodium- and chloride-coupled  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter from rat brain. *J Biol Chem*, 260(21), 11859–11865.
- Ramakrishnan, C., & Ramachandran, G. N. (1965). Stereochemical Criteria for Polypeptide and Protein Chain Conformations II. Allowed Conformations for a Pair of Peptide Units. *Biophys J*, 909–933.
- Ramaswami, M., Krishnan, K. S., & Kelly, R. B. (1994). Intermediates in synaptic vesicle recycling revealed by optical imaging of Drosophila neuromuscular junctions. *Neuron*, 13(2), 363–375.
- Rambo, R. P., & Tainer, J. A. (2011). Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law. *Biopolymers*, 95(8), 559–571.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(6), 1760–1765.
- Ravi, V. K., Goel, M., Kotamarthi, H. C., Ainavarapu, S. R. K., & Swaminathan, R. (2014). Preventing Disulfide Bond Formation Weakens Non-Covalent Forces among Lysozyme Aggregates. *PLoS One*, 9(2), e87012.
- Ravichandran, K. (2021). The role of Flower splice variants in regulating endocytosis in primary cytotoxic T lymphocytes. Universität des Saarlandes.
- Raynal, B., Lenormand, P., Baron, B., Hoos, S., & England, P. (2010). Quality assessment and optimization of purified protein samples: Why and how? *Microb Cell Fact*, 13(1).
- Reider, A., Barker, S. L., Mishra, S. K., Im, Y. J., Maldonado-Báez, L., Hurley, J. H., Traub, L. M., & Wendland, B. (2009). Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *EMBO J*, 28(20), 3103–3116.
- Reisinger, V., & Eichacker, L. A. (2008). Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *J Proteomics*, 71(3), 277–283.
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Biochemistry*, 76(7), 3116–3120.

- Reynolds, S. M., Käll, L., Riffle, M. E., Bilmes, J. A., & Noble, W. S. (2008). Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Using Dynamic Bayesian Networks. *PLoS Comput Biol*, 4(11), 1000213.
- Rhiner, C., López-Gay, J. M., Soldini, D., Casas-Tinto, S., Martín, F. A., Lombardía, L., & Moreno, E. (2010). Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila*. *Dev Cell*, 18(6), 985–998.
- Rigaud, J. L., Chami, M., Lambert, O., Levy, D., & Ranck, J. L. (2000). Use of detergents in two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1508(1–2), 112–128.
- Rizzoli, S. (2014). Synaptic vesicle recycling: Steps and principles. *EMBO J*, 33(8), 788–822.
- Rost, B., Yachdav, G., & Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res*, 32, W321–W326.
- Round, A., Felisaz, F., Fodinger, L., Gobbo, A., Huet, J., Villard, C., Blanchet, C. E., Pernot, P., McSweeney, S., Roessle, M., Svergun, D. I., & Cipriani, F. (2015). BioSAXS Sample Changer: A robotic sample changer for rapid and reliable high-throughput X-ray solution scattering experiments. *Acta Crystallogr D*, 71, 67–75.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A., & de Camilli, P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*, 441(7092), 528–531.
- Rudd, J. C., Maity, S., Grunkemeyer, J. A., Snyder, J. C., Lovas, S., & Hansen, L. A. (2023). Membrane structure and internalization dynamics of human Flower isoforms hFWE3 and hFWE4 indicate a conserved endocytic role for hFWE4. *J Biol Chem*, 104945.
- Rudolf, E., & Rudolf, K. (2017). Increases in Intracellular Zinc Enhance Proliferative Signaling as well as Mitochondrial and Endolysosomal Activity in Human Melanocytes. *Cell Physiol Biochem*, 43(1), 1–16.
- Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, A., Farias, R., Gubensek, F., Gutiérrez, I. J. M., Luly, P., Massoud, R., Morero, R., Pedersen, J. Z., & Tor Vergata, R. (1992). Calcium Ion Independent Membrane Leakage Induced by Phospholipase-like Myotoxins. *Biochemistry*, 31, 12424–12430.
- Rupp, B. (2010). *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. Garland Science.
- Rupp, B. (2015). Origin and use of crystallization phase diagrams. *Acta Crystallogr F*, 71, 247–260.
- Ryan, T. A., Smith, S. J., Reutert, H., & Stevens, F. (1996). The timing of synaptic vesicle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(11), 5567–5571.
- Saffarian, S., Cocucci, E., & Kirchhausen, T. (2009). Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biology*, 7(9), e1000191.
- Saheki, Y., & de Camilli, P. (2012). Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a005645.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.
- Saimi, Y., & Kung, C. (1994). Ion channel regulation by calmodulin binding. *FEBS Lett*, 350, 155–158.
- Saimi, Y., & Kung, C. (2002). Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu Rev Physiol*, 64, 289–311.
- Sakipov, S., Sobolevsky, A. I., & Kurnikova, M. G. (2018). Ion Permeation Mechanism in Epithelial Calcium Channel TRVP6. *Sci Rep*, 8(1), 1–13.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.)*. Cold Spring Harbor Laboratory.

- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73(1), 39–85.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463–5467.
- Sather, W. A., & McCleskey, E. W. (2003). Permeation and Selectivity in Calcium Channels. *Annu Rev Physiol*, 65, 133–159.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 199(2), 223–231.
- Schmidt, T. G. M., & Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*, 2(6), 1528–1535.
- Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., & Sali, A. (2010). FoXS: a web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles. *Nucleic Acids Res*, 38, W540–W544.
- Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Tainer, J. A., & Sali, A. (2013). Accurate SAXS profile computation and its assessment by contrast variation experiments. *Biophys J*, 105(4), 962–974.
- Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M., Tainer, J. A., & Sali, A. (2016). FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles. *Nucleic Acids Res*, 44(W1), W424–W429.
- Schröder, H. D., Danscher, G., Jo, S. M., & Su, H. (2000). Zinc-enriched boutons in rat spinal cord. *Brain Res*, 868(1), 119–122.
- Schroer, C. G., Wille, H.-C., Seeck, O. H., Bagschik, K., Schulte-Schrepping, H., Tischler, M., Graafsma, H., Laasch, W., Baev, K., Klumpp, S., Bartolini, R., Reichert, H., Leemans, W., & Weckert, E. (2022). The synchrotron radiation source PETRA III and its future ultra-low-emittance upgrade PETRA IV. *EPJ Plus*, 137(12), 1312.
- Schulz, P., Dueck, B., Mourrot, A., Hatahet, L., & Fendler, K. (2009). Measuring Ion Channels on Solid Supported Membranes. *Biophys J*, 97, 388–396.
- Schulz, P., Garcia-Celma, J. J., & Fendler, K. (2008). SSM-based electrophysiology. *Methods*, 46(2), 97–103.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., & V. Maizel Jr., J. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28(5), 815–820.
- Sharma, S., & Lindau, M. (2018). Molecular mechanism of fusion pore formation driven by the neuronal SNARE complex. *PNAS*, 115(50), 12751–12756.
- Sievers, F., Higgins, D. G. Clustal omega (2014). *Curr Protoc Bioinformatics*, 48, 3.13.1–3.13.16.
- Simpson, P. (1979). Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of *Drosophila*. *Dev Biol*, 69(1), 182–193.
- Slabinski, L., Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Wilson, I. A., Lesley, S. A., & Godzik, A. (2007). XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*, 23(24), 3403–3405.
- Slotboom, D. J., Duurkens, R. H., Olieman, K., & Erkens, G. B. (2008). Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods*, 46(2), 73–82.
- Smith, B. J. (1994). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol*, 32, 23–34.
- Smith, D. B., & Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67(1), 31–40.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76–85.

- Smith, S. M., Renden, R., & von Gersdorff, H. (2008). Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval. *Trends Neurosci*, 31(11), 559–568.
- Sochacki, K. A., Dickey, A. M., Strub, M. P., & Taraska, J. W. (2017). Endocytic proteins are partitioned at the edge of the clathrin lattice in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 19(4), 352–361.
- Southern, E. M. (1979). Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 100(2), 319–323.
- Soykan, T., Kaempfer, N., Sakaba, T., Vollweiler, D., Goerdeler, F., Puchkov, D., Kononenko, N. L., & Haucke, V. (2017). Synaptic Vesicle Endocytosis Occurs on Multiple Timescales and Is Mediated by Formin-Dependent Actin Assembly. *Neuron*, 93(4), 854–866.
- Steeland, S., Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2016). Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*, 21(7), 1076–1113.
- Stetsenko, A., & Guskov, A. (2017). An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization. *Crystals*, 7(7), 197.
- Stimpson, H. E. M., Toret, C. P., Cheng, A. T., Pauly, B. S., Drubin, D. G., & Schmid, S. L. (2009). Early-Arriving Syp1p and Ede1p Function in Endocytic Site Placement and Formation in Budding Yeast. *Mol Biol Cell*, 20, 4640–4651.
- Stowell, M. H. B., Marks, B., Wigge, P., & McMahon, H. T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol*, 1(1), 27–32.
- Streifel, K. M., Miller, J., Mouneimne, R., & Tjalkens, R. B. (2013). Manganese inhibits ATP-induced calcium entry through the transient receptor potential channel TRPC3 in astrocytes. *NeuroToxicology*, 34(1), 160–166.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 41(1), 207–234.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1), 113–130.
- Suades, A., Alcaraz, A., Cruz, E., Álvarez-Marimon, E., Whitelegge, J. P., Manyosa, J., Cladera, J., & Perálvarez-Marín, A. (2019). Structural biology workflow for the expression and characterization of functional human sodium glucose transporter type 1 in *Pichia pastoris*. *Sci Rep*, 9(1), 1203.
- Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, 27, 509–547.
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), 675–690.
- Südhof, T. C. (2014). The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 126(47), 12906–12931.
- Südhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12).
- Suh, B.-C., & Hille, B. (2008). PIP 2 is a necessary cofactor for ion channel function: How and why? *Annu Rev Biophys*, 37, 175–195.
- Suzuki, H., Tani, K., Tamura, A., Tsukita, S., & Fujiyoshi, Y. (2015). Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J Mol Biol*, 427(2), 291–297.
- Svergun, D., Barberato, C., & Koch, M. H. J. (1995). CRY SOL—a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J Appl Crystallogr*, 28, 768–773.
- Svergun, D. I. (1992). Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *J Appl Crystallogr*, 25, 495–503.
- Svergun, D. I. (1999). Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J*, 76(6), 2879–2886.

- Svergun, D. I., & Koch, M. H. J. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep Prog Phys*, 66, 1735–1782.
- Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Timmins, P. A., & May, R. P. (2013). Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules. International Union of Crystallography Texts on Crystallography. Oxford University Press.
- Svergun, D. I., Petoukhov, M. V., Koch, M. H. J., Timmins, P.A., May, R.P. (2001). Determination of domain structure of proteins from x-ray solution scattering. *Biophys J*, 80(6), 2946–2953.
- Sweitzer, S. M., & Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, 93(6), 1021–1029.
- Swindells, M. B., & Ikura, M. (1996). Pre-formation of the semi-open conformation by the apocalmodulin C-terminal domain and implications for binding IQ-motifs. *Nat Struct Biol*, 3(6), 501–504.
- Switzer, R. C., Merrill, C. R., & Shifrin, S. (1979). A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels. *Anal Biochem*, 98(1), 231–237.
- Szule, J. A., Harlow, M. L., Jung, J. H., De-Miguel, F. F., Marshall, R. M., & McMahon, U. J. (2012). Regulation of synaptic vesicle docking by different classes of macromolecules in active zone material. *PLoS ONE*, 7(3), e33333.
- Takayama, H., & Sitkovsky, M. V. (1987). Antigen receptor-regulated exocytosis in cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 166(3), 725–743.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L., & de Camilli, P. (1996). The Synaptic Vesicle Cycle: A Single Vesicle Budding Step Involving Clathrin and Dynamin. *J Cell Biol*, 133(6), 1237–1250.
- Tebar, F., Sorkina, T., Sorkin, A., Ericsson, M., & Kirchhausen, T. (1996). Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J Biol Chem*, 271(46), 28727–28730.
- Teese, M. G., & Langosch, D. (2015). Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry*, 54(33), 5125–5135.
- Theveneau, P., Baker, R., Barrett, R., Beteva, A., Bowler, M. W., Carpentier, P., Caserotto, H., De Sanctis, D., Dobias, F., Flot, D., Guijarro, M., Giraud, T., Lentini, M., Leonard, G. A., Mattenet, M., McCarthy, A. A., McSweeney, S. M., Morawe, C., Nanao, M., ... Mueller-Dieckmann, C. (2013). The upgrade programme for the structural biology beamlines at the European synchrotron Radiation Facility-High throughput sample evaluation and automation. *J Phys Conf Ser*, 425(1), 012001.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22), 4673–4680.
- Tidow, H., & Nissen, P. (2013). Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *FEBS J*, 280(21), 5551–5565.
- Tonge, S. R., & Tighe, B. J. (2001). Responsive hydrophobically associating polymers: A review of structure and properties. *Adv Drug Deliv Rev*, 53(1), 109–122.
- Torrisi, M., Kaleel, M., & Pollastri, G. (2019). Deeper Profiles and Cascaded Recurrent and Convolutional Neural Networks for state-of-the-art Protein Secondary Structure Prediction. *Sci Rep*, 9, 12374.
- Touyz, R. M. (1991). Magnesium supplementation as an adjuvant to synthetic calcium channel antagonists in the treatment of hypertension. *Med Hypotheses*, 36(2), 140–141.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Biochemistry*, 76(9), 4350–4354.
- Trabjerg, E., Keller, A., & Leitner, A. (2021). pH Dependence of Succinimide-Ester-Based Protein Cross-Linking for Structural Mass Spectrometry Applications. *ACS Meas Sci Au*, 2022, 132–138.

- Traub, L. M. (2009). Tickets to ride: Selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9), 583–596.
- Traub, L. M., & Bonifacino, J. S. (2013). Cargo Recognition in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(11), a016790.
- Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., All, L. K., & Elofsson, A. (2015). The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res*, 43, 401–407.
- Tusnady, G. E., & Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Application to topology prediction. *J Mol Biol*, 283(2), 489–506.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., Mcquilton, P., Marygold, S., Millburn, G., Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., Zhang, H., & Consortium, T.F. (2008). FlyBase: enhancing Drosophila Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res*, 37, 555–559.
- Ungewickell, E., & Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature*, 289(5796), 420–422.
- Urbansky, K. (2017). Expression, Reinigung, Charakterisierung und Kristallisation des Flower-hnlichen Proteins aus der Maus. Universitat des Saarlandes.
- Vagin, A., & Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D*, 66(1), 22–25.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*, 50(D1), D439–D444.
- Vath, K., Mattes, C., Reinhard, J., Covino, R., Stumpf, H., Hummer, G., & Ernst, R. (2021). Cysteine cross-linking in native membranes establishes the transmembrane architecture of ire1. *J Cell Biol*, 220(8), e202011078.
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Ann Rev Biochem*, 76, 387–417.
- Verhage, M., & Sørensen, J. B. (2008). Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic*, 9(9), 1414–1424.
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J. P., & Penner, R. (2006). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol*, 16(20), 2073–2079.
- Viklund, H., Bernsel, A., Skwark, M., & Elofsson, A. (2008). SPOCTOPUS: a combined predictor of signal peptides and membrane protein topology. *Bioinformatics*, 24(24), 2928–2929.
- Viklund, H., & Elofsson, A. (2008). OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics*, 24(15), 1662–1668.
- Volkov, V. V., & Svergun, D. I. (2003). Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr*, 36, 860–864.
- von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol*, 225(2), 487–494.
- Von Stetten, D., Carpentier, P., Flot, D., Beteva, A., Caserotto, H., Dobias, F., Guijarro, M., Giraud, T., Lentini, M., McSweeney, S., Royant, A., Petitdemange, S., Sinoir, J., Surr, J., Svensson, O., Theveneau, P., Leonard, G. A., & Mueller-Dieckmann, C. (2020). ID30A-3 (MASSIF-3) - A beamline for macromolecular crystallography at the ESRF with a small intense beam. *J Synchrotron Rad*, 27, 844–851.
- Vonrhein, C., Flensburg, C., Keller, P., Sharff, A., Smart, O., Paciorek, W., Womack, T., & Bricogne, G. (2011). Biological Crystallography Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr D*, 67, 293–302.

- Vonrhein, C., Tickle, I. J., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Sharff, A., & Bricogne, G. (2018). Advances in automated data analysis and processing within autoPROC, combined with improved characterisation, mitigation and visualisation of the anisotropy of diffraction limits using STARANISO. *Acta Crystallogr A*, 74(a1), a360–a360.
- Voytas, D. (2000). Agarose Gel Electrophoresis. *Curr Protoc Neurosci*, 11(1).
- Wang, L., & Tonggu, L. (2015). Membrane protein reconstitution for functional and structural studies. *Sci China Life Sci*, 58(1), 66–74.
- Wang, Y. L., & Zhang, C. X. (2017). Putting a brake on synaptic vesicle endocytosis. In *Cell Mol Life Sci*, 74(16), 2917–2927.
- Watanabe, S., & Boucrot, E. (2017). Fast and ultrafast endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 47, 64–71.
- Watanabe, S., Liu, Q., Davis, W., Hollopeter, G., Thomas, N., Jorgensen, N. B., & Jorgensen, E. M. (2013). Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife*, 2, e00723.
- Watanabe, S., Rost, B. R., Camacho-Pérez, M., Davis, M. W., Söhl-Kielczynski, B., Rosenmund, C., & Jorgensen, E. M. (2013). Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, 504(7479), 242–247.
- Watanabe, S., Trimbuch, T., Camacho-Pérez, M., Rost, B. R., Brokowski, B., Söhl-Kielczynski, B., Felies, A., Davis, M. W., Rosenmund, C., & Jorgensen, E. M. (2014). Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*, 515(7526), 228–233.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W296–W303.
- Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics*, 54, 5.6.1–5.6.37.
- Wen, J., Arakawa, T., & Philo, J. S. (1996). Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions. *Anal Biochem*, 240(2), 155–166.
- Wen, P. J., Grenklo, S., Arpino, G., Tan, X., Liao, H. S., Heureaux, J., Peng, S. Y., Chiang, H. C., Hamid, E., Zhao, W. D., Shin, W., Näreoja, T., Evergren, E., Jin, Y., Karlsson, R., Ebert, S. N., Jin, A., Liu, A. P., Shupliakov, O., & Wu, L. G. (2016). Actin dynamics provides membrane tension to merge fusing vesicles into the plasma membrane. *Nat Commun*, 7, 12604.
- Wernimont, A., & Edwards, A. (2009). In Situ Proteolysis to Generate Crystals for Structure Determination: An Update. *PLoS One*, 4(4), e5094.
- White, M. A., Clark, K. M., Grayhack, E. J., & Dumont, M. E. (2007). Characteristics affecting expression and solubilization of yeast membrane proteins. *J Mol Biol*, 365(3), 621–636.
- William Studier, F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185(C), 60–89.
- Wine, Y., Cohen-Hadar, N., Freeman, A., & Frolow, F. (2007). Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnol Bioeng*, 98(3), 711–718.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D*, 67(4), 235–242.
- Winter, G. (2010). Xia2: An expert system for macromolecular crystallography data reduction. *J Appl Crystallogr*, 43(1), 186–190.

- Wit, H. de, Cornelisse, L. N., Toonen, R. F. G., & Verhage, M. (2006). Docking of Secretory Vesicles Is Syntaxin Dependent. *PLoS One*, 1(1), e126.
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2008). Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J*, 275(1), 1–21.
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2013). Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS J*, 280(22), 5705–5736.
- Wojdyla, J. A., Kaminski, J. W., Panepucci, E., Ebner, S., Wang, X., Gabadinho, J., & Wang, M. (2018). DA+ data acquisition and analysis software at the Swiss Light Source macromolecular crystallography beamlines. *J Synchrotron Rad*, 25(1), 293–303.
- Wojdyla, J., Panepucci, E., Martiel, I., Ebner, S., Huang, C.-Y., Caffrey, M., Bunk, O., & Wang, M. (2016). Fast two-dimensional grid and transmission X-ray microscopy scanning methods for visualizing and characterizing protein crystals. *J Appl Crystallogr*, 49, 944–952.
- Wu, L. G., Hamid, E., Shin, W., & Chiang, H. C. (2014). Exocytosis and endocytosis: Modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 76, 301–331.
- Wu, M., Lander, G. C., Rhodes, D., & Sandin, S. (2020). How low can we go? Structure determination of small biological complexes using single-particle cryo-EM. *Curr Opin Struct Biol*, 64, 9–16.
- Wu, W., & Wu, L.-G. (2009). Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10234–10239.
- Wu, X. S., Lee, S. H., Sheng, J., Zhang, Z., Zhao, W. D., Wang, D., Jin, Y., Charnay, P., Ervasti, J. M., & Wu, L. G. (2016). Actin Is Crucial for All Kinetically Distinguishable Forms of Endocytosis at Synapses. *Neuron*, 92(5), 1020–1035.
- Wu, X. S., McNeil, B. D., Xu, J., Fan, J., Xue, L., Melicoff, E., Adachi, R., Bai, L., & Wu, L. G. (2009). Ca<sup>2+</sup> and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat Neurosci*, 12(8), 1003–1010.
- Wu, X. S., Zhang, Z., Zhao, W. D., Wang, D., Luo, F., & Wu, L. G. (2014). Calcineurin is universally involved in vesicle endocytosis at neuronal and nonneuronal secretory cells. *Cell Rep*, 7(4), 982–988.
- Xia, Z., & Storm, D. R. (2005). The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 6(4), 267–276.
- Xie, Z., Long, J., Liu, J., Chai, Z., Kang, X., & Wang, C. (2017). Molecular Mechanisms for the Coupling of Endocytosis to Exocytosis in Neurons. *Front Mol Neurosci*, 10, 47.
- Xing, Y., Böcking, T., Wolf, M., Grigorieff, N., Kirchhausen, T., & Harrison, S. C. (2010). Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: Mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J*, 29(3), 655–665.
- Xiong, Z. G., Pignataro, G., Li, M., Chang, S., & Simon, R. P. (2008). Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 8(1), 25–32.
- Xue, L., Zhang, Z., McNeil, B. D., Luo, F., Wu, X. S., Sheng, J., Shin, W., & Wu, L. G. (2012). Voltage-Dependent Calcium Channels at the Plasma Membrane, but Not Vesicular Channels, Couple Exocytosis to Endocytosis. *Cell Rep*, 1(6), 632–638.
- Yang, E. Y., & Shah, K. (2020). Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Front Oncol*, 10(1182).
- Yao, C.-K., Lin, Y. Q., Ly, C. V., Ohyama, T., Haueter, C. M., Moiseenkova-Bell, V. Y., Wensel, T. G., & Bellen, H. J. (2009). A synaptic vesicle-associated Ca<sup>2+</sup> channel promotes endocytosis and couples exocytosis to endocytosis. *Cell*, 138(5), 947–960.
- Yao, C.-K., Liu, Y.-T., Lee, I.-C., Wang, Y.-T., & Wu, P.-Y. (2017). A Ca<sup>2+</sup> channel differentially regulates Clathrin-mediated and activity-dependent bulk endocytosis. *PLoS Biol*, 15(4), e2000931.



- Yap, K. L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., & Ikura, M. (2000). Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics*, 1(1), 8–14.
- Yekelchyk, M., Madan, E., Wilhelm, J., Short, K. R., Palma, A. M., Liao, L., Camacho, D., Nkadori, E., Winters, M. T., Rice, E. S., Rolim, I., Cruz-Duarte, R., Pelham, C. J., Nagane, M., Gupta, K., Chaudhary, S., Braun, T., Pillappa, R., Parker, M. S., ... Gogna, R. (2021). Flower lose, a cell fitness marker, predicts COVID-19 prognosis. *EMBO Mol Med*, 13(11).
- Yin, X., Yang, J., Xiao, F., Yang, Y., & Shen, H.-B. (2018). MemBrain: An Easy-to-Use Online Webserver for Transmembrane Protein Structure Prediction. *Nano-Micro Lett*, 10(2).
- Young, A. (2007). Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol*, 18(4), 448–458.
- Yue, L., Peng, J.-B., Hediger, M. A., & Clapham, D. E. (2001). CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*, 410(6829), 705–709.
- Zeder-Lutz, G., Cherouati, N., Reinhart, C., Pattus, F., & Wagner, R. (2006). Dot-blot immunodetection as a versatile and high-throughput assay to evaluate recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 50(1), 118–127.
- Zhang, H., Chen, Z., Zhang, A., Gupte, A. A., & Hamilton, D. J. (2022). The Role of Calcium Signaling in Melanoma. *Int J Mol Sci*, 23(3).
- Zhang, J., Chen, X. W., Shu, L. S., & Liu, C. D. (2022). The correlation and role analysis of SLC30A1 and SLC30A10 in cervical carcinoma. *J Cancer*, 13(3), 1031.
- Zhang, L., Wang, K., Klaerke, D. A., Calloe, K., Lowrey, L., Pedersen, A., Gourdon, P., & Gotfryd, K. (2019). Purification of Functional Human TRP Channels Recombinantly Produced in Yeast. *Cells*, 8(148).
- Zhang, L., Wang, X., Chen, J., Sheng, S., & Kleyman, T. R. (2023). Extracellular intersubunit interactions modulate epithelial Na<sup>+</sup> channel gating. *J Biol Chem*, 102914.
- Zhang, Q., Li, Y., & Tsien, R. W. (2009). The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles. *Science*, 323(5920), 1448–1453.
- Zhao, C., & Mackinnon, R. (2023). Structural and functional analyses of a GPCR-inhibited ion channel TRPM3. *Neuron*, 111(1), 81–91.
- Zhou, H.-X., & Cross, T. A. (2013). Influences of Membrane Mimetic Environments on Membrane Protein Structures. *Annu Rev Biophys*, 42, 361–392.
- Zhou, Q., Zhou, P., Wang, A. L., Wu, D., Zhao, M., Südhof, T. C., & Brunger, A. T. (2017). The primed SNARE-complexin-synaptotagmin complex for neuronal exocytosis. *Nature*, 548(7668), 420–425.
- Zimmerman, J. M., Eliezer, N., & Simha, R. (1968). The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods. *J Theor Biol*, 21(2), 170–201.
- Zoonens, M., Catoire, L. J., Giusti, F., & Popot, J. L. (2005). NMR study of a membrane protein in detergent-free aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25), 8893–8898.
- Zoonens, M., & Popot, J.-L. (2014). Amphipols for Each Season. *J Membr Biol*, 247(9–10), 759–796.
- Zuo, X., Li, S., Hall, J., Mattern, M. R., Tran, H., Shoo, J., Tan, R., Weiss, S. R., & Butt, T. R. (2005). Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *J Struct Funct Genomics*, 6(2–3), 103–111.

## Kapitel 9 Publikationen

Keerthana Ravichandran, Claudia Schirra, **Katja Urbansky**, Szu-Min Tu, Nadia Alawar, Stefanie Mannebach, Elmar Krause, David Stevens, C. Roy D. Lancaster, Veit Flockerzi, Hsin-Fang Chang, Ute Becherer (2023). Required minimal protein domain of Flower for Synaptobrevin2 Endocytosis in Cytotoxic T Cells. J Cell Biol. (Manuskript eingereicht)

**Katja Urbansky**, M. Gregor Madej, Michael Lafontaine, Yvonne Carius, Christine Ziegler, Veit Flockerzi, C. Roy D. Lancaster (2023). Experimental evidence for the structural understanding of mFl<sub>A</sub> calcium channel. (Manuskript in Vorbereitung)

**Katja Urbansky**, Elisabeth Ludes, Martin Jung, Silke Bruns-Engers, C. Roy D. Lancaster (2023). Characterization and structure determination of a llama-derived nanobody targeting the mouse Flower-like protein. (Manuskript in Vorbereitung)

## Kapitel 10 Danksagung

Mein erster Dank gebührt meinem wissenschaftlichen Betreuer Prof. Dr. C. Roy D. Lancaster für die interessante Themenstellung und seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bereits jetzt danke ich auch der Person, die das Zweitgutachten übernommen hat.

Ich möchte mich bei meinem Vorgänger, Dr. Michael Lafontaine, für die umfassende Einführung in das Thema Flower im Rahmen meiner Masterarbeit bedanken.

Herzlich danken möchte ich auch allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das gute Arbeitsklima mit gegenseitiger Unterstützung, fachlichen Diskussionen und persönlichen Gesprächen.

Besonders hervorheben möchte ich die Unterstützung von Dr. Yvonne Carius bei der Durchführung und Auswertung der Röntgendiffraktions- und SAXS-Messungen. Vielen Dank für all die Ratschläge, Anregungen, ständige Hilfsbereitschaft und die angenehmen Zeiten während zahlreicher Dienstreisen.

Prof. Dr. Christine Ziegler von der Universität Regensburg danke ich herzlich für die großzügige Bereitstellung der Mikroskope und des SSM-Geräts. Ebenso gebührt Lifei Fu Anerkennung für die Hilfe bei der Auswertung der Cryo-EM Daten. Mein größter Dank geht an Dr. Gregor Madej, der nicht nur vor Ort in Regensburg, sondern auch während unzähliger Zoom-Meetings und Telefonate stets seine Zeit und Expertise zur Verfügung gestellt hat.

Die Mitglieder des ehemaligen „Synapsen Clubs“ verdienen meinen Dank für die Gelegenheit, meine Ergebnisse zu präsentieren und mit Nicht-Strukturbiologen zu diskutieren. Ein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe „Zelluläre Neurophysiologie“, insbesondere Dr. Claudia Schirra, deren fachliche Diskussionen mir sehr geholfen haben, meine Ergebnisse kritisch zu hinterfragen und aus neuen Blickwinkeln zu betrachten.

Für die spannende Zusammenarbeit mit den Nanobodies möchte ich Dr. Elisabeth Ludes und Silke Bruns-Engers meinen Dank aussprechen.

Den Mitgliedern des ESRF und SLS danke ich herzlich für ihre Unterstützung während der Messzeiten.

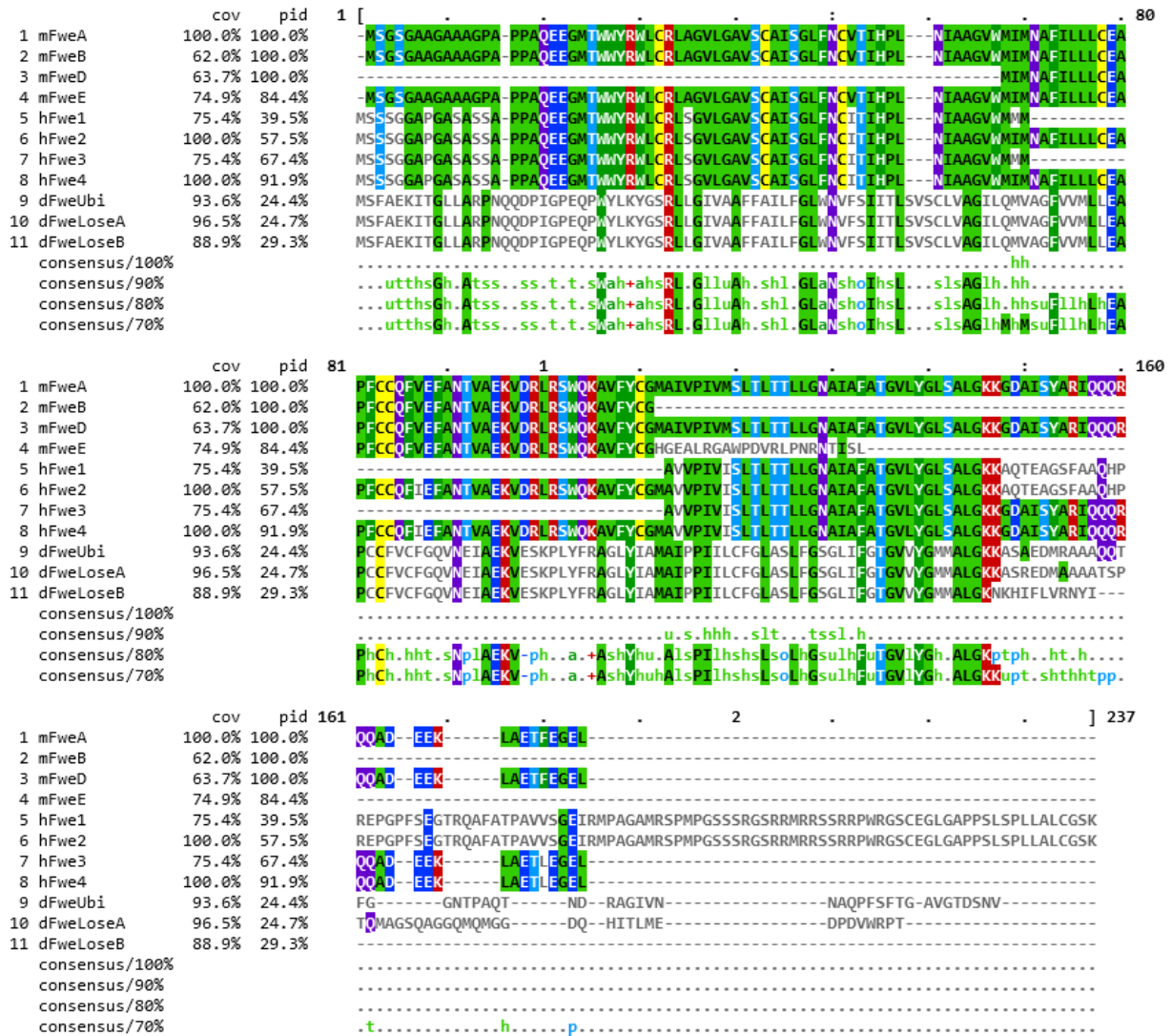
Abschließend möchte ich meine aufrichtige Dankbarkeit meinen Eltern gegenüber zum Ausdruck bringen, die es mir ermöglicht haben, mein Studium zu absolvieren und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Gleichzeitig möchte ich meiner Schwester von Herzen dafür danken, dass sie mir während der intensiven Schreibphase durch unsere gemeinsamen sportlichen Aktivitäten den besten Ausgleich geboten hat.

## **Kapitel 11 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

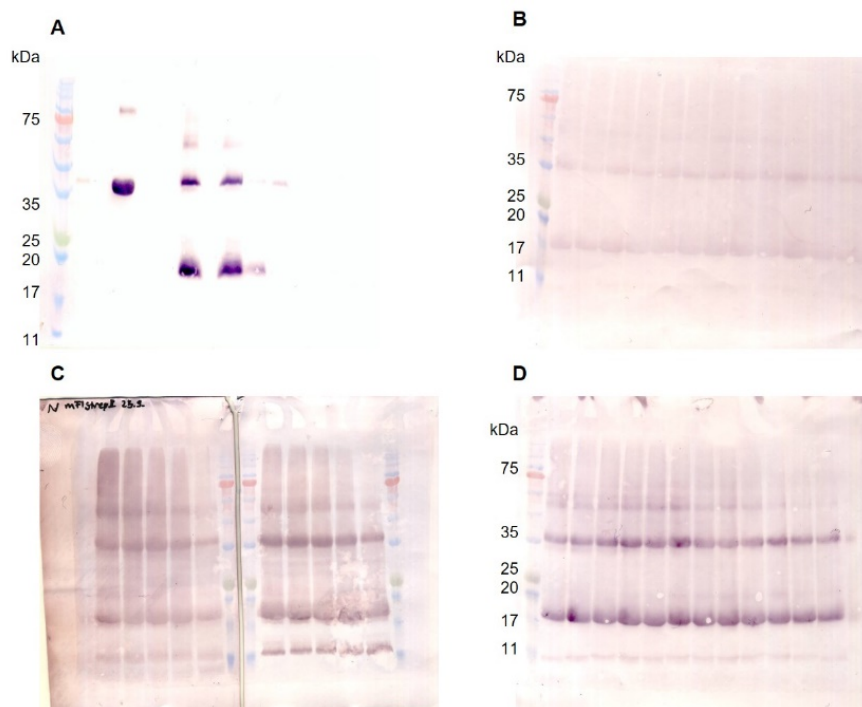
## Kapitel 12 Anhang

### 12.1 Sequenzalinierung ausgewählter Flower-Isoformen



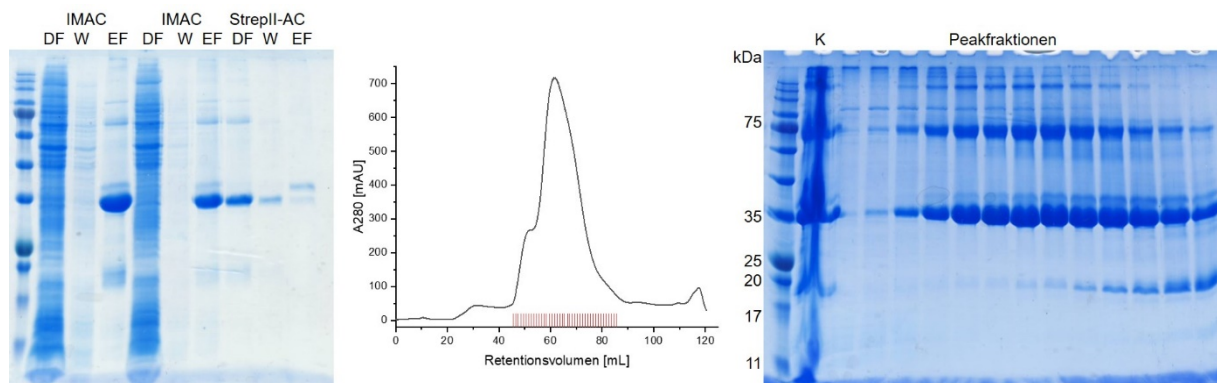
**Abbildung 12.1: Sequenzalinierung ausgewählter Flower-Isoformen mit ClustalW (Thompson et al., 1994).** Die Darstellungsansicht wurde mit MView (Brown et al., 1998) erstellt.

## 12.2 Western-Blots von mFI-StrepII



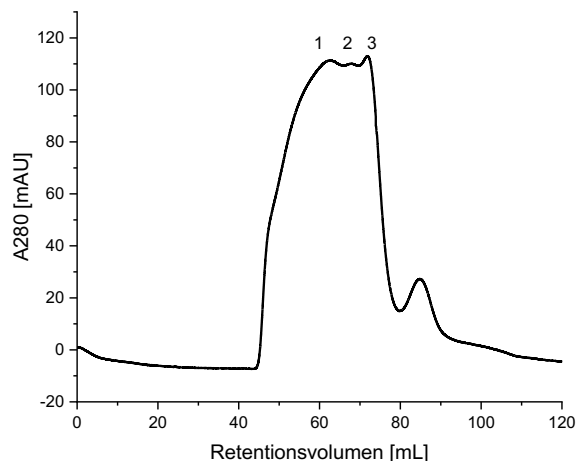
**Abbildung 12.2: Western-Blots von mFI-StrepII mit verschiedenen Antikörpern.** **A** Western-Blot der Reinigung von mFI-StrepII nach Detektion mit einem StrepII-Antikörper. **B** Western-Blot der SEC nach Tag 1 mit N-spezifischem Antikörper (**B**) und C-spezifischem Antikörper (**D**). **C** Western-Blot der Reinigung von mFI-StrepII der Proben aus B und D nach 28 Tagen mit N- (links)- und C-spezifischem Antikörper.

## 12.3 Reinigung 6xHis-SUMO-mFI-StrepII



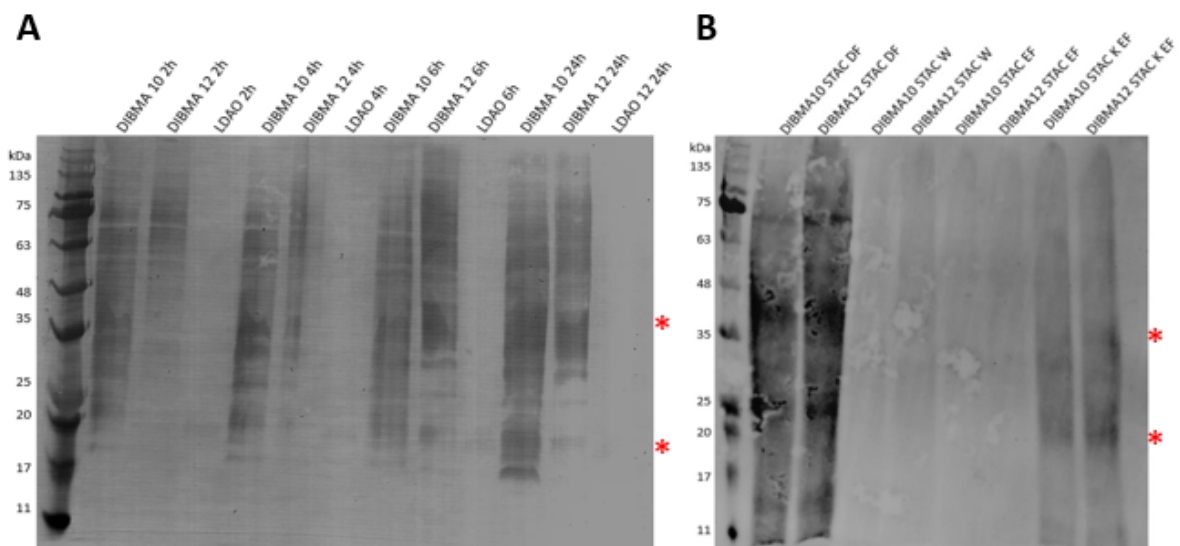
**Abbildung 12.3: Reinigung und SEC von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII.** Die Reinigung erfolgte analog zu mFI-StrepII, wobei das Konstrukt mit SUMO-Anhängsel nicht an die StrepII-Matrix gebunden hat. Im 12 %-igen SDS-Gel links sind Proben der IMAC, der Wiederholung der IMAC und der StrepII-Tactin-AC aufgetragen. Im Chromatogramm wurde die Absorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Es zeigt die SEC von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII in 0,1 % Fos12 (GF1-Puffer) nach Injektion auf eine Superdex 200 16/60 pg-Säule. Im Gel rechts ist das Konzentrat K vor der SEC und jede zweite gesammelte Fraktion aufgetragen. Es sind die SDS-Gele nach Coomassie-Färbung gezeigt. Die Ausbeute von 6xHis-SUMO-mFI-StrepII betrug 3 mg/L Expressionskultur.

## 12.4 SEC von mFI in PMAL-C8



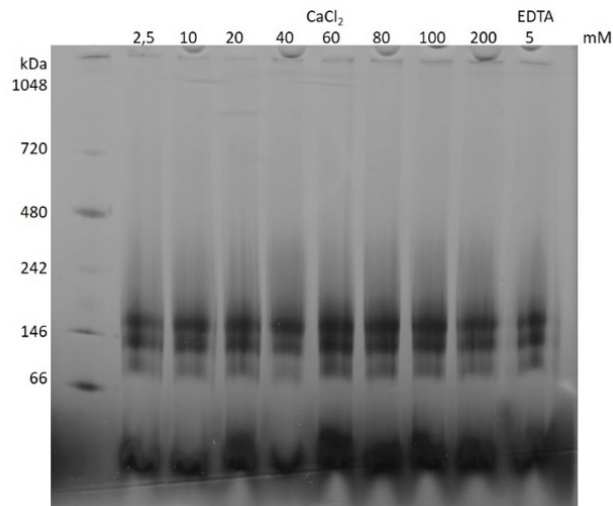
**Abbildung 12.4: Größenausschluss-Chromatographie von mFI-StrepII in PMAL-C8.** Präparative Größenausschluss-Chromatographie (Superdex 200, 16/60 pg) von mFI in PMAL-C8 in GF-Puffer (50 mM Tris pH 8, 75 mM KCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM TCEP). Die Proteinabsorption bei 280 nm wurde gegen das Retentionsvolumen aufgetragen.

## 12.5 Rekonstitution von mFI-StrepII in DIBMA

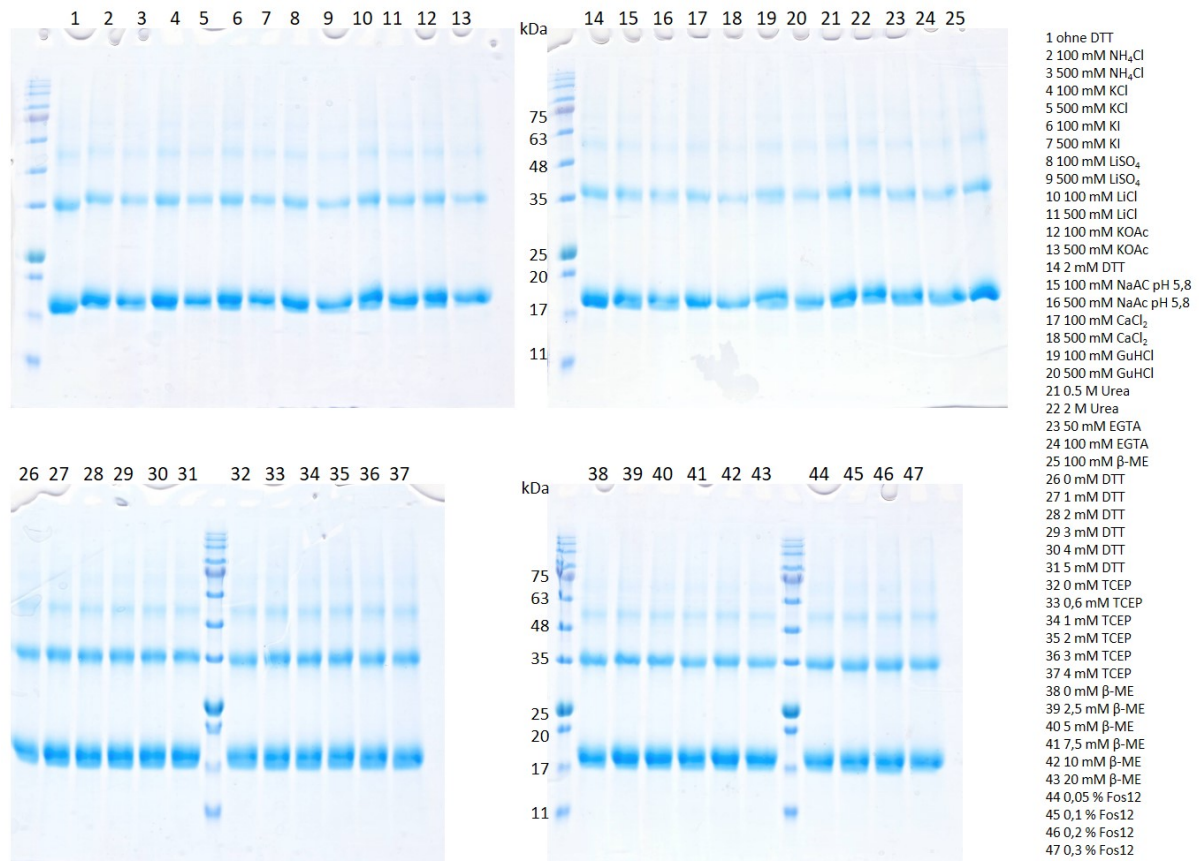


**Abbildung 12.5: Western-Blot nach Rekonstitution von mFI-StrepII in DIBMA.** Mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurde überprüft, wie viel Membran abhängig von der Zeit durch 3 mM (2.5% (w/v)) DIBMA extrahiert werden kann. Dazu wurden jeweils 250 mg *E. coli* BL21(Star) x pRARE Membran mit überexprimiertem 6xHis-SUMO-mFI-StrepII in einem Puffer aus 50 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  gelöst und mit 3 mM DIBMA 10, 3 mM DIBMA 12 oder 1 % (v/v) LDAO als Kontrolle versetzt. Nach 2, 4, 6 und 24 h wurden Proben entnommen und nach Methanol-Chloroform-Extraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen. **A** Analyse der Test-Solubilisierung mit DIBMA. Western-Blot nach Auftrennung in einem 12 %-igen SDS-Gel. Die Detektion erfolgte mit einem StrepII-Antikörper. **B** Test-Reinigung von in DIBMA rekonstituiertem mFI. Western-Blot nach Auftrennung in einem 12 %-igen SDS-Gel mit anschließender Detektion durch einen StrepII-Antikörper.

## 12.6 Native und SDS-PAGE nach Zugabe von Additiven



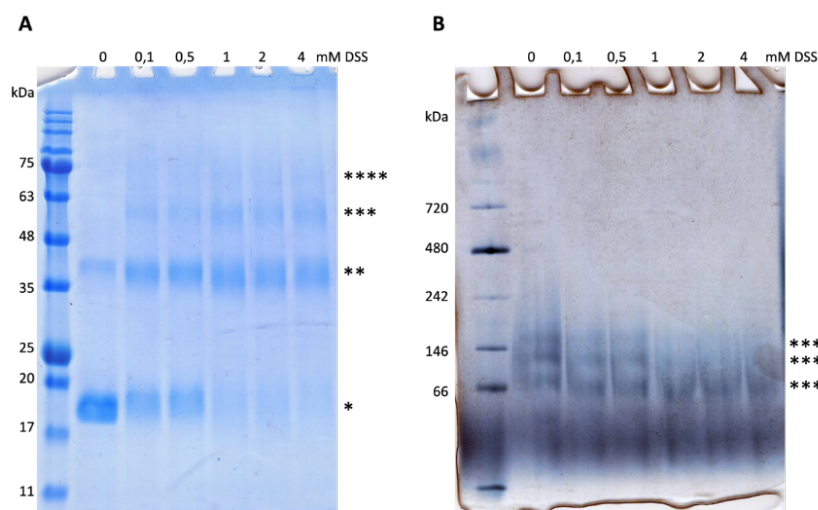
**Abbildung 12.6: Einfluss von Calcium auf das Oligomerisierungsverhalten von mFI-StreptII.** Native PAGE von mFI-StreptII in Fos12 nach Zugabe verschiedener Calciumkonzentrationen. Die Proben wurden auf ein 4-16 %-iges Bis-Tris-Gradientengel aufgetragen, aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt.



**Abbildung 12.7: Zugabe verschiedener Salze, Reduktionsmittel, Additive und Detergenzkonzentrationen zu mFI-StreptII-Proben und anschließende Analyse mittels SDS-PAGE.** Es sind 12 %-ige SDS-Gele nach Coomassie-Färbung gezeigt.

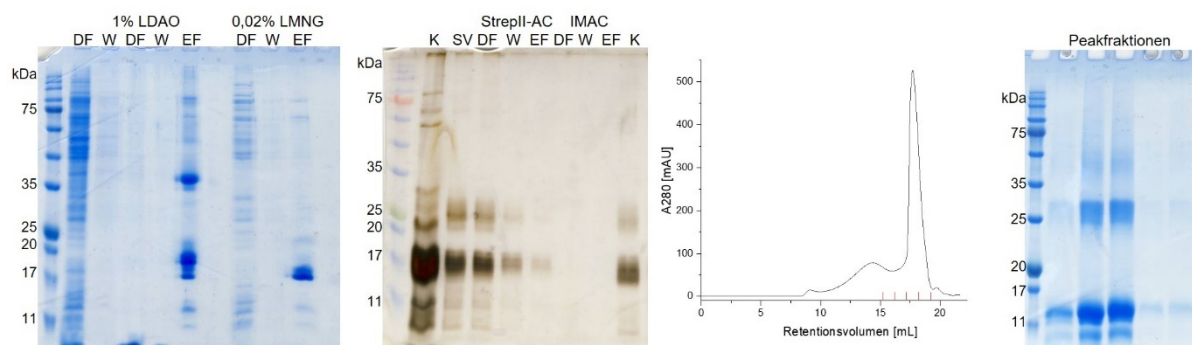


## 12.7 Crosslinking-Versuch mit DSS

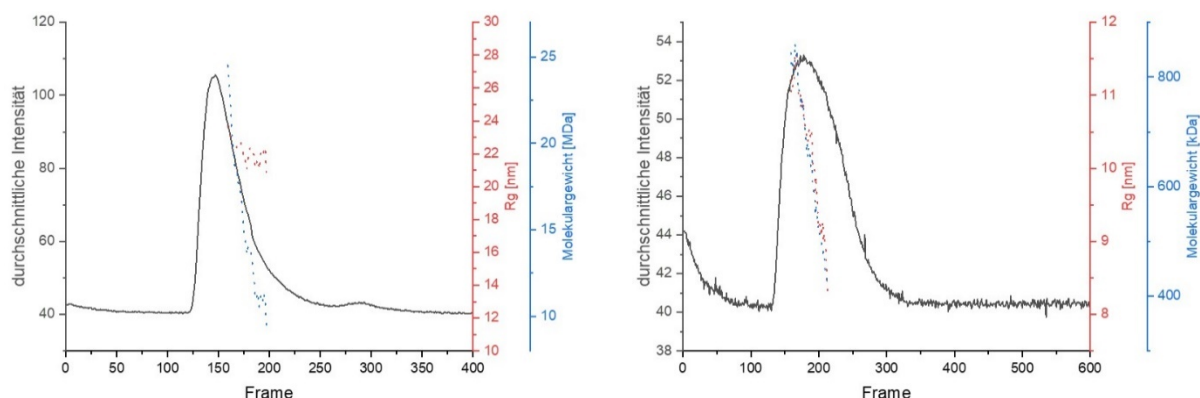


**Abbildung 12.8: Crosslinking von mFI-StreptII mit DSS.** Links ist ein 12 %-iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung gezeigt, wobei DSS-Konzentrationen von 0,1 bis 4 mM DSS eingesetzt wurden. Es sind Banden bei 17, 35, 50 und 70 kDa sichtbar. Rechts ist ein zugehöriges natives Gel (Bis-Tris 4-16 %) gezeigt. Es sind Banden bei etwa 80, 140 und 200 kDa sichtbar. Ein Stern entspricht einem mFI-StreptII-Monomer.

## 12.8 Reinigung von mFI-StreptII in LMNG



**Abbildung 12.9: Reinigung und SEC von mFI-StreptII in LMNG.** Links sind IMACs nach Solubilisierung in LDAO und LMNG dargestellt. Die Solubilisierung in LMNG resultiert in einer Bande in der Elutionsfraktion EF bei etwa 17 kDa, während nach Solubilisierung in LDAO zwei Banden bei 17 und 35 kDa sichtbar sind. Es ist ein 12 %-iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung gezeigt. Ein weiterer Unterschied war, dass die Lösung nach Solubilisierung in LDAO gelb ist, während sie nach Solubilisierung in LMNG farblos war. Die Elutionsfraktion der IMAC nach Solubilisierung in LMNG wurde konzentriert und der SUMO-Verdau, die StreptII-AC und eine IMAC in LMNG durchgeführt. Das in LMNG solubilisierte Protein bindet nicht an die StreptII-Matrix. Erkennbar ist, dass die untere Bande bei 17 kDa deutlich stärker ist als die obere bei 25 kDa. Es ist ein 12 %-iges SDS-Gel nach Silberfärbung gezeigt. Es wurde eine SEC in LMNG durchgeführt, wobei die vorherige Reinigung in LDAO und Fos12 erfolgte. Es wurde eine Superose 6 Increase 10/300 pg-Säule verwendet, die in GF1-Puffer mit 0,002 % LMNG äquilibriert war. Im Chromatogramm wurde die Absorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Es ist ein sehr scharfer Peak mit einem Maximum bei 17,7 mL erkennbar. Das 12 %-ige SDS-Gel rechts zeigt die Elutionsfraktionen. Es kommt zum Abbau des Proteins, was an den zwei deutlichen Banden um 11 kDa erkennbar ist, jedoch erschienen diese erst nach der SEC und dem Detergentzausch von Fos12 zu LMNG.



**Abbildung 12.10: HPLC-SAXS-Experimente mit mFI-StreptII in 0,001 % LMNG (links) und mit 5 % LMNG (rechts).** Injektion von 30  $\mu\text{L}$  mFI-StreptII (16 mg/mL) auf eine SD 200 Increase 5/150 GL-Säule, die mit 50 mM Tris pH 8, 150 mM KCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM TCEP und 0,001 % LMNG äquilibriert war. Rechts ist die Messung nach Injektion von 50  $\mu\text{L}$  5 %-iger LMNG-Lösung gezeigt. Die Auswertung erfolgte mit CHROMIXS. Der Vergleich beider Läufe zeigt die Koelution der LMNG-Mizelle mit Fos12 an, was in dem hohen Molekulargewicht von mFI-StreptII im MDa-Bereich resultiert und die Auswertung verhindert.

## 12.9 Auswertung der HPLC-SAXS Messungen

**Tabelle 12.1: Auswertung der ungeschnittenen SAXS-Kurven.** Die Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket PRIMUS (Konarev et al., 2003), Ambimeter (Petoukhov & Svergun, 2015) und DAMMIF (Atsas 3.1, Franke & Svergun, 2009), wobei die Daten des größten durch DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003) ermittelten Clusters angegeben sind. An den P1 Modellen war eine längliche Form erkennbar.

	Frame 1200-1250	Frame 1250-1300	Frame 1300-1350
<b>P(r)-Analyse</b>			
$I(0)$ (nm <sup>-1</sup> )	25,72	31,67	29,40
$R_g$ (nm)	3,98	3,61	3,50
$D_{\text{max}}$ (nm)	13,07	11,30	11,20
q Bereich (nm <sup>-1</sup> )	0,15-2,05	0,13-2,24	0,10-2,28
Qualität	0,89	0,88	0,77
$V_p$ (nm <sup>3</sup> )	261 (163 kDa)	151 (94 kDa)	84 (52 kDa)
Datmow (V, nm <sup>3</sup> )	132	102	60
Datmow (MW, kDa)	109	84	50
<b>Ambimeter</b>			
Ambiguitäts-Wert	1,0	1,0	1,477
Anzahl kompatibler Form-Kategorien	10	10	30

**Tabelle 12.2: DAMMIF-Ergebnisse in P1 unter Verwendung der ungeschnittenen Daten ( $q > 2,2$ ).** Es wurden jeweils 20 Modelle berechnet. In Klammern ist die Größe des größten Clusters angegeben und seine Auflösung. Das  $\chi^2$ , der  $D_{\text{max}}$  und das MW stammen vom repräsentativsten Modell des größten Clusters. Das Molekulargewicht entspricht dem Volumen durch zwei geteilt.

Frame	Symmetrie	[Å]	ICP	$\chi^2$	$D_{\text{max}}$ [nm]	MW [kDa]
1200-1250	P1 u (6)	31	32,39 (8,72)	1,104	15,15	70
	P1 o (7)	49	36,61 (7,84)	1,105	15,18	70
	P1 p (5)	24	33,04 (8,31)	1,103	14,81	70
1250-1300	P1 u (8)	31	25,18 (7,13)	1,127	12,95	40
	P1 o (9)	34	30,22 (8,19)	1,128	12,58	38
	P1 p (7)	36	30,47 (7,47)	1,124	12,37	39
1300-1350	P1 u (12)	38	35,66 (10,83)	1,194	10,72	17
	P1 o (9)	21	37,30 (14,73)	1,192	10,41	18
	P1 p (16)	32	36,46 (13,53)	1,187	10,54	17

**Tabelle 12.3: DAMMIF-Ergebnisse von Frame 1200-1250.** Es wurden jeweils 20 Modelle mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) aus Atsas 3.1.1 berechnet. Es ist die Auflösung des größten Clusters und die Anzahl der in diesem Cluster enthaltenen Modelle angegeben. Der ICP-Wert in Klammern gibt die Standardabweichung an. Der Chi<sup>2</sup>-Wert bezieht sich auf das repräsentativste Modell und soll zwischen 0,9 und 1,1 liegen. Das Volumen entspricht dem aus geschlossenem DAM-Volumen. Das daraus resultierende Molekulargewicht (Volumen/2) ist in kDa angegeben.

	Auflösung [Å]	Cluster	ICP	Chi <sup>2</sup>	D <sub>max</sub> [nm]	MW [kDa]
P1 u	19,8	14	11,48 (11,69)	0,980	13,65	187
P1 o	19,8	18	7,62 (6,29)	0,979	13,60	185
P1 p	18,6	16	6,95 (5,95)	0,980	13,40	160
P3 u	19,6	10	20,93 (15,71)	0,983	13,15	192
P3 o	26,7	14	21,45 (21,43)	0,983	14,11	178
P3 p	17,2	15	8,05 (13,66)	0,983	13,24	193
P4 u	15,4	9	6,29 (8,45)	0,982	13,30	205
P4 o	23,6	12	12,90 (12,97)	0,986	16,75	187
P4 p	13,7	14	2,67 (1,54)	0,983	13,24	205
P5 u	21,0	12	30,01 (24,39)	0,981	13,19	198
P5 o	29,2	13	25,17 (21,09)	0,994	15,03	176
P5 p	11,2	9	2,70 (1,36)	0,983	13,12	199
P6 u	18,6	9	40,10 (27,51)	0,987	13,52	195
P6 o	24,9	10	29,26 (22,81)	1,022	17,27	174
P6 p	14,1	9	11,01 (16,34)	0,989	13,40	195
P32 u	26,0	10	33,62 (27,13)	0,998	15,43	180
P32 o	23,3	16	23,99 (34,00)	0,992	14,80	180
P32 p	11,7	11	2,55 (5,82)	0,985	13,59	190
P7 u	16,9	15	17,74 (18,90)	0,987	13,39	203
P7 o	30,2	7	24,99 (21,87)	0,996	15,64	179
P7 p	3,3	11	2,54 (1,28)	0,989	13,22	205
P42 u	21,3	9	42,79 (30,96)	1,009	16,27	197
P42 o	3,8	9	28,64 (23,78)	1,004	17,23	197
P42 p	18,8	11	50,85 (36,34)	0,986	13,39	214
P8 u	19,0	16	17,02 (22,31)	0,990	13,29	205
P8 o	23,2	8	17,52 (14,35)	0,988	16,97	183
P8 p	3,3	8	2,87 (1,71)	0,993	14,18	208

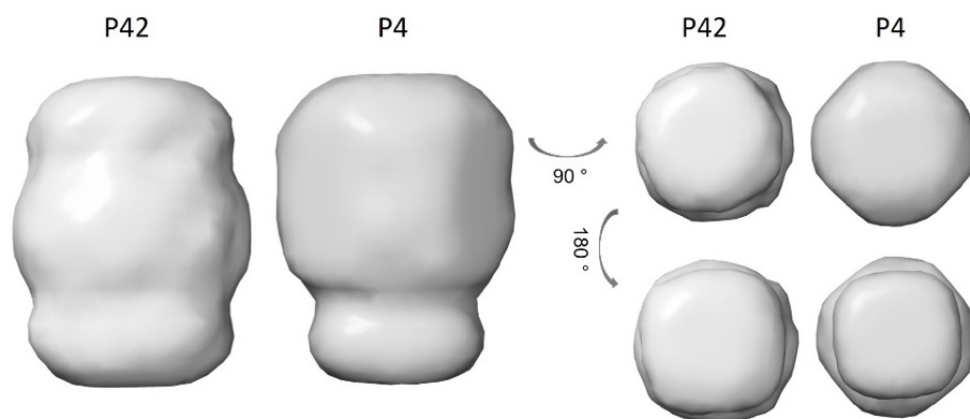
**Tabelle 12.4: Parameter von P1 Modellen verschiedener Formen für Frame 1250-1300 nach Verfeinerung mit DAMMIN (Svergun, 1999).** Das Molekulargewicht entspricht dem Volumen durch zwei geteilt.

Form	Chi <sup>2</sup>	R <sub>g</sub> [nm]	Volumen [Å]	MW [kDa]
unbekannt	1,043	3,63	286676	143 kDa
oblat	1,043	3,63	293807	146 kDa
prolat	1,043	3,63	301041	150 kDa

**Tabelle 12.5: DAMMIF-Ergebnisse für Frame 1250-1300.** Es wurden jeweils 20 Modelle mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) berechnet, um herauszufinden, welche Symmetrie am besten zu den experimentell bestimmten Daten passt. Für ideal überlagerte, gleichartige Objekte geht der ICP gegen 0. Der Chi<sup>2</sup>-Wert soll zwischen 0,9 und 1,1 liegen. Da P42p die beste Statistik aufwies, wurde mit dieser Symmetrie fortgefahren. Es ist die Auflösung des größten Clusters und das Chi<sup>2</sup> des repräsentativsten Modells angegeben.

Atsas 3.1.1	Auflösung [Å]	ICP	Chi <sup>2</sup>	D <sub>max</sub> [nm]	MW [kDa]
P1u	23	8,73 (3,58)	1,125	11,99	107
P1o	23	12,88 (9,60)	1,124	11,90	107
P1p	25	11,34 (5,21)	1,126	11,97	107
P2u	26	27,54 (12,57)	1,133	11,94	105
P2o	25	29,01 (11,36)	1,130	12,03	105
P2p	24	28,06 (10,88)	1,126	12,15	105
P3u	26	29,91 (13,53)	1,136	12,79	103
P3u 2	28	32,79 (13,49)	1,134	13,26	98
P3o	21	27,58 (15,87)	1,138	12,06	104
P3o 2	29	30,61 (14,67)	1,132	13,62	100

P3p	27	26,35 (15,61)	1,138	12,08	102
P3p 2	27	30,21 (15,56)	1,137	13,04	102
P222u	26	38,46 (19,99)	1,140	14,05	99
P222o	29	41,55 (20,50)	1,145	14,31	100
P222p	18	33,04 (15,95)	1,147	12,10	106
P4u	15	14,58 (17,20)	1,143	11,61	115
P4o	23	21,08 (12,42)	1,146	12,25	104
P4p	16	10,84 (11,82)	1,151	11,66	115
P4p 2	15	25,66 (18,21)	1,164	11,74	115
P5u	22	35,47 (17,60)	1,160	11,82	108
P5o	21	28,82 (17,89)	1,153	13,76	101
P5p	20	36,28 (20,70)	1,142	11,51	107
P32u	29	42,47 (20,01)	1,229	14,67	103
P32u 2	24	41,78 (19,12)	1,184	15,17	98
P32o	25	42,89 (23,72)	1,163	13,24	100
P32o 2	14	37,07 (22,78)	1,175	13,21	100
P32p	13	31,02 (27,35)	1,172	11,82	105
P32p 2	13	34,08 (28,64)	1,155	11,67	105
P6u	30	35,94 (22,94)	1,165	13,99	100
P6o	15	27,36 (19,95)	1,178	14,24	102
P6p	21	33,01 (20,79)	1,159	11,64	107
P42u	12	12,81 (14,23)	1,114	12,63	108
P42o	3	8,87 (12,76)	1,118	12,84	109
P42p	3	6,16 (11,56)	1,193	11,78	120
<b>DAMMIN</b>		NSD			
P42 p	27	0,507 (0,016)			
P4 p	27	0,475 (0,012)			



**Abbildung 12.11: Oberflächenmodell von mFI für Frame 1250-1300 in vierfacher Symmetrie.** Mit DAMMIN (Svergun, 1999) wurden jeweils 20 Modelle erstellt, die durch DAMAVER gemittelt wurden, wobei das NSD für die P4-Symmetrie 0,48 und für die P42-Symmetrie 0,51 betrug. Es sind die gemittelten Modelle dargestellt, die eine Ausdehnung von 120 x 93 Å besitzen. Das  $\chi^2$  beider Modelle beträgt 1,044, was die Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zeigt.

**Tabelle 12.6: DAMMIF-Ergebnisse (Atsas 3.2.1) für Frame 1300-1350.** Es wurden jeweils 20 Modelle mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) berechnet, um herauszufinden, welche Symmetrie am besten zu den experimentell bestimmten Daten passt. Für ideal überlagerte, gleichartige Objekte geht der NSD gegen 0, wobei ein Wert von etwa 0,5 eine gute Stabilität anzeigt. Der  $\chi^2$ -Wert soll zwischen 0,9 und 1,1 liegen. Es ist das  $\chi^2$  des Modells mit dem niedrigsten NSD angegeben.

Atsas 3.2.1	Auflösung	ICP	$\chi^2$	$D_{\max}$ [nm]	MW [kDa]
P1 u (4)	17	3,49 (0,21)	1,015	10,25	163
P1 o (5)	18	3,44 (0,21)	1,015	10,26	163
P1 p (7)	20	4,12 (0,31)	1,015	10,27	161
P2 u (5)	18	3,27 (0,73)	1,013	10,35	167
P2 o (4)	17	3,21 (0,64)	1,013	10,38	167
P2 p (6)	18	3,66 (0,73)	1,012	10,46	167

P3 u (10)	20	4,71 (2,57)	1,010	10,63	168
P3 o (14)	16	2,75 (1,27)	1,014	10,25	167
P3 p (8)	16	2,57 (1,29)	1,010	10,47	167
P4 u (8)	15	2,13 (0,88)	1,011	10,38	179
P4 o (14)	18	4,20 (3,81)	1,011	10,41	171
P4 p (7)	13	1,87 (0,75)	1,011	10,53	179
P222 u (6)	15	2,99 (1,09)	1,014	10,65	167
P222 o (9)	15	2,85 (1,16)	1,012	10,37	169
P222 p (7)	13	3,03 (1,03)	1,010	10,66	169
P5 u (11)	16	4,09 (2,67)	1,011	10,44	172
P5 o (8)	12	3,89 (3,19)	1,013	10,38	172
P5 p (10)	14	2,13 (0,87)	1,010	10,34	171
P6 u (10)	12	5,28 (2,95)	1,012	10,24	170
P6 o (7)	3	2,17 (0,84)	1,016	10,46	170
P6 p (8)	15	2,47 (1,28)	1,010	10,54	168
P32 u (13)	16	4,18 (3,04)	1,014	10,25	170
P32 o (13)	16	2,60 (1,45)	1,017	10,31	169
P32 p (10)	13	2,45 (3,75)	1,008	10,67	169
P7 u (7)	7	3,11 (2,77)	1,012	10,32	176
P8 u (15)	14	2,16 (1,78)	1,013	10,44	179
P8 o (11)	11	2,63 (2,47)	1,013	10,46	178
P8 p (10)	3	1,72 (0,90)	1,012	10,44	179
P42 u (17)	3	2,54 (3,03)	1,019	10,05	188
P42 o (8)	3	0,86 (0,43)	1,014	10,51	188
P42 p (10)	11	4,05 (4,38)	1,014	10,30	185

**Tabelle 12.7: DAMMIF-Ergebnisse für Frame 1300-1350 unter Verwendung der ungeschnittenen Daten ( $q > 2,2$ ) mit Atsas 3.2.1.** Der  $D_{\max}$  der verwendeten experimentellen Streukurve beträgt 11,20. Es wurden jeweils 20 Modelle mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) berechnet. In Klammern ist die Größe des größten Clusters angegeben und seine Auflösung. Das  $\chi^2$ , der  $D_{\max}$  und das MW stammen vom repräsentativsten Modell des größten Clusters. Das Molekulargewicht entspricht dem Volumen durch zwei geteilt.

Atsas 3.2.1	Auflösung	ICP	$\chi^2$	$D_{\max}$ [nm]	MW [kDa]
P1 u (12)	38	35,66 (10,83)	1,194	10,72	17
P1 o (9)	21	37,30 (14,73)	1,192	10,41	18
P1 p (16)	32	36,46 (13,53)	1,187	10,54	17
P2 u (10)	46	49,00 (17,77)	1,186	10,32	17
P3 u (7)	16	50,14 (25,40)	1,187	10,42	16
P4 u (8)	14	36,11 (29,53)	1,217	10,43	17
P222 u (18)	57	64,25 (31,14)	1,258	10,38	15
P5 u (8)	21	57,56 (27,37)	1,418	10,26	16
P6 u (10)	13	47,47 (34,21)	1,574	9,94	16
P32 u (5)	17	67,44 (29,93)	1,210	10,31	17
P7 u (9)	32	55,37 (32,18)	6,068	8,83	16
P8 u (12)	36	54,11 (29,75)	7,040	10,09	21
P42 u (10)	16	66,32 (38,78)	1,439	10,26	19

**Tabelle 12.8: Auswertung geschnittener HPLC-SAXS-Daten mit PRIMUS.** Die Messungen wurden bei verschiedenen Fos12-Konzentrationen durchgeführt.

geschnittene Daten	0,05 % Fos12	0,1 % Fos12	0,25 % Fos12
I(0)	25,64	49,71	42,32
$R_g$ (nm)	3,95	3,71	3,63
$D_{\max}$ (nm)	12,60	12,30	12,10
q Bereich ( $\text{nm}^{-1}$ )	0,15-1,46	0,14-1,42	0,12-1,45
Qualität	95 %	94 %	94 %

**Tabelle 12.9: DAMMIF-Ergebnisse für HPLC-SAXS-Messungen in 0,1 und 0,25 % Fos12 von geschnittenen und ungeschnittenen Daten.** Es wurden jeweils 20 Modelle mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) berechnet. In Klammern ist die Größe des größten Clusters angegeben und seine Auflösung. Das  $\chi^2$ , der  $D_{\max}$  und das MW stammen vom repräsentativsten Modell des größten Clusters. Das Molekulargewicht entspricht dem Volumen durch zwei geteilt.

<b>q = 0,14-2,16 nm<sup>-1</sup></b>						
<b>0,1 % Fos12</b>	<b>Auflösung [Å]</b>	<b>Cluster</b>	<b>ICP</b>	<b>Chi<sup>2</sup></b>	<b>D<sub>max</sub> [nm]</b>	<b>MW [kDa]</b>
P1 u	42	6	30,78 (8,08)	1,039	13,33	53
P1 o	47	10	30,31 (8,21)	1,037	13,66	52
P1 p	34	8	26,55 (6,26)	1,037	13,62	52
P3 u	24	7	39,53 (17,09)	1,053	13,16	51
P4 u	17	6	18,02 (11,87)	1,083	12,59	57
P32 u	25	7	51,39 (23,41)	1,247	11,40	54
P42 u	7	12	17,34 (16,48)	1,086	13,95	63
<b>0,25 % Fos12</b>	<b>Auflösung [Å]</b>	<b>Cluster</b>	<b>ICP</b>	<b>Chi<sup>2</sup></b>	<b>D<sub>max</sub> [nm]</b>	<b>MW [kDa]</b>
P1 u	24	7	24,75 (7,85)	1,091	12,77	44
P1 o	40	8	27,82 (7,28)	1,120	12,26	43
P1 p	25	7	26,28 (7,43)	1,098	13,06	44
P3 u	22	7	42,57 (19,69)	1,211	11,33	45
P4 u	18	12	21,13 (14,10)	1,149	11,44	48
P32 u	22	5	61,30 (29,36)	1,182	13,34	40
P42 u	12	12	29,22 (27,53)	1,185	13,95	50
<b>q = 0,13-1,44 nm<sup>-1</sup></b>						
<b>0,1 % Fos12</b>	<b>Auflösung [Å]</b>	<b>Cluster</b>	<b>ICP</b>	<b>Chi<sup>2</sup></b>	<b>D<sub>max</sub> [nm]</b>	<b>MW [kDa]</b>
P1 u	20	13	7,96 (7,04)	1,021	12,76	172
P1 o	20	16	5,72 (3,40)	1,024	12,70	167
P1 p	20	18	5,26 (4,69)	1,022	12,97	171
P3 u	17	9	15,38 (12,99)	1,053	12,72	173
P3 o	24	9	12,19 (13,36)	1,052	13,22	160
P3 p	18	19	5,17 (10,98)	1,055	12,58	173
P4 u	14	11	2,99 (3,31)	1,131	12,97	185
P4 o	24	9	12,78 (9,10)	1,054	14,81	166
P4 p	13	12	2,18 (0,99)	1,078	12,75	183
P32 u	14	10	16,70 (14,29)	1,117	12,86	174
P32 o	16	10	8,32 (17,85)	1,113	13,31	163
P32 p	21	16	8,52 (11,46)	1,184	13,64	162
P42 u	12	9	18,60 (15,43)	1,249	15,23	180
P42 o	11	15	12,34 (15,04)	1,228	15,07	178
P42 p	11	15	15,71 (18,52)	1,080	12,75	172
<b>0,25 % Fos12</b>	<b>Auflösung [Å]</b>	<b>Cluster</b>	<b>ICP</b>	<b>Chi<sup>2</sup></b>	<b>D<sub>max</sub> [nm]</b>	<b>MW [kDa]</b>
P1 u	21	14	6,81 (4,41)	0,994	12,68	162
P1 o	22	13	6,74 (2,91)	0,995	13,09	156
P1 p	19	18	4,02 (1,26)	0,996	12,74	162
P3 u	17	12	13,12 (12,78)	1,040	12,51	164
P3 o	29	13	11,21 (10,70)	1,034	14,04	153
P3 p	18	17	3,65 (7,19)	1,045	12,60	164
P4 u	14	18	5,30 (8,73)	1,067	12,51	174
P4 o	25	9	11,54 (8,03)	1,037	14,68	159
P4 p	13	8	1,89 (0,72)	1,083	12,81	175
P32 u	27	10	15,5 (13,41)	1,143	14,78	155
P32 o	21	13	7,73 (7,11)	1,145	13,64	153
P32 p	15	17	6,34 (12,43)	1,138	12,45	165
P42 u	12	9	20,29 (19,82)	1,240	15,94	173
P42 o	8	10	11,85 (14,06)	1,285	16,37	175
P42 p	12	14	12,31 (16,15)	1,161	12,54	185

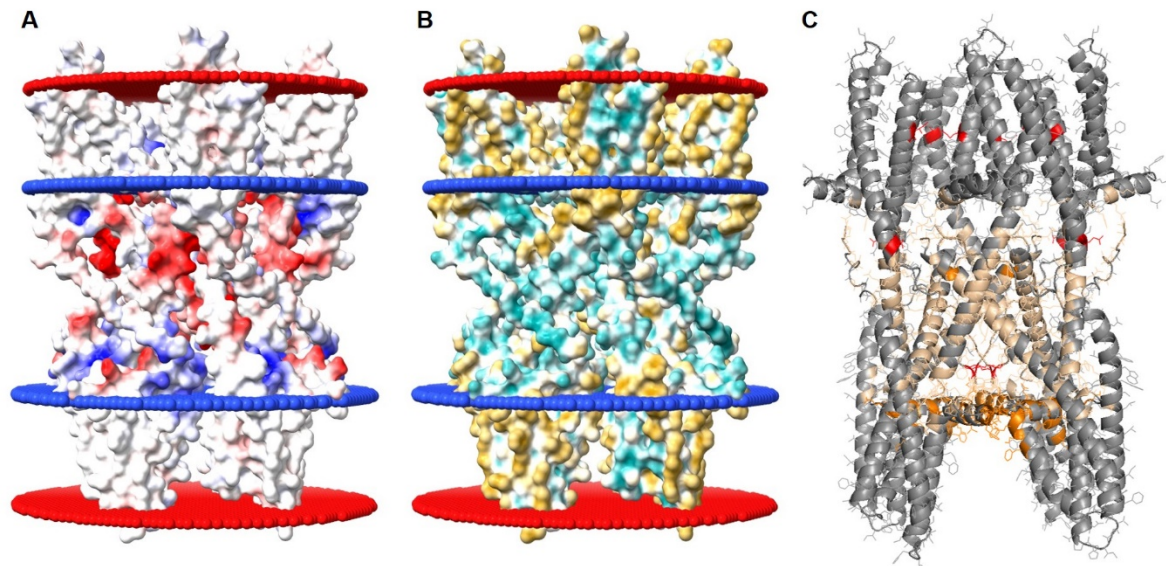


**Tabelle 12.10: Auswertung der HPLC-SAXS-Messung von mFI-StrepII und NB14 mit DAMMIF (Atsas 3.2.1).** Der  $D_{\max}$  der verwendeten experimentellen Streukurve beträgt 17,90 nm. Es wurden jeweils 20 Modelle mit DAMMIF (Franke & Svergun, 2009) berechnet. In Klammern ist die Größe des größten Clusters angegeben und seine Auflösung. Das  $\chi^2$ , der  $D_{\max}$  und das MW stammen vom repräsentativsten Modell des größten Clusters. Das Molekulargewicht entspricht dem Volumen durch zwei geteilt.

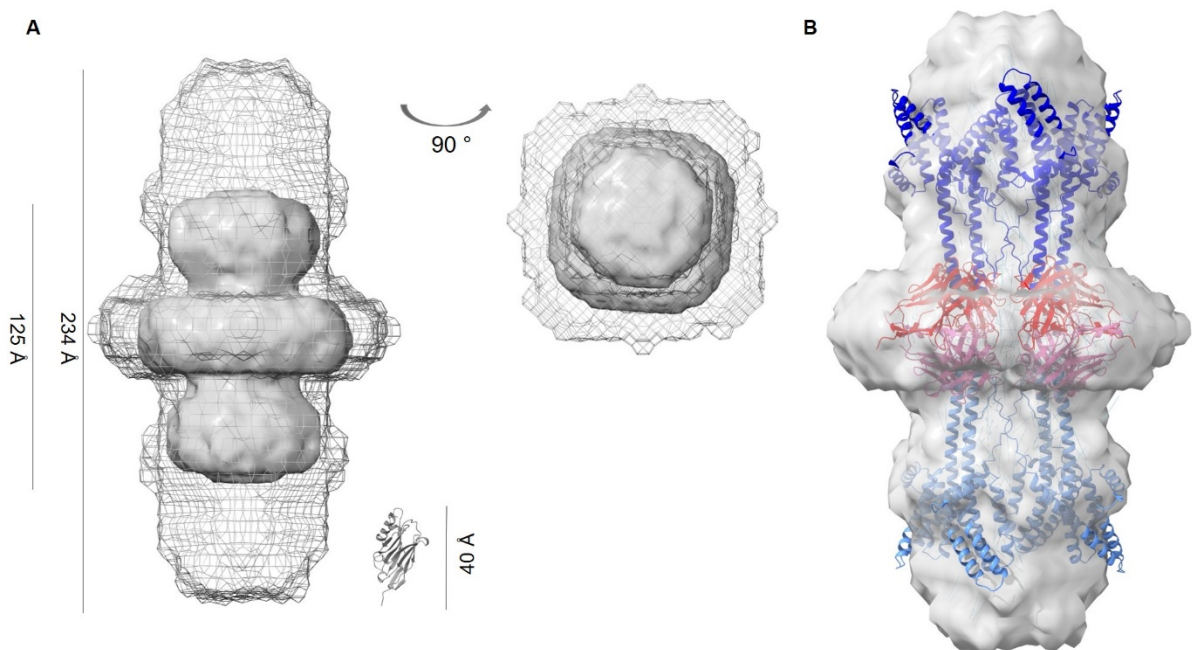
	Auflösung [Å]	Cluster	ICP	$\chi^2$	$D_{\max}$ [nm]	MW [kDa]
<b>Frame 237-263, <math>D_{\max}</math> 17,90 (84%)</b>						
P1 u	51	8	52,50 (34,24)	1,037	20,51	258
P1 o	46	10	54,67 (38,04)	1,041	21,06	254
P1 p	44	12	38,47 (20,51)	1,042	20,53	257
P3 u	54	10	148,34 (104,31)	1,076	20,83	246
P3 o	57	10	126,78 (96,82)	1,043	21,45	247
P3 p	62	11	136,29 (102,42)	1,034	20,64	243
P32 u	50	7	171,40 (141,83)	1,168	21,55	251
P32 o	38	8	137,28 (118,03)	1,104	22,68	251
P32 p	19	15	110,81 (147,37)	1,052	19,44	257
P4 u	26	8	14,98 (15,74)	1,036	19,82	279
P4 o	39	13	66,91 (52,49)	1,112	28,74	263
P4 p	11	8	12,49 (9,44)	1,026	19,92	273
P42 u	12	9	125,75 (122,74)	1,206	26,70	294
P42 o	26	15	167,80 (176,76)	1,261	25,75	288
P42 p	9	8	180,57 (138,52)	1,079	22,02	293

**Tabelle 12.11: SASREF- und FoXS-Ergebnisse aus der HPLC-SAXS-Messung von mFI im Komplex mit NB14.** Ein - hinter dem  $\chi^2$  von SASREF zeigt die vermutlich falsche Orientierung von mFI-Monomeren an. Als Aminosäurekontakte wurden in SASREF die Kontakte AS52(NB14) mit AS160(mFI) und AS47(NB14) mit AS168(mFI) mit einer Distanz von 2,5 Å angegeben.

	SASREF	FoXS	FoXS
Symmetrie	$\chi^2$	$\chi^2$	Rg
<b>P32</b>	<b>Kontakte 52↔160, 47↔168, 2,5 Å</b>		
1	2,4 +	2,12	5,72
2	2,4 -		
3	3,1 -		
4	4,7 -		
5	3,0 +	21,03	5,83
6	2,2 +	13,67	5,81
7	2,5 +	28,19	5,78
8	2,3 +	3,13	5,33
9	2,5 +	18,58	5,75
10	2,9 ~		
<b>P42</b>	<b>Kontakte 52↔160, 47↔168, 2,5 Å</b>		
1	5,2 -		
2	3,8 -		
3	1,8 +	11,48	5,84
4	4,6 -		
5	2,0 +	44,64	6,19
6	3,4 -		
7	9,9 -		
8	4,4 -		
9	2,8 -		
10	2,3 +	15,40	5,93



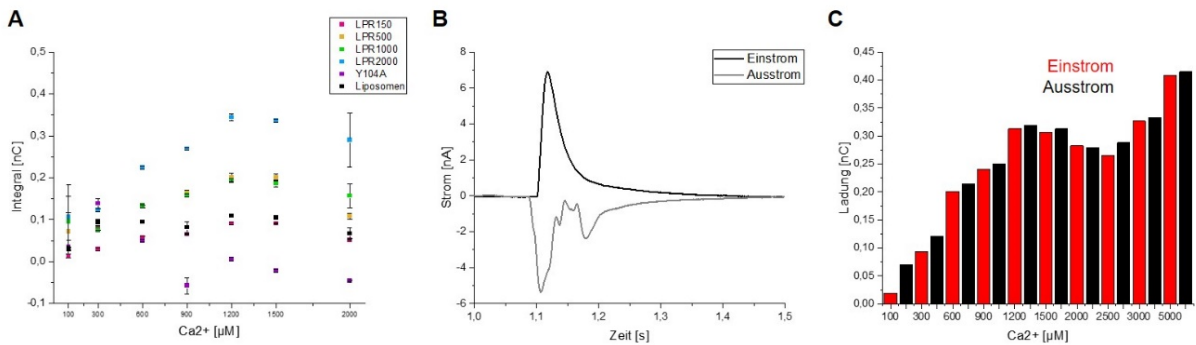
**Abbildung 12.12: Analyse des Strukturmodells von mFI in P4-Symmetrie von Frame 1250-1300.** Das Strukturmodell wurde auf Basis des AlphaFold-Modells mit SASREF erstellt und mit SREFLEX verfeinert. Die Membran auf der zytoplasmatischen Seite ist blau dargestellt, die auf der zytosolischen Seite rot (PPM 3.,0, Lomize et al., 2021). **A** Elektrostatisches Potential und **B** Hydrophobizität der Aminosäuren (Ghose et al., 1998). Die Abbildungen wurden mit ChimeraX (Pettersen et al., 2004) erstellt. **C** Interagierende Reste innerhalb der Tetramere sind in rot und orange dargestellt. Interagierende Reste zwischen den Tetrameren sind beige gefärbt. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (Lilkova, 2015).



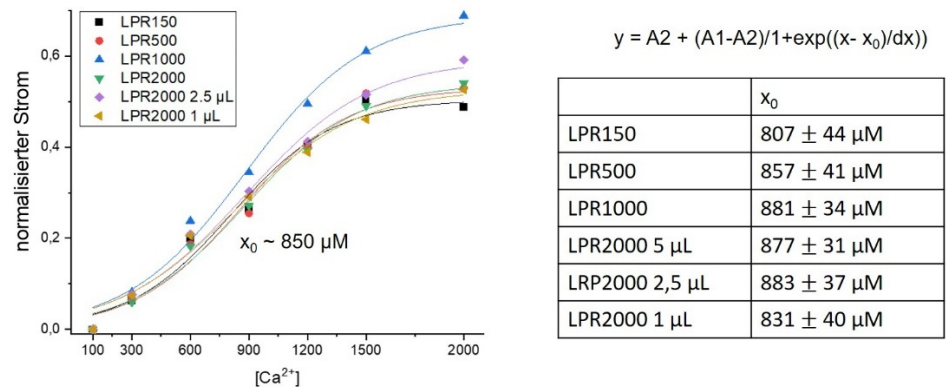
**Abbildung 12.13: Oberflächenmodell des mFI-NB14-Komplexes in vierfacher Symmetrie.** **A** Dargestellt ist die Dichtekarte des Modells in P42-Symmetrie mit einer Auflösung von 20 Å in Gitterdarstellung. Zum Vergleich ist die Dichtekarte des mFI-Oberflächenmodells von mFI in Fos12 abgebildet. Zum Größenvergleich ist die Struktur des NB14-P4-Komplexes gezeigt. **B** Strukturmodell des mFI-NB14-Komplexes erstellt mit SASREF. Das  $\chi^2$  beträgt 1,8. Als Kontakte wurden AS52(NB14) mit AS160(mFI) und AS47(NB14) mit AS168(mFI) mit einer Distanz von 2,5 Å angegeben.



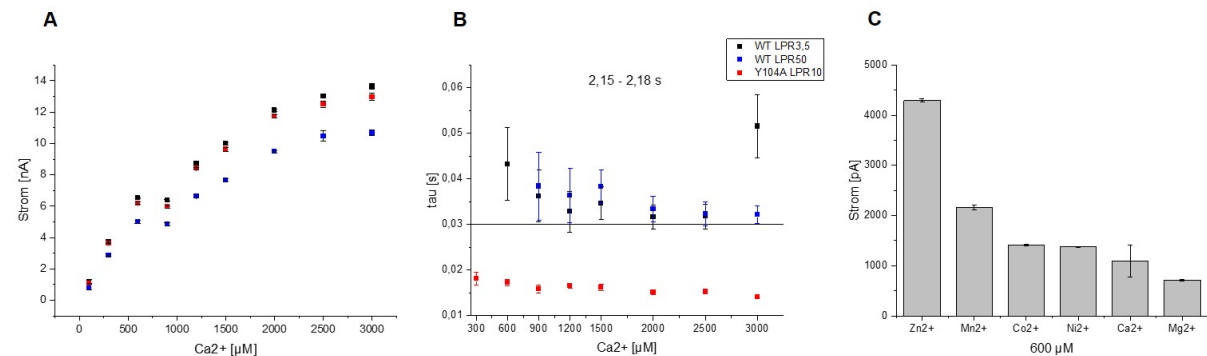
12.10 SSM-Experimente



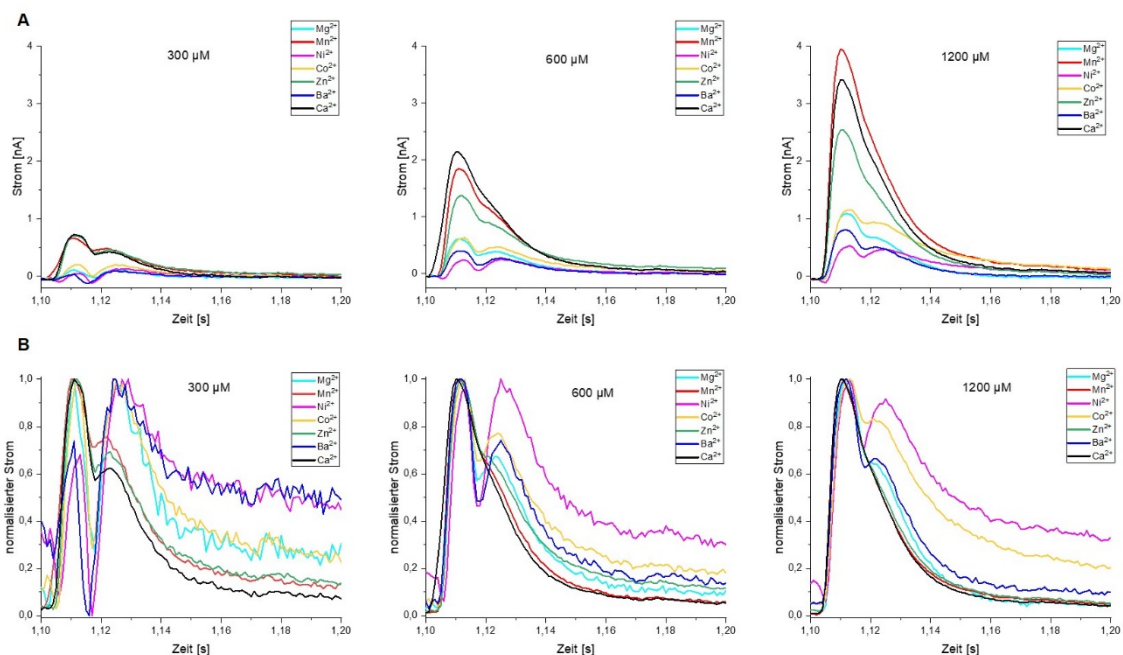
**Abbildung 12.14: Ladungstransfer und Vergleich von Calcium-Ein- und Ausstrom auf 1 mm Sensoren.** **A** Auftragung der translozierten Ladung gegen die Calcium-Konzentration. **B** Auftragung des Stroms gegen die Zeit, wobei für den Peak des Einstroms die Zeitspanne zwischen 1 und 2 s mit dem aktivierenden Puffer, für den Ausstrom die Zeitspanne zwischen 2 und 3 s nach Wechsel zum nicht-aktivierenden Puffer verwendet wurde. **C** Auftragung der translozierten Ladung zwischen 1 und 2 s (Einstrom) und 2 und 3 s (Ausstrom).



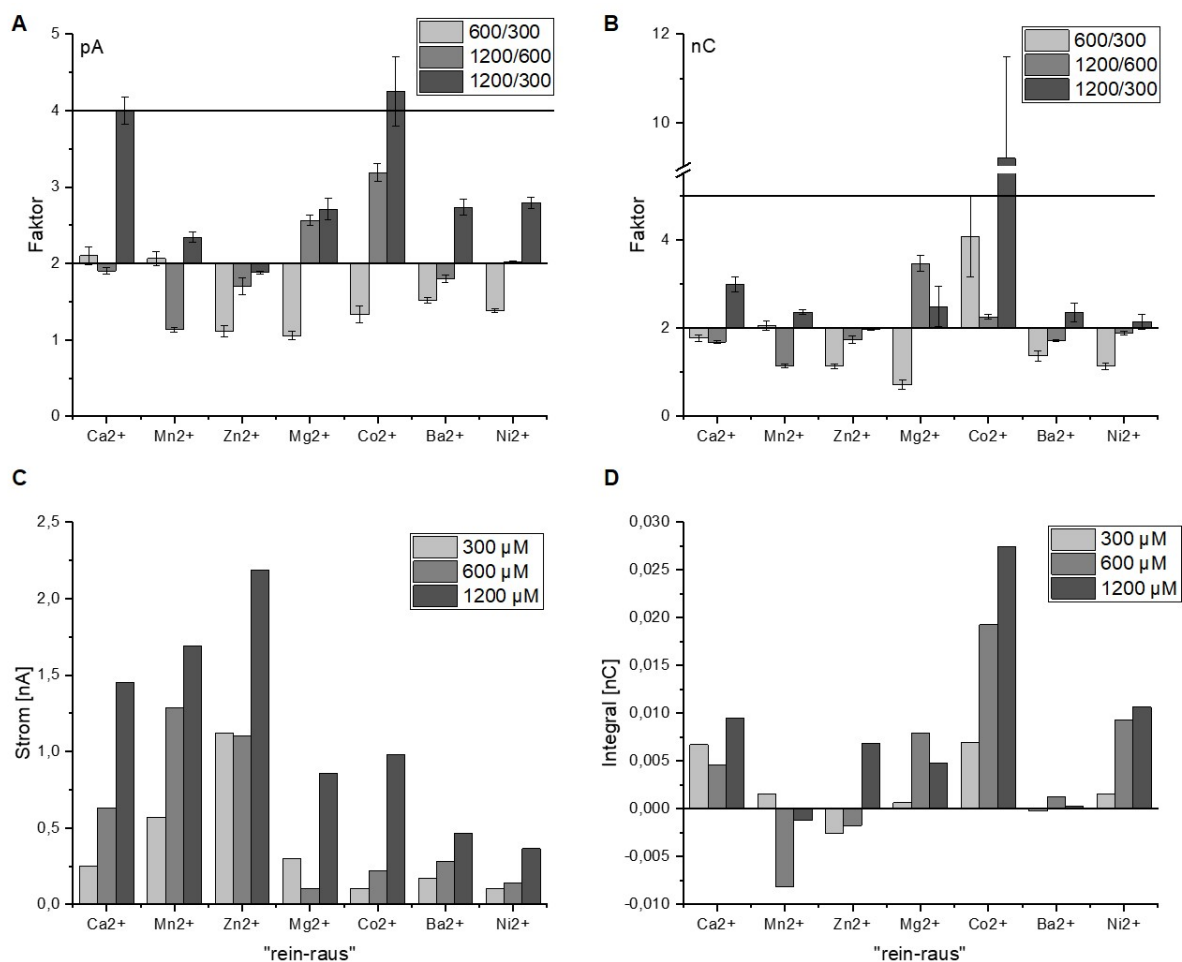
**Abbildung 12.15: Durch Calcium induzierte, normalisierte Ströme bei verschiedenen LPRs.** Ein sigmoidaler Fit ergab für alle LPRs eine halbmaximale Stromstärke bei etwa 850 µM Calcium.



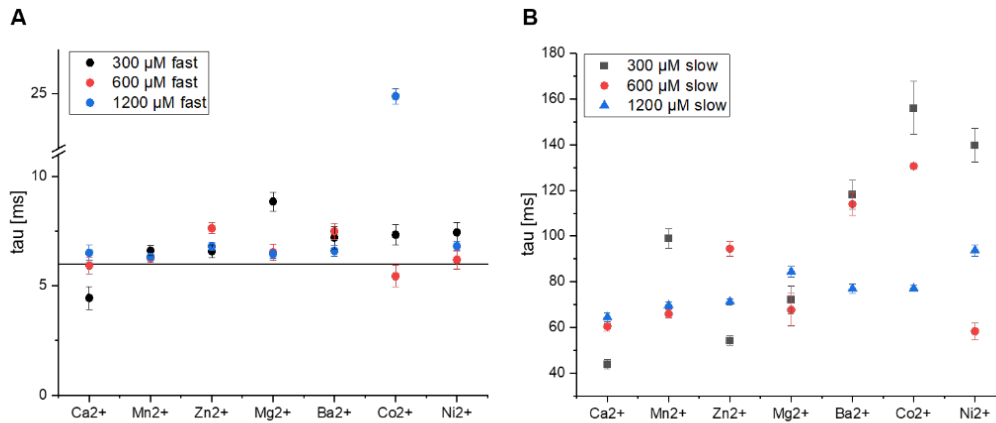
**Abbildung 12.16: Durch Calcium induzierte Ströme auf 3 mm Sensoren an der SSM und Berechnung der Abklingzeit für mFI(Y104A)-StreptII.** **A** Auftragung der Calcium-Ströme, die bei verschiedenen LPRs gemessen wurden, gegen die Calcium-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen von 100 bis 3000 µM Calcium mit der Standardabweichung. **B** Berechnung der Abklingzeit zwischen 2,15 und 2,18 s. Die Auflösungsgrenze des Sensors beträgt 30 ms. Für alle Fits gilt R<sup>2</sup> > 0,99. **C** Durch verschiedene zweiwertige Ionen induzierte Ströme an der SSM auf einem 1 mm Sensor.



**Abbildung 12.17:** Durch 300, 600 und 900 µM induzierte Ionenströme an der SSM von mFI mit LPR2000. **A** Darstellung der Ionenströme in vergrößerter Ansicht. **B** Normalisierte Ionenströme in vergrößerter Ansicht.

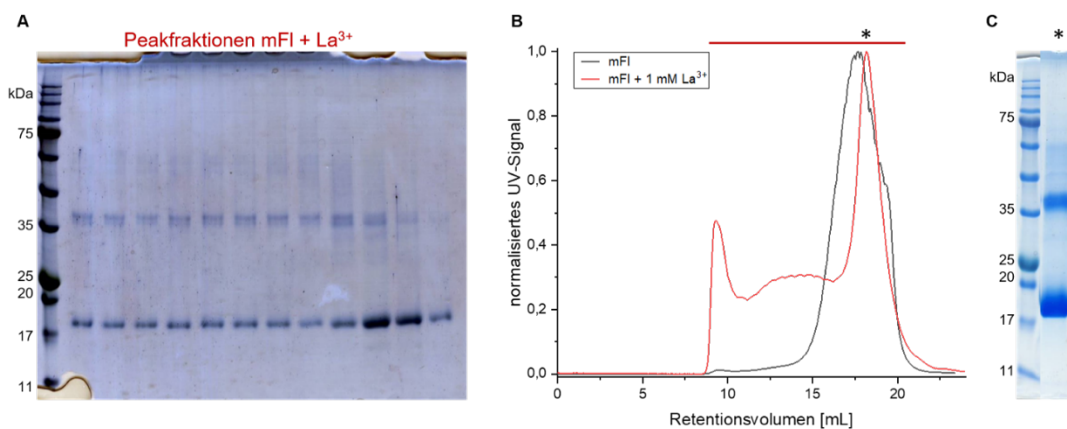


**Abbildung 12.18:** Ladungstransfer und Ströme nach Testen verschiedener Ionen. **A,B** Faktor, um den sich die Stromstärke (A) oder der Ladungstransfer (B) bei Verdopplung bzw. Vervielfachung der Ionenkonzentration erhöht hat. **C,D** Differenz des Peaks zwischen 1-2 s (aktivierender Puffer) und 2-3 s (nicht-aktivierender Puffer) unter Berücksichtigung der Stromstärke (C) und des Ladungstrfers (D).



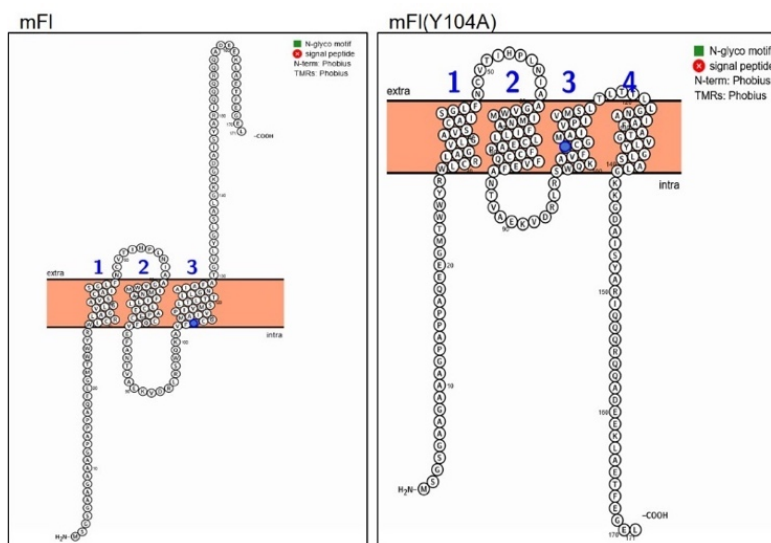
**Abbildung 12.19: Abklingzeiten nach Ersetzen von Calcium im aktivierenden Puffer durch andere zweiwertige Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen. A schnelle Abklingzeit. B langsame Abklingzeit.**

### 12.11 SEC von mFI-StreptII mit Lanthan

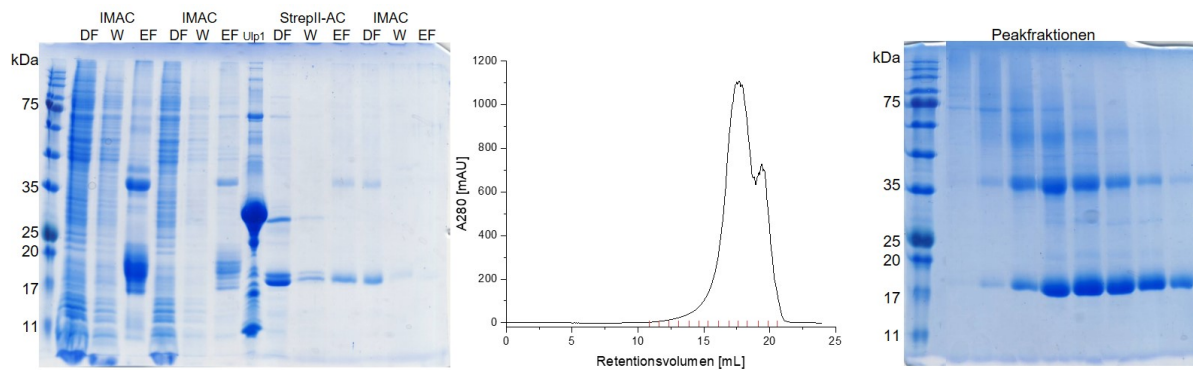


**Abbildung 12.20: SEC von mFI in Anwesenheit von Lanthan. A** 12 %-iges SDS-Gel nach SEC von mFI in Anwesenheit von 1 mM LaCl<sub>3</sub>. **B** Chromatogramme der SECs von mFI und mFI nach Zugabe von 10 mM LaCl<sub>3</sub> zur Probe und 1 mM LaCl<sub>3</sub> in GF1-Puffer. Es wurde das normalisierte UV-Signal gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. **C** 12 %-iges SDS-Gel der im Chromatogramm mit Stern markierten Fraktion. Die Zugabe von Lanthan führte zu einem Aggregatpeak. Der hintere Peak ist deutlich spitzer und die Banden im SDS-Gel definierter mit einer stärkeren Monomerbande.

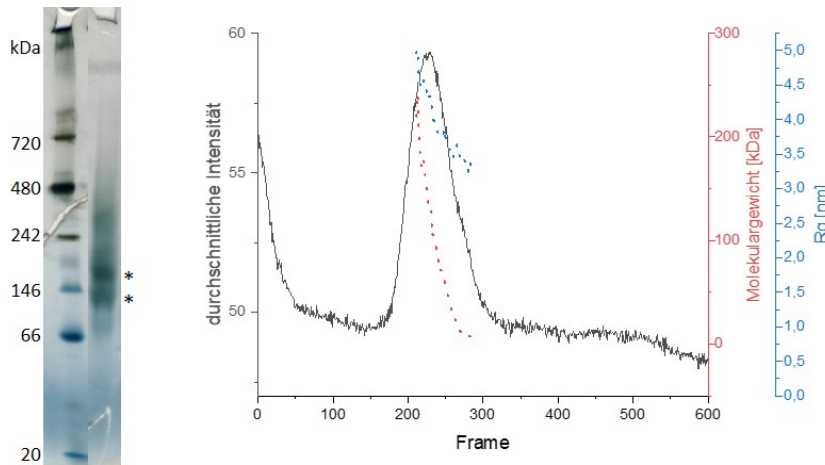
### 12.12 Klonierung, Produktion, Reinigung und Charakterisierung von mFI(Y104A)-StreptII



**Abbildung 12.21: Vorhersage von Transmembrandomänen für mFI und mFI(Y104A) nach Sequenzanalyse durch Protter (Omasits et al., 2014). Y104 bzw. A104 sind durch einen blauen Kreis markiert.**

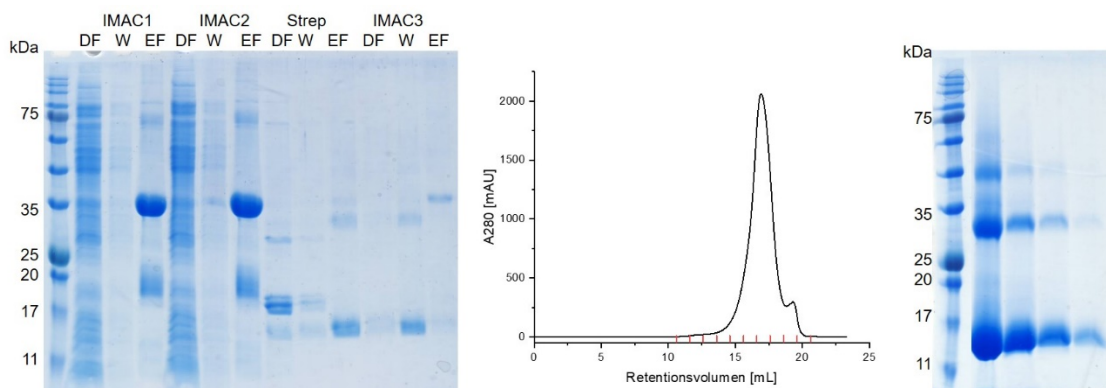


**Abbildung 12.22: Reinigung und SEC von mFI(Y104A)-StreptII.** Links ist das 12 %-ige SDS-Gel der Reinigung nach Coomassie-Färbung gezeigt. Die Reinigung erfolgt analog zur Reinigung von mFI-StreptII und im SDS-Gel zeigt sich kein Unterschied. Die Durchfluss- und Waschfraktion der 3. IMAC wurden konzentriert und auf eine Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule, die in GF1-Puffer äquilibriert war, injiziert. Es wurde die Absorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Die im Chromatogramm rot markierten Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE analysiert. Es zeigen sich zu Beginn des Peaks Banden höheren Molekulargewichts sowie die typischen Banden bei 17 und 35 kDa.



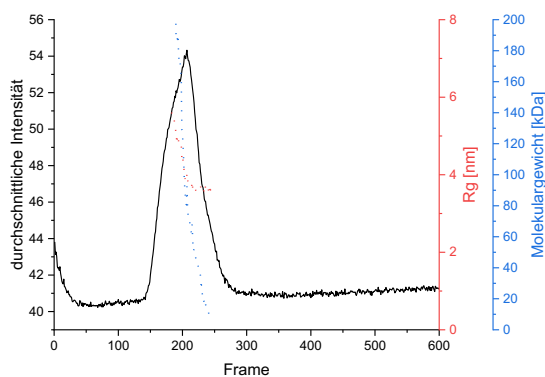
**Abbildung 12.23: HPLC-SAXS-Experiment mit mFI(Y104A)-StreptII und native PAGE.** Eine mFI(Y104A)-Probe nach der SEC wurde mittels nativer PAGE (Bis-Tris Gel 4-16 %) analysiert. Die deutlichsten Banden zeigen sich bei Molekulargewichten von etwa 120 und 190 kDa, die durch einen Stern markiert sind. Auswertung des HPLC-SAXS-Experiments mit CHROMIXS. Im Verlauf des Peaks fällt das Molekulargewicht stark ab. Im hinteren Teil des Peaks ist der  $R_g$  relativ konstant und liegt mit etwa 3,5 nm im Bereich von mFI-StreptII, woraus sich schließen lässt, dass mFI(Y104A)-StreptII das gleiche Oligomerisierungsverhalten wie mFI-StreptII aufweist.

### 12.13 Klonierung, Produktion, Reinigung und Charakterisierung von mFIdC-StreptII



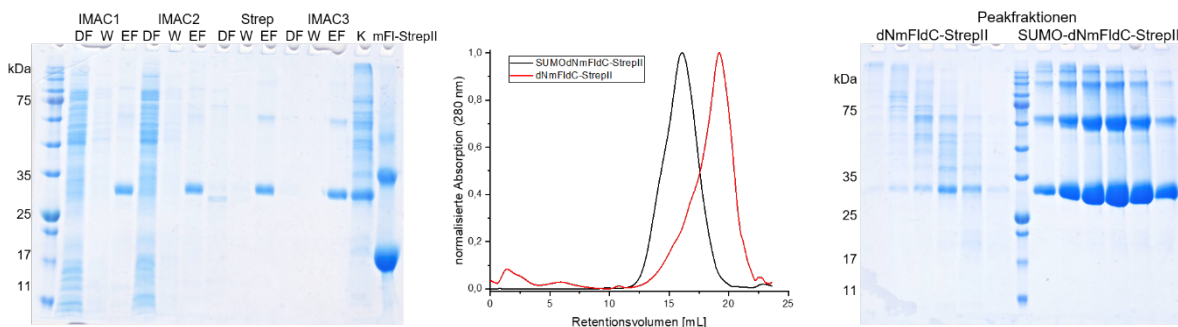
**Abbildung 12.24: Reinigung und SEC von mFIdC-StreptII.** 12 %-iges SDS-Gel der Reinigung nach Coomassie-Färbung. In der Durchfluss- und Waschfraktion (DF und W) der IMAC 3 liegt gereinigtes mFIdC-StreptII vor. Die Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf eine mit GF1-Puffer äquilibrierte Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule injiziert. Im Chromatogramm wurde die Absorption bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Das 12 %-ige SDS-Gel nach Coomassie-Färbung zeigt die Hauptfraktionen des Peaks.





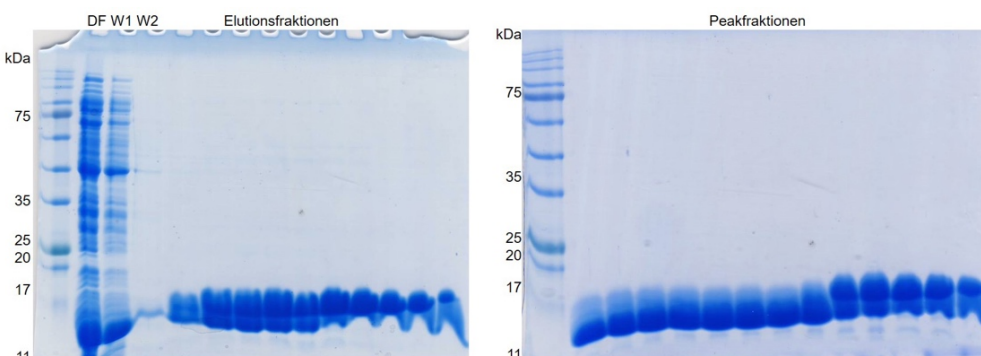
**Abbildung 12.25: HPLC-SAXS-Messung von mFIdC-StreptII.** 50  $\mu$ L mFIdC-StreptII (30 mg/mL) wurden auf eine mit GF1-Puffer (0,05 % Fos12) äquilibrierte Superdex200 Increase 5/150-Säule injiziert. Die Auswertung erfolgte mit CHROMIXS. Das im Peakverlauf abfallende Molekulargewicht verhindert eine weitere Auswertung. Im Bereich von Frame 250, wo der  $R_g$  relativ konstant ist, kommt es zur Koelution der Fos12-Mizelle, was ebenfalls die Auswertung verhindert. Der  $R_g$  von etwa 3,7 in diesem Bereich weist darauf hin, dass mFIdC-StreptII das gleiche Oligomerisierungsverhalten wie mFI-StreptII zeigt.

## 12.14 Klonierung, Produktion, Reinigung und Kristallisation von SUMOdNmFIdC-StreptII



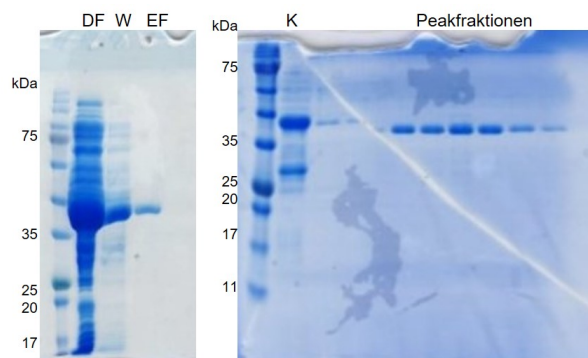
**Abbildung 12.26: Reinigung und SEC von SUMOdNmFIdC-StreptII.** 12 %-iges SDS-Gel der Reinigung nach Coomassie-Färbung. In der Durchfluss- und Waschfraktion (DF und W) der IMAC 3 liegt in geringer Menge gereinigtes dNmFIdC-StreptII vor, was durch Aufkonzentrieren beider Fraktionen im Gel erkennbar wird (K). Der größte Teil des Proteins wurde nicht durch die SUMO-Protease Ulp1 verdaut, was an der starken Bande in IMAC 3 EF erkennbar ist. Im Gegensatz zu dNmFIdC-StreptII liegt SUMOdNmFIdC-StreptII sauber vor. Mit beiden Konstrukten wurde mit einer Superose 6 Increase 10/300 GL-Säule, die in GF1-Puffer äquilibriert war, eine SEC durchgeführt. dNmFIdC-StreptII (rot) eluiert deutlich später. Nach Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE wird deutlich, dass bei dNmFIdC-StreptII nach Coomassie-Färbung ebenfalls Banden bei 30 und 70 kDa gefärbt sind, die den Banden von SUMO-dNmFIdC-StreptII entsprechen. Somit lässt sich die spätere Elution nicht mehr erklären. SUMO-dNmFIdC-StreptII liegt sauber vor und wurde kristallisiert.

## 12.15 Reinigung von Calmodulin



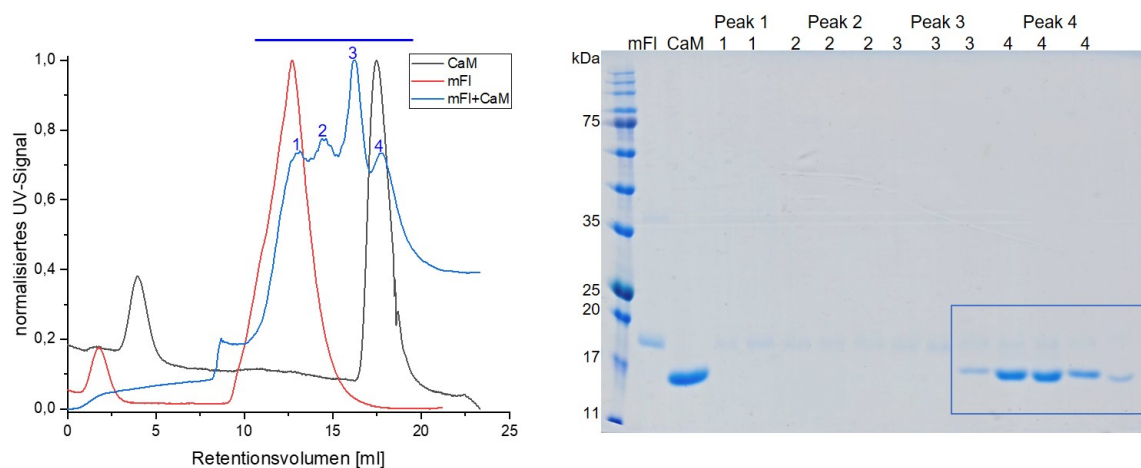
**Abbildung 12.27: HIC und SEC von Calmodulin.** Die HIC besteht aus einem Waschschriff mit Calcium-haltigen Niedersalzpuffer (W1) und Hochsalzpuffer (W2), woraufhin die Elution mit EGTA-haltigem Puffer erfolgt. Die Elutionsfraktionen wurden konzentriert und auf eine mit H<sub>2</sub>O äquilibrierte SD75 10/600 p-Säule injiziert. Es sind die 12 %igen SDS-Gele der Proben nach Coomassie-Färbung gezeigt.

## 12.16 Reinigung von GST-Calmodulin



**Abbildung 12.28: 12 %-ige SDS-Gele der Reinigung von GST-CaM.** Proben der GSH-Reinigung (links) und Fraktionen der SEC nach Coomassie-Färbung. Aufgrund der geringen Bindekapazität der GSH-Säule wird die Reinigung mit dem Durchfluss DF mehrmals wiederholt.

## 12.17 SEC von mFI und CaM



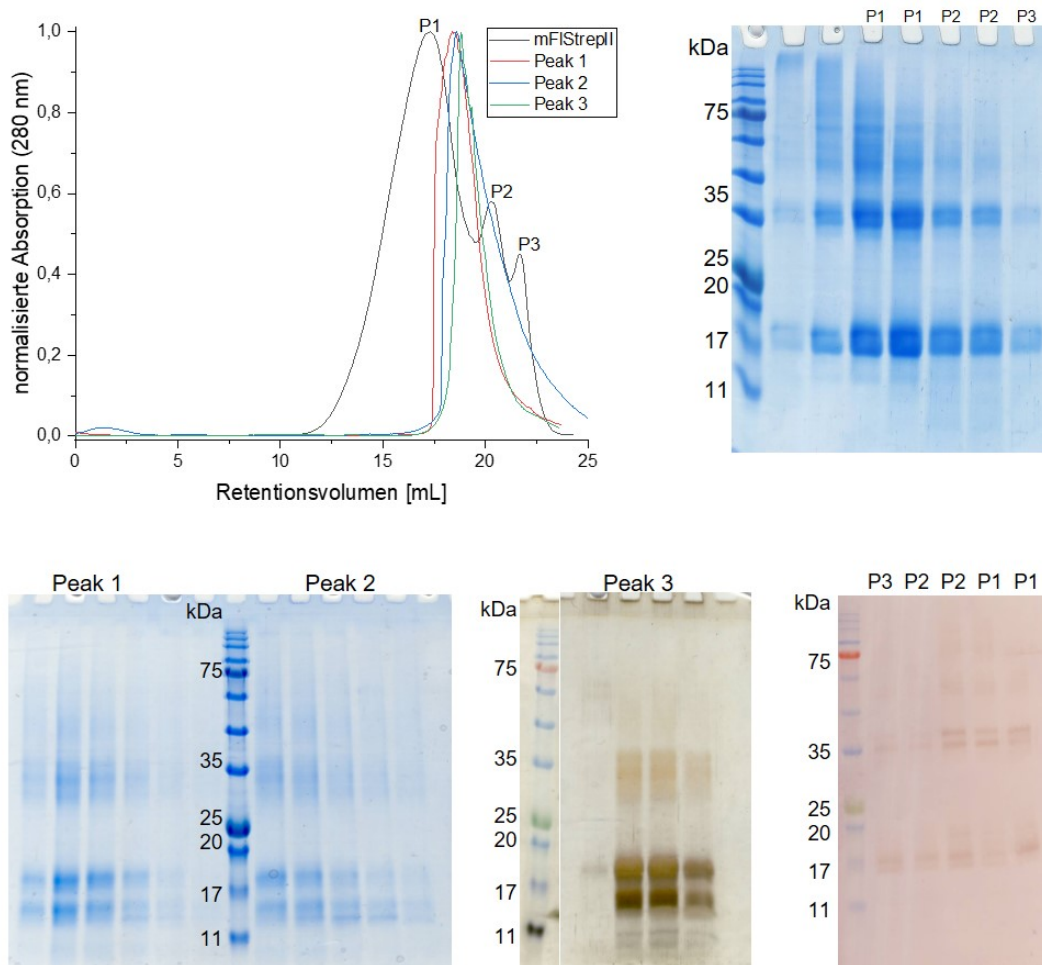
**Abbildung 12.29: SEC von mFI und CaM.** 1 mM mFI und 1,2 mM CaM wurden auf eine SD200 10/300 Increase-Säule, die mit GF2-Puffer (Tris pH 8) äquilibriert war, injiziert. Im Chromatogramm wurde das normalisierte UV-Signal gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Das 12 %-ige SDS-Gel zeigt die Proben der Elutionsfraktionen, die im Chromatogramm durch einen blauen Balken markiert sind. Nur im hinteren Teil von Peak 3 und in Peak 4 konnte eine Koelution beobachtet werden.

## 12.18 Kristallisation von mFI, mFI-Varianten und Kokristallisation

**Tabelle 12.12: Getestete Kristallisationsbedingungen und Anzahl gemessener Kristalle.**

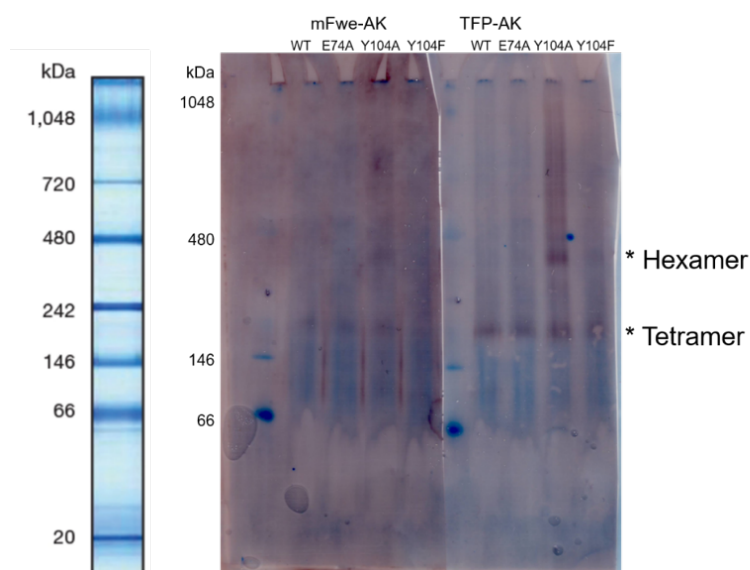
Protein	Mindestanzahl Bedingungen	Anzahl Kristalle	Struktur
mFI-StrepII	15504	2126	-
mFI(G812L)-StrepII	960	115	-
SUMOdNCmFI-StrepII	1344	165	-
mFI-StrepII + CaM	8448	329	-
mFI-StrepII + NB14	2112	188	-
CaM + P1, P2	2112	165	+
NB14 + P4	2544	193	+

### 12.19 mFI-Oligomere in Fos12 sind dynamisch



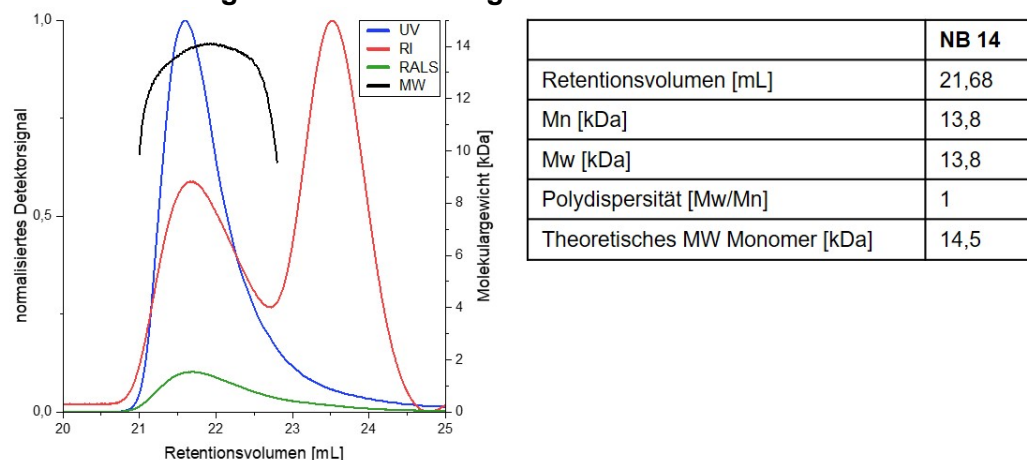
**Abbildung 12.30: SECs von mFI-StrepII.** Mit mFI, das 15 Tage bei 4 °C gelagert wurde, wurde eine SEC mit einer Superose 6 Increase 10/300 pg-Säule durchgeführt. Der GF1-Puffer enthielt kein TCEP. Dies resultierte in den drei Peaks P1, P2 und P3, die mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Anschließend wurden die Fraktionen der drei Peaks getrennt aufkonzentriert und jeweils eine weitere SEC durchgeführt, wobei der Puffer weder Fos12 noch TCEP enthielt. Die drei Proben eluierten alle bei dem gleichen Retentionsvolumen von etwa 19 mL, was zwischen P1 und P2 liegt. Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigt keine Unterschiede zwischen den Proben auf. Da jeweils zwei Banden um 17 kDa und zwei Banden um 35 kDa vorliegen, wurde mittels Western-Blot überprüft, ob es sich um abgebautes Protein handelt. Die Detektion durch den StrepII-Antikörper zeigt, dass zumindest der C-Terminus noch vollständig vorhanden ist und ein N-terminaler Abbau stattfand.

## 12.20 mFwe aus CTLs bildet Oligomere



**Abbildung 12.31: Western-Blot nach nativer PAGE von Lysat aus stimulierten CTLs mit überexprimierten TFP-mFwe-Varianten.** Die Zellen und Antikörper wurden von der AG Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM, UdS) zur Verfügung gestellt. Der Lysepuffer enthielt 50 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl, 250  $\mu$ M PMSF, 1 mM EDTA und 1 % Triton X-100. Die Detektion erfolgte mit einem mFwe- und einem TFP-Antikörper. Das MW eines TFP-mFwe-Monomers beträgt etwa 43 kDa. MFwe-WT, mFwe-E74A, mFwe-Y104A und mFwe-Y104F bilden alle Tetramere, was anhand der Bande bei  $\sim$  200 kDa erkennbar ist. In allen Varianten ist eine weitere Bande bei etwa 300 kDa zu erkennen, die in der Y104A-Variante besonders stark ist, wobei es sich um ein Hexamer handeln würde.

## 12.21 Molekulargewichtbestimmung von NB14



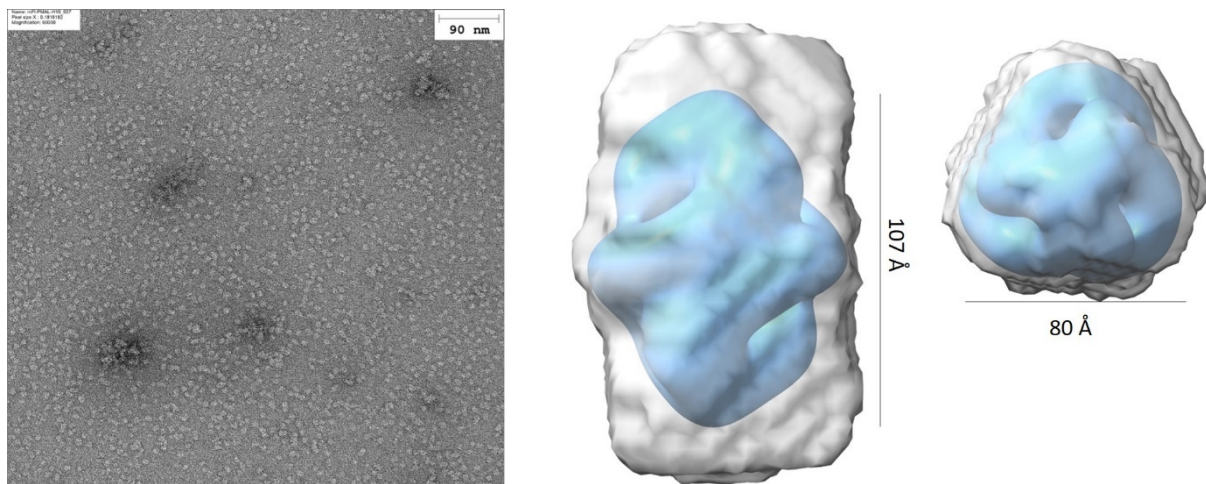
**Abbildung 12.32: Molekulargewichtsbestimmung von NB14 durch SEC mit RI- und RALS-Messung.** Die Elutionsfraktion der IMAC wurde aufkonzentriert und auf eine Superose 6, 10/300 Säule, die mit PBS-Puffer äquilibriert war, injiziert. Es wurden die normalisierten Detektorsignale gegen das Retentionsvolumen aufgetragen, wobei das Signal des UV-Detektors in blau, das Signal des RI-Detektors in rot und das Signal des RALS-Detektors in grün dargestellt ist. Die schwarze Linie repräsentiert das berechnete Molekulargewicht. In der Tabelle sind die berechneten Molekulargewichte des Peaks angegeben. Das angegebene Retentionsvolumen entspricht der Mitte des Peaks. Der zweite starke Peak des RI-Signals nach einem Säulenvolumen stammt vermutlich von sich in der Probe befindendem Imidazol.



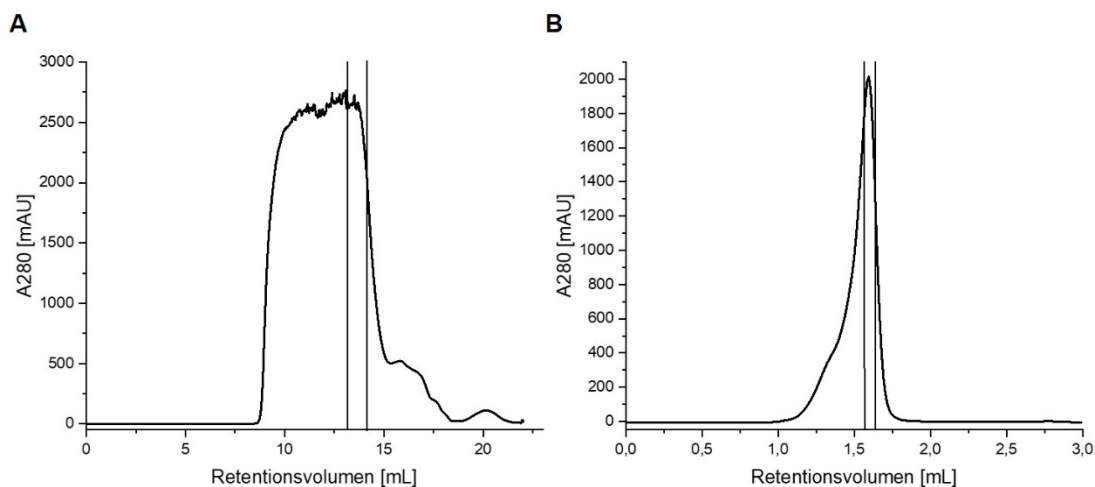
## 12.22 Kryo-EM Proben

**Tabelle 12.13: Proben nach negativer Kontrastierung für die Elektronenmikroskopie verschiedener Rekonstitutionsansätze.** Die Proben befanden sich nach der Reinigung ursprünglich in 50 mM Tris pH 8, 75 mM KCl und 20 mM CaCl<sub>2</sub> bei einer Konzentration von 0,74 mg/mL und die Absorption bei 280 nm betrug 10-20 mAU. Neben dem Testen verschiedener Rekonstitutionsmethoden wurde die Salzkonzentration variiert. Die vielversprechendste Bedingung ist in grün markiert.

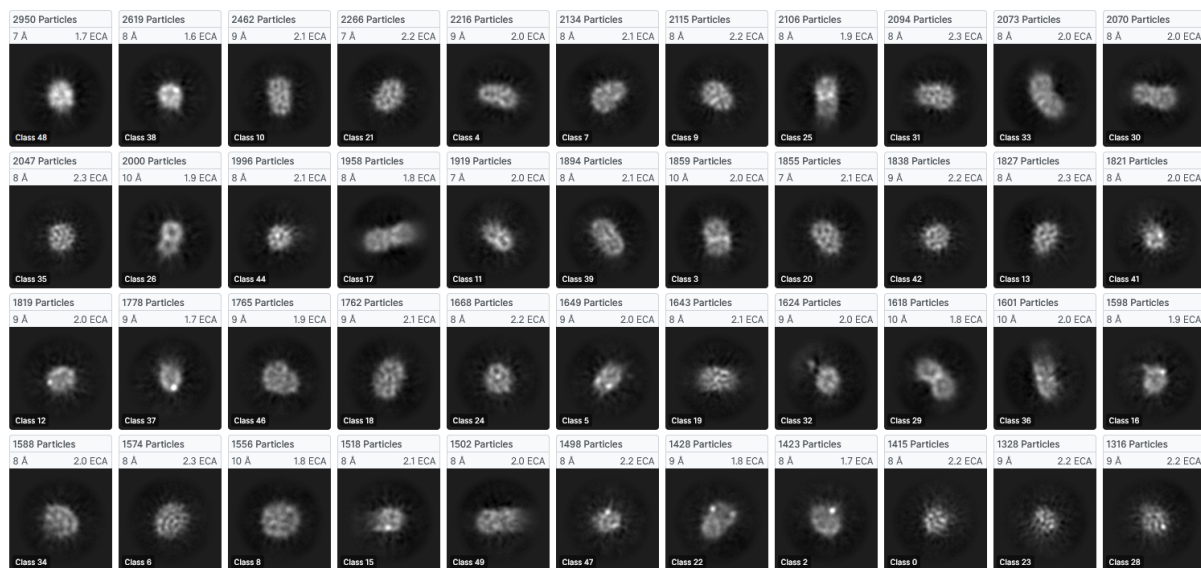
Rekonstitution	Verhältnis	[KCl]	Fazit
MSP1E3D1	0,1 Hexamer : 1 MSP : 70 Lipid Lipid 1: DOPC in Fos12	150 mM	Teilchen schlecht separiert, heterogen
	Lipid 2: Soy in DM	300 mM	Teilchen gut getrennt, Kontrast schlecht, nur Top-Views
Amphipol A8-35	1 Amphipol : 3 mFI 1 Amphipol : 5 mFI	75 mM 300 mM	Probe heterogen Probe gut, Kontrast schwach
Amphipol PMAL-C8	1 Amphipol : 3 mFI 1 Amphipol : 5 mFI	150 mM 75 mM	Probe gut, Kontrast besser Probe aggregiert



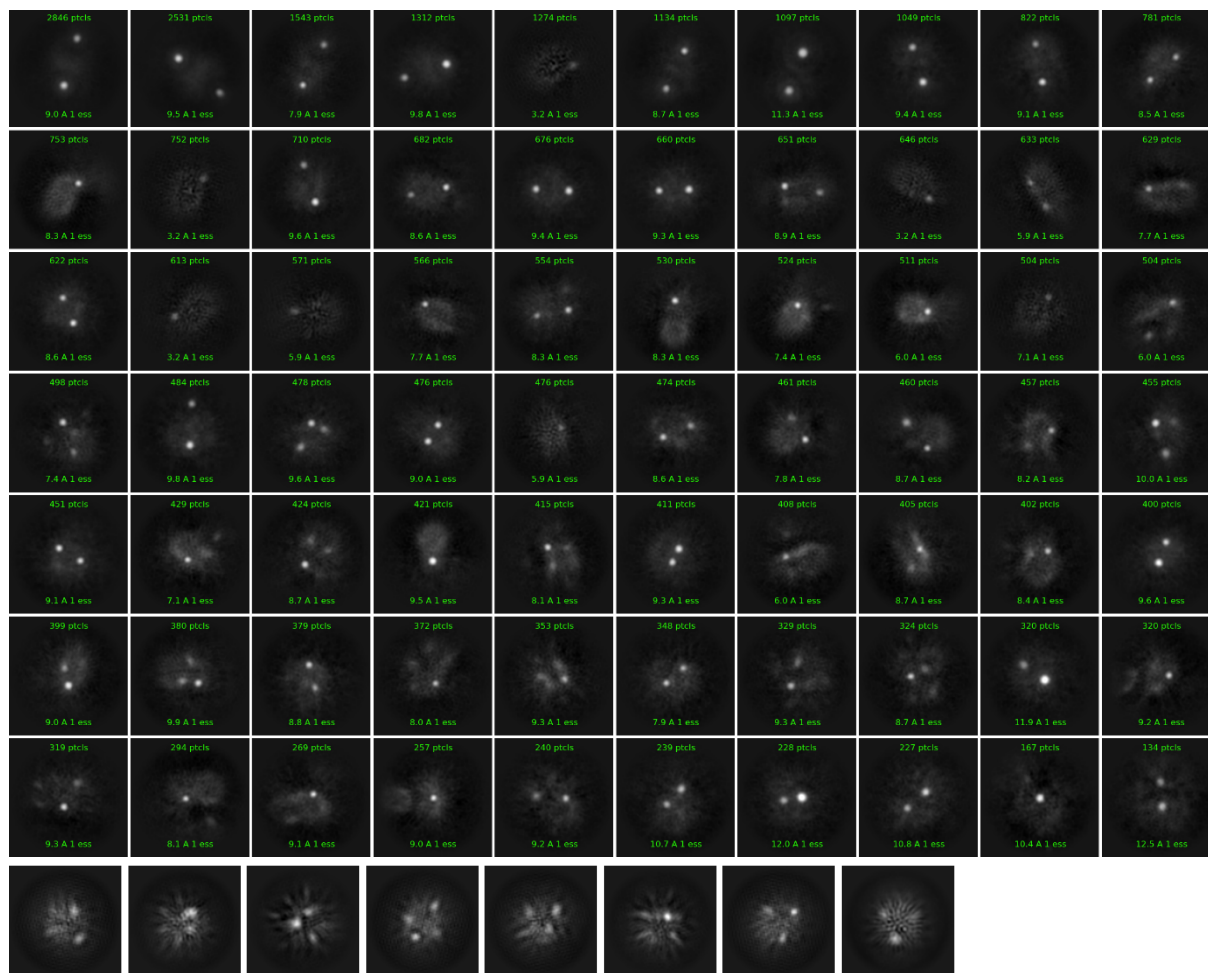
**Abbildung 12.33: Elektronenmikroskopie nach negativer Kontrastierung von mFI in PMAL-C8.** Die Elektronenmikroskopie und Datenprozessierung wurde von Dr. M. Gregor Madej an einem JEOL JEM-2100F Mikroskop durchgeführt. Das Modell in D3-Symmetrie (blau) wurde aus 8600 Teilchen erstellt und hat eine Auflösung von 14,9 Å. In grau ist zum Vergleich die Dichtekarte des SAXS-Modells von mFI in 0,05 % Fos12 in P32-Symmetrie dargestellt.



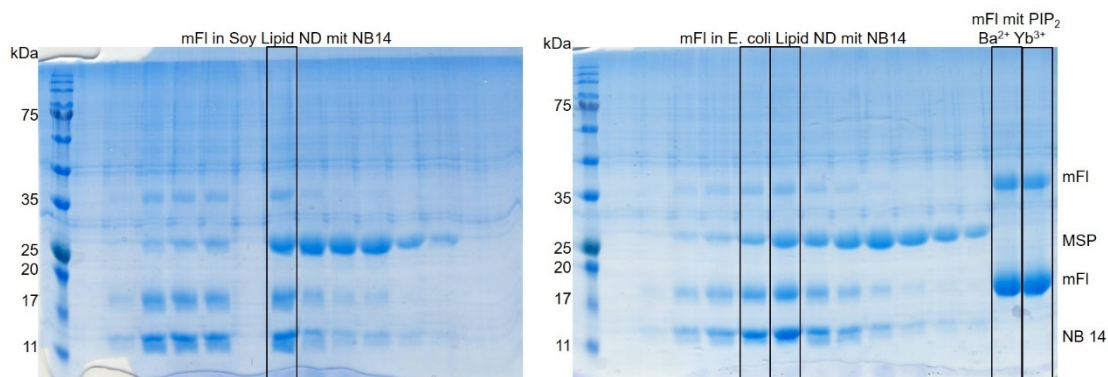
**Abbildung 12.34: SECs von mFI in PMAL-C8. A** SEC von mFI in PMAL-C8 auf einer SD200 10/300 pg-Säule. **A** Die markierten Fraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert. **B** SEC der aufkonzentrierten Fraktionen. Von der markierten Fraktion wurden Grids angefertigt und ein Datensatz aufgenommen.



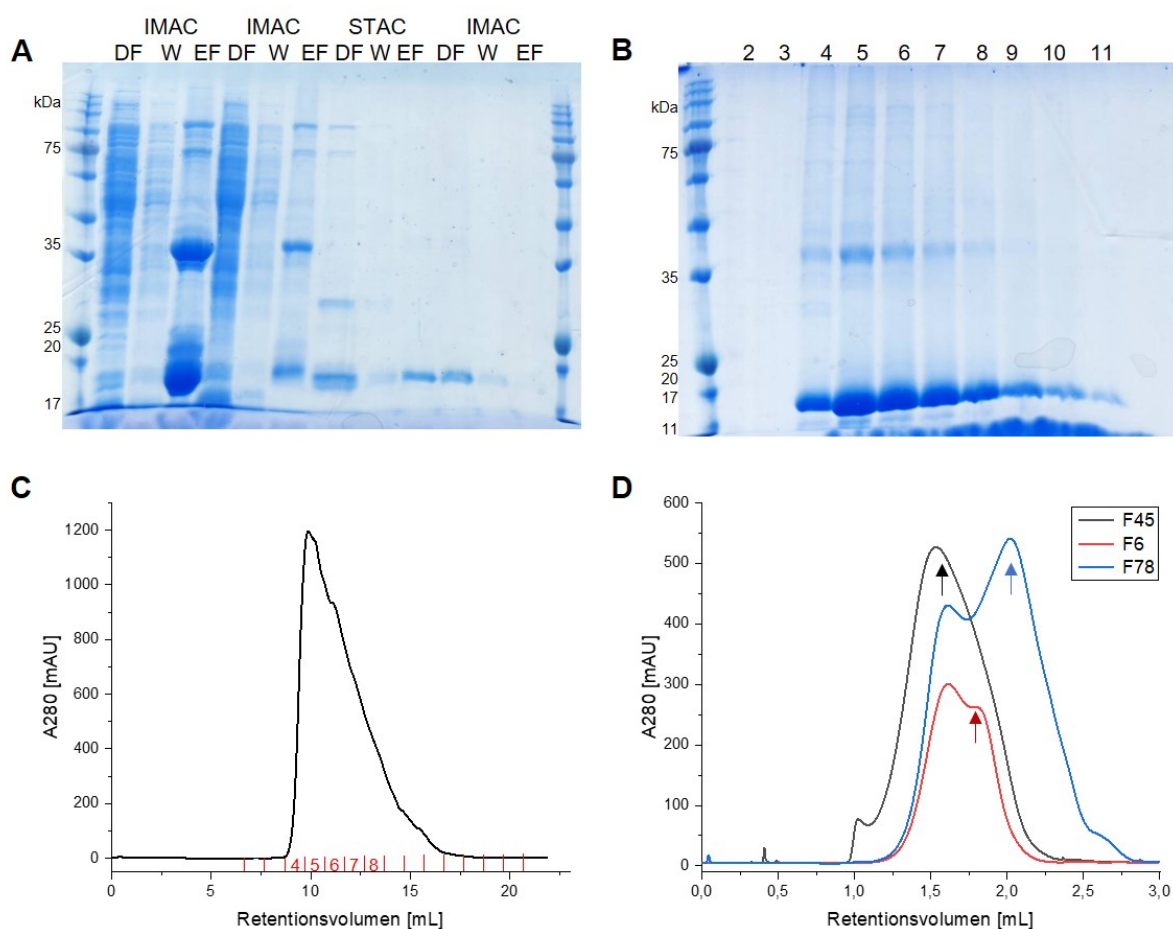
**Abbildung 12.35: Ausgewählte 2D-Klassen von mFl in PMAL-C8.** Es wurden 1600 Movies aufgenommen. Nach mehreren Runden der 2D-Klassifizierung kollabierten die Klassen.



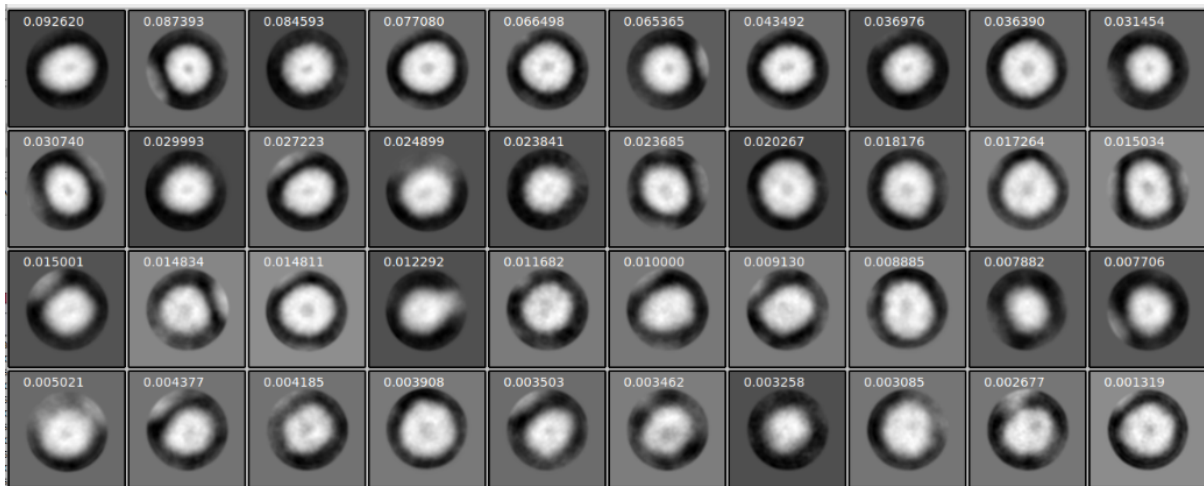
**Abbildung 12.36: 2D-Klassen aus 275000 Partikeln von mFl in Fos12 mit  $\text{PIP}_2$  nach Zugabe von 2 mM  $\text{BaCl}_2$ .** In der unteren Abbildung sind 2D-Klassen aus 780000 Partikeln gezeigt, in denen eine vierfache Symmetrie erkennbar ist.



**Abbildung 12.37: Kryo-EM Proben.** Mit den im Gel der 12 %-igen SDS-PAGE schwarz umrandeten Proben wurden Kryo-EM Grids vorbereitet. Es handelt sich um mFI-StrepII in NDs aus Soy Lipid mit NB14, mFI-StrepII in NDs aus *E. coli* Lipid mit NB14 und mFI-StrepII mit 1 mM PIP<sub>2</sub> in 0,05 % Fos12, dem 2 mM Ba<sup>2+</sup> oder Yb<sup>3+</sup> zugefügt wurden. Die Proben wurden mit dem Vitrobot vitrifiziert, wobei Blotting-Zeiten von 5 und 6 s (5,5 s für mFI-StrepII mit PIP<sub>2</sub>) und jeweils Cu- und Au-Grids verwendet wurden.



**Abbildung 12.38: Reinigung von mFI in DDM/CHS.** **A** SDS-PAGE der Reinigung von mFI in 0,1 % DDM und 0,02 % CHS. Die vorherige Solubilisierung erfolgte in 1 % DDM und 0,2 % CHS für zwei Stunden. **B** SDS-PAGE der Fraktionen der SEC. **C** SEC von mFI in 0,1 % DDM und 0,02 % CHS nach Injektion auf eine Superdex 200 10/300 pg-Säule. **D** Chromatogramme nach Injektion der aufkonzentrierten Fraktionen aus C auf eine Superose 6 5/150 pg-Säule. Von den mit einem Pfeil markierten Fraktionen wurden Proben auf Grids zur Aufnahme von Cryo-EM Datensätzen vorbereitet. Die Reinigung in DDM/CHS ermöglicht eine bessere Auftrennung der verschiedenen Oligomere.



**Abbildung 12.39: Beispielhafte 2D-Klassen nach negativer Kontrastierung von mFI in DDM/CHS aus 284 Bildern.** Der Datensatz wurde an einem Jeol JEM-2100F Mikroskop aufgenommen. Erstmals ist eine typische Detergenz-Mizelle sichtbar. Proteinmerkmale sind jedoch nicht erkennbar.

## 12.23 Bioinformatische Analysen

**Tabelle 12.14: Sequenzanalyse von mFI mit ProtScale** (Gasteiger et al., 2003). Zur besseren Veranschaulichung wurden niedrige Werte gelb, mittlere Werte orange und hohe Werte rot hinterlegt. Jeder einzelnen Aminosäure sind Werte für die Hydropathie (Kyte & Doolittle, 1982), die Transmembran-Tendenz (Zhao & London, 2006), die durchschnittliche Flexibilität (Bhaskaran & Ponnuswamy, 2009), die Hydrophobizität (Sweet & Eisenberg, 1983) und die Polarität (Zimmerman et al, 1968) zugeordnet. Die vier ersten und letzten Aminosäuren wurden nicht analysiert.

AS	#	ProtScale Hydropathie	TM Tendenz	Flexibilität	Hydrophobizität	Polarität
M	1					
S	2					
G	3					
S	4					
G	5	0,5	0,101	0,447	-0,366	0,53
A	6	0,489	-0,012	0,453	-0,523	0,371
A	7	0,778	0,089	0,437	-0,507	0,186
G	8	0,778	0,089	0,437	-0,507	0,186
A	9	0,689	-0,012	0,437	-0,5	0,176
A	10	0,933	0,051	0,417	-0,47	0,176
A	11	0,556	-0,151	0,433	-0,48	0,351
G	12	0,178	-0,353	0,45	-0,49	0,527
P	13	0,422	-0,29	0,43	-0,46	0,527
A	14	-0,167	-0,537	0,444	-0,517	0,919
P	15	-0,756	-0,901	0,46	-0,608	6,463
P	16	-1,344	-1,266	0,476	-0,699	12,008
A	17	-1,344	-1,266	0,476	-0,699	12,008
Q	18	-0,956	-0,95	0,452	-0,531	11,991
E	19	-1,233	-1,028	0,461	-0,518	12,176
E	20	-1,156	-0,698	0,439	-0,408	12,233
G	21	-1,078	-0,368	0,417	-0,298	12,291
M	22	-1,422	-0,356	0,423	-0,068	12,47
T	23	-1,533	-0,437	0,428	-0,032	17,856
W	24	-1,244	0,056	0,407	0,159	12,544
W	25	-0,433	0,58	0,392	0,43	7,014
Y	26	-0,111	0,568	0,371	0,523	7,179
R	27	-0,822	0,127	0,397	0,344	12,798
W	28	-0,322	0,364	0,389	0,511	12,628
L	29	-0,022	0,237	0,394	0,411	12,394
C	30	0,033	0,046	0,42	0,281	12,161
R	31	0,644	0,147	0,417	0,197	11,997
L	32	1,567	0,634	0,399	0,398	6,233
A	33	1,622	0,443	0,424	0,268	6



G	34	1,4	0,283	0,423	0,088	5,986
V	35	1,589	0,472	0,428	0,17	5,836
L	36	2	0,699	0,426	0,174	0,243
G	37	1,856	0,463	0,423	0,058	0,393
A	38	1,856	0,463	0,423	0,058	0,393
V	39	2,4	0,703	0,414	0,271	0,408
S	40	1,844	0,489	0,428	0,109	0,579
C	41	1,378	0,266	0,447	-0,101	0,564
A	42	1,844	0,489	0,428	0,109	0,579
I	43	1,956	0,667	0,422	0,367	0,618
S	44	1,1	0,331	0,43	0,163	0,979
G	45	1,467	0,357	0,412	0,243	0,958
L	46	1,656	0,546	0,417	0,326	0,808
F	47	1,378	0,468	0,426	0,339	0,992
N	48	1,378	0,468	0,426	0,339	0,992
C	49	1,111	0,367	0,404	0,329	6,54
V	50	0,978	0,228	0,401	0,349	6,716
T	51	0,978	0,228	0,401	0,349	6,716
I	52	0,278	-0,172	0,418	0,033	7,052
H	53	1,167	0,227	0,418	0,274	6,691
P	54	1,089	0,302	0,419	0,211	6,527
L	55	0,822	0,189	0,416	0,066	6,512
N	56	0,856	0,203	0,427	0,022	6,328
I	57	0,822	0,14	0,419	-0,016	6,328
A	58	1,078	0,47	0,418	0,111	0,828
A	59	1,467	0,786	0,394	0,279	0,811
G	60	1,544	0,802	0,404	0,282	0,811
V	61	2,144	1,138	0,387	0,498	0,594
W	62	1,256	0,739	0,387	0,257	0,956
M	63	1,256	0,739	0,387	0,257	0,956
I	64	1,367	0,917	0,381	0,514	0,994
M	65	1,911	1,157	0,372	0,728	1,009
N	66	1,867	1,203	0,37	0,762	1,009
A	67	2,389	1,236	0,377	0,842	0,79
F	68	2,6	1,282	0,384	0,864	0,646
I	69	2,378	1,03	0,372	0,744	0,796
L	70	1,778	0,552	0,394	0,496	6,181
L	71	2,367	0,774	0,383	0,553	5,806
L	72	1,989	0,572	0,4	0,543	5,981
C	73	1,989	0,572	0,4	0,543	5,981
E	74	1,767	0,32	0,388	0,423	6,131
A	75	1,622	0,084	0,386	0,307	6,281
P	76	0,811	-0,322	0,399	0,07	6,659
F	77	0,7	-0,304	0,392	0,148	6,683
C	78	0,889	-0,116	0,397	0,23	6,533
C	79	0,889	-0,116	0,397	0,23	6,533
Q	80	1	0,062	0,391	0,488	6,572
F	81	1,378	0,264	0,374	0,498	6,397
V	82	0,678	-0,136	0,391	0,182	6,733
E	83	0,322	-0,138	0,401	0,132	6,753
F	84	0,511	0,051	0,406	0,214	6,603
A	85	1,1	0,298	0,391	0,271	6,211
N	86	0,4	-0,244	0,412	-0,078	11,717
T	87	-0,5	-0,784	0,421	-0,253	17,202
V	88	0,356	-0,307	0,409	-0,017	11,672
A	89	-0,344	-0,89	0,431	-0,376	17,156
E	90	-1,044	-1,218	0,45	-0,397	22,933
K	91	-0,233	-0,836	0,44	-0,159	22,572
V	92	-0,656	-1,086	0,45	-0,193	28,166
D	93	-1,211	-1,3	0,463	-0,356	28,337
R	94	-1,511	-1,172	0,458	-0,256	28,57
L	95	-1,511	-1,054	0,457	-0,221	23,418

# Anhang

R	96	-1,511	-1,054	0,457	-0,221	23,418
S	97	-1,778	-1,168	0,453	-0,367	23,403
W	98	-0,922	-0,649	0,44	-0,12	17,896
Q	99	-0,111	-0,143	0,416	0,159	12,157
K	100	-0,678	-0,291	0,421	0,209	12,321
A	101	0,1	-0,039	0,401	0,293	6,708
V	102	0,144	-0,001	0,404	0,28	6,522
F	103	0,456	-0,016	0,403	0,338	6,448
Y	104	1,044	0,231	0,389	0,394	6,056
C	105	1,978	0,834	0,388	0,608	0,57
G	106	2,244	0,948	0,391	0,753	0,584
M	107	1,6	0,632	0,404	0,598	0,746
A	108	1,789	0,631	0,421	0,523	0,721
I	109	2,4	0,732	0,418	0,439	0,557
V	110	2,333	0,921	0,412	0,533	0,551
P	111	2,289	0,883	0,409	0,547	0,737
I	112	2,5	0,93	0,417	0,569	0,592
V	113	2,222	0,852	0,426	0,582	0,777
M	114	2,144	0,836	0,416	0,579	0,777
S	115	1,6	0,644	0,421	0,447	0,947
L	116	1,7	0,769	0,413	0,47	0,956
T	117	1,622	0,752	0,403	0,467	0,956
L	118	1,578	0,799	0,401	0,501	0,956
T	119	1,322	0,622	0,428	0,313	0,797
T	120	1,022	0,501	0,422	0,272	0,987
L	121	0,8	0,341	0,421	0,092	0,972
L	122	1,378	0,596	0,423	0,262	0,802
G	123	1,156	0,436	0,422	0,082	0,788
N	124	1,544	0,691	0,408	0,327	0,642
A	125	1,822	0,769	0,399	0,313	0,458
I	126	1,322	0,531	0,407	0,147	0,628
A	127	0,856	0,308	0,426	-0,063	0,613
F	128	1,367	0,484	0,409	0,112	0,628
A	129	2,178	0,867	0,399	0,35	0,267
T	130	1,833	0,879	0,406	0,58	0,446
G	131	1,289	0,639	0,414	0,367	0,431
V	132	1,511	0,799	0,416	0,547	0,446
L	133	1,111	0,52	0,438	0,272	0,592
Y	134	1,111	0,52	0,438	0,272	0,592
G	135	1,611	0,758	0,43	0,439	0,422
L	136	1,611	0,758	0,43	0,439	0,422
S	137	0,711	0,218	0,439	0,263	5,908
A	138	-0,144	-0,369	0,45	0,053	11,393
L	139	-0,044	-0,444	0,463	-0,207	11,214
G	140	-0,389	-0,787	0,46	-0,278	16,737
K	141	-0,611	-0,947	0,459	-0,458	16,722
K	142	-0,022	-0,669	0,453	-0,258	16,551
G	143	-0,311	-0,77	0,47	-0,274	16,737
D	144	-0,878	-0,918	0,476	-0,224	16,901
A	145	-0,633	-0,854	0,456	-0,194	16,901
I	146	-0,7	-0,756	0,462	-0,186	17,179
S	147	0,233	-0,152	0,461	0,02	11,693
Y	148	-0,111	-0,336	0,456	0,001	12,086
A	149	-0,111	-0,177	0,453	0,046	6,956
R	150	-0,7	-0,423	0,468	-0,011	7,348
I	151	-1,7	-0,928	0,476	-0,216	13,111
Q	152	-2	-1,073	0,473	-0,256	13,318
Q	153	-2,244	-1,332	0,481	-0,542	13,531
Q	154	-2,244	-1,332	0,481	-0,542	13,531
R	155	-2,133	-1,41	0,479	-0,622	13,276
Q	156	-3,022	-1,951	0,483	-0,897	18,806
Q	157	-3,022	-2,069	0,484	-0,931	23,958

A	158	-3,067	-2,249	0,482	-0,904	29,066
D	159	-2,256	-1,842	0,469	-0,668	28,688
E	160	-1,556	-1,514	0,45	-0,647	22,91
E	161	-1,556	-1,632	0,451	-0,681	28,062
K	162	-1,244	-1,463	0,446	-0,611	27,854
L	163	-1,133	-1,286	0,44	-0,353	27,893
A	164	-1,133	-1,244	0,439	-0,343	27,916
E	165	-0,789	-0,943	0,443	-0,282	22,371
T	166	-0,789	-0,943	0,443	-0,282	22,371
F	167	0,067	-0,357	0,432	-0,072	16,886
E	168					
G	169					
E	170					
L	171					

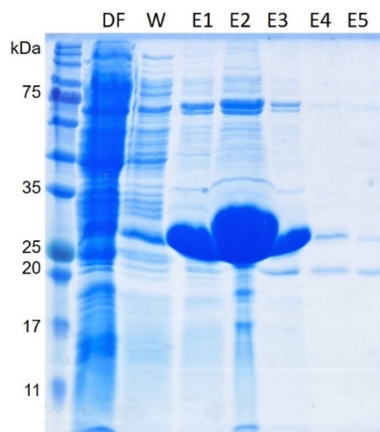
**Tabelle 12.15: Vorhersage von Transmembrandomänen in mFI.** Mit Hilfe verschiedener Algorithmen wurden mögliche Transmembranhelices von mFI vorhergesagt. Die zugehörigen Referenzen finden sich in Tabelle 4.21. Die gelb hinterlegten Zellen markieren die Position der Transmembrandomänen. i-o steht für eine Transmembrandomäne die laut Vorhersage vom intrazellulären in den extrazellulären Bereich geht, o-i bezeichnet die andere Richtung. Die Zahlen in der ersten Zeile stehen für die folgenden verwendeten Server: 1 TMPred 2 PsiPred 3 TMHMM 4 HMMTOP 5 MEMSAT 6 PredictProtein 7 PredTMR 8 Proteus2 9 XtalPred 10 DAS 11 TOPCONS 12 OCTOPUS 13 Philius 14 PolyPhobius 15 SCAMPI 16 SPOCTOPUS 17 Phobius.

AS	#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Y	26																	
R	27																	
W	28																	
L	29																	
C	30																	
R	31																	
L	32																	
A	33																	
G	34																	
V	35																	
L	36																	
G	37																	
A	38																	
V	39																	
S	40																	
C	41	o-i	i-o	i-o	i-o	i-o	i-o					i-o	i-o	i-o	i-o	i-o	i-o	i-o
A	42																	
I	43																	
S	44																	
G	45																	
L	46																	
F	47																	
N	48																	
C	49																	
V	50																	
T	51																	
I	52																	
H	53																	
P	54																	
L	55																	
N	56																	
I	57																	
A	58																	
A	59																	
G	60																	
V	61																	
W	62																	
M	63																	
I	64																	
M	65																	
N	66																	
A	67	i-o	o-i	o-i	o-i	o-i	o-i					o-i	o-i	o-i	o-i	o-i	o-i	o-i
F	68																	
I	69																	
L	70																	

# Anhang

L	71																
L	72																
C	73																
E	74																
A	75																
P	76																
F	77																
C	78																
C	79																
Q	80																
F	81																
V	82																
E	83																
F	84																
A	85																
N	86																
T	87																
V	88																
A	89																
E	90																
K	91																
V	92																
D	93																
R	94																
L	95																
R	96																
S	97																
W	98																
Q	99																
K	100																
A	101																
V	102																
F	103																
Y	104																
C	105																
G	106																
M	107																
A	108																
I	109	o-i	i-o	i-o	i-o	i-o	i-o					i-o	i-o	i-o	i-o	i-o	i-o
V	110																
P	111																
I	112																
V	113																
M	114																
S	115																
L	116																
T	117																
L	118																
T	119																
T	120																
L	121																
L	122																
G	123																
N	124																
A	125																
I	126																
A	127																
F	128																
A	129		o-i		o-i	o-i	o-i					o-i	o-i		o-i	o-i	o-i
T	130																
G	131																
V	132																
L	133																
Y	134																
G	135																
L	136																
S	137																
A	138																
L	139																
G	140																
K	141																



**12.24 Reinigung der katalytisch aktiven Domäne Ulp1(403-621) der SUMO-Protease**

**Abbildung 12.40: Reinigung der katalytisch aktiven Domäne Ulp1(403-621) der SUMO-Protease.** 12 %-iges SDS-Gel der Reinigung nach Coomassie-Färbung mit den Elutionsfraktionen E1-E5. DF = Durchfluss der IMAC. W = Waschschrift der IMAC. In den Elutionsfraktionen E1 bis E3 ist die Bande des 26,5 kDa schweren Proteins sichtbar.