

*Membrane Mimics* und Licht in Kombination mit  
nativer Massenspektrometrie als vielseitiges Werkzeug  
zur Analyse von nicht-kovalent gebundenen  
Proteinkomplexen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB 14)  
der Johann Wolfgang Goethe -Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Janosch Martin  
aus Bad Brückenau

Frankfurt am Main 2021  
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB 14) der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Nina Morgner

Prof. Dr. Volker Dötsch

Datum der Disputation: 03.06.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>iii</b>
<b>1. Einleitung &amp; Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Biophysikalischer Hintergrund.....</b>	<b>5</b>
2.1 Biomembranen, Membranproteine & Lipide .....	5
2.2 Photoschaltbare Lipide als Werkzeug zur Membran- & Membranprotein-Analyse.....	10
2.3 <i>Membrane Mimicking</i> Systeme zur Analyse von Membranproteinen.....	13
2.3.1 Liposome .....	14
2.3.2 Nanodiscs .....	15
2.3.3 Saposin-Nanopartikel .....	17
2.3.4 SMALPs .....	18
<b>3. Theorie Massenspektrometrie.....</b>	<b>21</b>
3.1 Allgemeine theoretische Grundlagen .....	21
3.1.1 Aufbau eines Massenspektrometers & das Massenspektrum.....	21
3.1.2 Ionenquellen & Ionisationsarten.....	22
3.1.3 Analysatoren – Prinzip eines ToF-Analysators.....	23
3.1.4 Detektoren in der Massenspektrometrie .....	25
3.2 Native Massenspektrometrie.....	26
3.3 LILBID-MS.....	28
3.3.1 Die LILBID-Ionenquelle .....	29
3.3.2 Analysator .....	31
3.3.3 Detektor .....	32
3.4 ESI-MS .....	34
3.4.1 Ionisation & Modelle der Ionenüberführung in die Gasphase bei ESI.....	34
3.4.2 Ionenmobilitätsspektrometrie .....	37
3.5 Membranproteinanalyse mit nativer MS – LILBID vs. nESI.....	39
3.6 Zeitaufgelöste Massenspektrometrie.....	43
<b>4. Untersuchte Proteine .....</b>	<b>46</b>
4.1 Das Bakteriophage Lyse-Protein $\Phi$ X174-E.....	46
4.2 Saposine, Proteorhodopsin & EmrE.....	49
4.2.1 Saposine .....	49
4.2.2 Proteorhodopsin & EmrE.....	50
4.3 Die Histidinkinasen SpaK, NisK & ihre Lantibiotika .....	52
4.4 Der MHC-I <i>peptide-loading-complex</i> .....	56

<b>5. Material &amp; Methoden .....</b>	<b>59</b>
5.1 Allgemeines & Kollaborationen .....	59
5.2 Probenpräparation im Rahmen der LILBID-MS Analysen .....	62
5.3 Zellfreie Protein-Synthese .....	63
5.4 LILBID-MS .....	66
5.4.1 Setup-Einstellungen .....	66
5.4.2 Implementierung von UV-Bestrahlungsquellen .....	67
<b>6. Experimente &amp; Ergebnisse .....</b>	<b>71</b>
6.1 Mechanismus der Membraninsertion & Assemblierung des $\Phi$ X174-E .....	71
6.1.1 $\Phi$ X174-E Solubilisierung durch SlyD .....	71
6.1.2 SlyD interagiert mit der löslichen Domäne von $\Phi$ X174-E .....	74
6.1.3 Assemblierung & Membran-Insertion des $\Phi$ X174-E .....	76
6.1.4 Vorgeschlagerener Mechanismus der SlyD-modulierten $\Phi$ X174-E Assemblierung .....	83
6.2 Analyse & Optimierung der MP-Solubilisierung durch SapA-Nanopartikel .....	85
6.2.1 Einfluss des SapA auf die Ausbildung von PR-SapA-NPs .....	86
6.2.2 Effekt des SapA/Lipid-Verhältnisses auf die Ausbildung von SapA-NPs .....	91
6.2.3 Einfluss der Template-Konzentration auf die Qualität von PR/SapA-NPs .....	96
6.2.4 Anwendung des optimierten Präparationsprotokolls auf das Protein EmrE .....	98
6.3 Untersuchungen der Histidinkinasen SpaK und NisK .....	100
6.3.1 Analysen des mit Detergens solubilisierten SpaK .....	101
6.3.2 SpaK aus SMALPs .....	107
6.3.3 Nachweis der Interaktion von Nisin mit der Histidinkinase NisK .....	112
6.3.4 Nachweis der Interaktion des Immunitätsproteins SpaI mit Subtilin .....	115
6.4 UV-schaltbare Lipide in Nanodiscs .....	117
6.5 Detektion UV-induzierter Komplexbildung .....	125
6.5.1 MHC-I PLC als Modellsystem .....	125
6.5.2 UV-induzierte Peptid-Spaltung .....	126
6.5.3 UV-induzierte Freisetzung der MHC-I Bindestelle .....	129
6.5.4 UV-induzierte Komplex-Bildung .....	132
6.5.5 Einfluss der UV-Laserleistung auf die Spaltung des photospaltbaren Peptids .....	136
<b>7. Zusammenfassung, Diskussion &amp; Ausblick .....</b>	<b>138</b>
7.1 Mechanismus der Membraninsertion & Assemblierung des $\Phi$ X174-E .....	138
7.2 Analyse & Optimierung der MP-Solubilisierung durch SapA-Nanopartikel .....	142
7.3 Histidinkinasen SpaK & NisK .....	145
7.4 UV-schaltbare Lipide in NDs .....	149
7.5 UV-induzierte Komplexbildung .....	151

8. Abkürzungsverzeichnis .....	155
9. Literaturverzeichnis.....	158
10. Anhang .....	168

## Publikationen

Geiger, C., Korn, S.M., Häsler, M., Peetz, O., **Martin, J.**, Kötter, P., Morgner, N., Entian K.-D. (2019). LanI-mediated lantibiotic immunity in *Bacillus subtilis*: functional analysis. Appl Environ Microbiol 85:e00534-19.

Zeng, H., Zhu, G., Zhang, S., Li, X., **Martin, J.**, Morgner, N., Sun, F., Peng, G., Xie, H., Michel, H. (2020), Isolated heme A synthase from *Aquifex aeolicus* is a trimer. mBio 11:e02615-19.

Lieblein, T., Zangl, R., **Martin, J.**, Hoffmann, J., Hutchinson, M.J., Stark, T., Stirnal, E., Schrader, T., Schwalbe, H., Morgner, N. (2020) Structural rearrangement of amyloid- $\beta$  upon inhibitor binding suppresses formation of Alzheimer's disease related oligomers. eLife 2020;9:e59306.

Mezhyrova, J., **Martin, J.\***, Peetz, O., Dötsch, V., Morgner, N., Ma, Y., Bernhard, F. (2021) Membrane insertion mechanism and molecular assembly of the bacteriophage lysis toxin  $\Phi$ X174-E. The FEBS Journal. doi:10.1111/febs.15642

---

\* *co-first* Autor

## 1. Einleitung & Zielsetzung

Seit Jahrhunderten strebt der Mensch danach zu verstehen wie die Natur arbeitet, welche Vorgänge wie ablaufen und vor allem warum. In lebenden Zellen sind zahlreiche Proteine dafür verantwortlich, dass spezifische Reaktionen stattfinden und biologische Prozesse ablaufen. Um die Komplexität dieser Prozesse zu verstehen, ist es nicht nur notwendig die involvierten Moleküle und Proteine an sich zu identifizieren, sondern auch deren Wechselwirkungen mit ihrem Umfeld und anderen Proteinen oder Liganden zu untersuchen. Die Massenspektrometrie (MS) stellt eine leistungsfähige Analysemethode dar, um präzise Proteine und an einer Reaktion involvierte Moleküle zu identifizieren. Oftmals erfolgt dies mittels tandem-MS Experimenten mit dem Ziel der Peptid-Sequenzierung.<sup>1</sup> Dies erfordert allerdings einen Proteinverdau bzw. die Fragmentierung des zu analysierenden Proteins und lässt es kaum mehr zu, Rückschlüsse auf die Protein-Konstitution von nicht-kovalent gebundenen Komplexen *in vivo* zu ziehen.

Einen anderen Ansatz verfolgt indes die so genannte native Massenspektrometrie. Native MS erlaubt es biologische Systeme sehr sanft und aus ihrer natürlichen oder zumindest aus einer natur-ähnlichen Umgebung heraus zu untersuchen. Eine zerstörungsfreie Analyse nicht-kovalent gebundener Proteinkomplexe ist ebenso möglich wie die Detektion einzelner Komplex-Komponenten. Neben der Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen bietet die native MS aber auch die Möglichkeit Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu untersuchen.<sup>2,3</sup>

Eine inzwischen etablierte Technik der nativen MS stellt die in dieser Arbeit genutzte Ionisationsmethode *laser induced liquid bead ion desorption* (LILBID) dar. Hierbei werden kleine Tröpfchen erzeugt, die einen wässrig gelösten Analyt enthalten. Die Analyt-Tröpfchen werden anschließend mittels IR-Laser bestrahlt, wodurch der Analyt freigesetzt und massenspektrometrisch analysiert werden kann.<sup>4</sup>

Biomoleküle sind oftmals sehr sensitiv gegenüber ihrer chemischen Umgebung, wie pH-Wert, Puffer, Salzkonzentration, Lipiden und/oder Detergenzien und vielen weiteren Faktoren. Dies ist insbesondere bei Membranproteinen (MPs) beobachtbar.<sup>5</sup> Diese stabil und funktional in Lösung zu halten ist nicht trivial, weshalb sie eine besondere Herausforderung bei der Analyse von biologischen Systemen darstellen.<sup>6</sup>

Detergenzien stellen die simpelste Form eines sogenannten *membrane mimic* Systems (MM-Systems) dar, welches häufig genutzt wird, um MPs zu solubilisieren. Allerdings haben Detergenzien den Nachteil, dass es bei deren Verwendung zu Instabilität und einer reduzierten Aktivität der MPs kommen kann, was insbesondere bei biophysikalischen und strukturellen Untersuchungen ein Problem darstellt.<sup>7</sup> Aus diesem Grund wurden und werden nach wie vor zahlreiche weitere MM-Systeme, wie beispielsweise Nanodiscs (NDs) oder *styrene-maleic acid lipid particles* (SMALPs), untersucht und entwickelt, um MPs eine naturähnliche Umgebung in Form einer Lipid-Doppelschicht zu bieten und sie so in ihrer natürlichen Konformation und natürlichen Funktionsweise/Aktivität in Lösung zu erhalten.<sup>8,9</sup> Doch auch die Verwendung von MM-Systemen zur Analyse von MPs kann durchaus seine Schwierigkeiten bereiten und Fallstricke haben. In Kontrast zu NDs sind SMALPs beispielsweise in ihrer Massenverteilung und ihrem Durchmesser nicht klar definiert, was für einige analytische Methoden eine Herausforderung darstellt.<sup>10-12</sup>

LILBID-MS wiederum hat sich als hervorragende analytische Methode herausgestellt, um MPs in Kombination mit den genannten MMs zu untersuchen.<sup>13-15</sup> Daher liegt ein Fokus dieser Arbeit darauf, Membranproteine wie das Lyse-Protein ( $\Phi$ X174-E) der Bakteriophage  $\Phi$ X174 in Kombination mit NDs näher zu untersuchen.<sup>16</sup> Nach welchem Mechanismus dieses Protein die Lyse induziert ist nicht vollständig geklärt. Zu verstehen wie Bakteriophagen genau arbeiten ist allerdings von besonderem Interesse. Sie werden auf Grund der immer öfter auftretenden Antibiotikaresistenz derzeit intensiv als Antibiotika-Alternative erforscht.<sup>17</sup>

Als weitere Antibiotika-Alternative sind ebenfalls Bacteriocine in den Forschungsfokus gerückt. Hierbei handelt es sich um kleine, toxische Peptide aus Bakterien, die das Wachstum artgleicher oder nahe verwandter Bakterien-Stämme hemmen oder diese abtöten.<sup>18</sup> Eine prominente Untergruppe der Bacteriocine stellen Lantibiotika dar.<sup>19</sup> Diverse Lantibiotika, wie zum Beispiel Subtilin oder Nisin, agieren als Autoinduktoren und aktivieren ihre eigene Biosynthese.<sup>20-22</sup> Am Synthese-Prozess der Lantibiotika sind wiederum zahlreiche Proteine involviert.<sup>19-21</sup> An der Biosynthese des Lantibiotikums Subtilin aus *B. subtilis* ist beispielsweise die Histidinkinase SpaK beteiligt, deren Analyse in Kombination mit dem MM-System der SMALPs Teil dieser Arbeit ist.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit im Zusammenhang mit MMs stellt die Untersuchung des neueren MM-Systems der Saposin-Nanopartikel (SapNPs) dar.<sup>23</sup> Die Experimente hierzu zielen sowohl darauf ab zu untersuchen, ob und wie gut sich LILBID-MS zur Analyse von SapNP-solubilisierten MPs eignet, als auch darauf die Darstellung der Membranproteine aus biologischer präparativer Sicht zu optimieren und hierdurch auch neue Erkenntnisse bzgl. des Mechanismus der Partikelbildung zu gewinnen.

Wie bereits erwähnt, gestalten sich MP Analysen aus MMs nicht immer einfach. So zeigten Untersuchungen am MM-System der NDs beispielsweise auch, dass sich nicht jedes Lipid gleichermaßen gut bei der biologischen Präparation bzw. zur Solubilisierung eines MPs eignet. Auch in Bezug auf den Ionisierungsprozess bei der LILBID-MS eignet sich nicht jedes Lipid gleichermaßen.<sup>14</sup> So können manche in Verbindung mit NDs genutzten Lipide unerwünschte Signale zur Folge haben, die aus massiven Lipid-Anhaftungen am MSP oder dem Analyten resultieren. Überlappungen der  $m/z$ -Signale verschiedener Analyt- und/oder Komplexkomponenten mit diesen Lipid-Cluster-Signalen kann wiederum zum Verlust von Informationen führen. Daher ist es von Interesse entsprechende Parameter wie z.B. die Lipidkomposition zu bestimmen und zu optimieren.

Zudem gibt es auch Lipide die für Proteine bzgl. ihrer Konformation und Funktion von Bedeutung sind oder auch im Zuge der Oligomerisierung eine Rolle spielen.<sup>24,25</sup> Daher soll sich ein weiterer Teil dieser Arbeit der Frage widmen, ob durch den Einsatz von UV-schaltbaren Lipiden der Anwendungsbereich und/oder die Auflösung von LILBID-MS erweitert und verbessert werden kann. Ebenso von Interesse ist hierbei auch, ob durch Einsatz von UV-schaltbaren Lipiden ein zusätzlicher Informationsgewinn im Hinblick auf spezifisch gebundene Lipide ermöglicht werden kann. Ziel ist es, durch das Schalten der UV-Lipide eine Konformationsänderung des Lipids zu induzieren, wodurch mehr schwach gebundene unspezifische Lipide abgestreift werden könnten.

Um biologische Prozesse zu verstehen, ist es jedoch nicht nur relevant die beteiligten Proteine an sich zu identifizieren und deren Wechselwirkungen miteinander zu untersuchen. Auch die zeitlichen/kinetischen Aspekte einer Reaktion sowie molekulare Prozesse gezielt zu kontrollieren, spielt eine zentrale Rolle in der Wissenschaft. Licht hat sich hierbei als ein hervorragendes Werkzeug in der Analytik und auch in der molekularen Prozesskontrolle



etabliert. Insbesondere die Entwicklung lichtbasierter Technologien der letzten Jahrzehnte stellen Meilensteine für Wissenschaft, Wirtschaft und Gesellschaft gleichermaßen dar. Sie sind aus den unterschiedlichsten Lebensbereichen nicht mehr wegzudenken, sei es in der Informationstechnologie, der Unterhaltungselektronik oder der Medizintechnik.

Licht bietet den Vorteil, dass es sehr selektiv eingesetzt werden kann und sowohl orts- als auch zeitaufgelöst Informationen liefert. Das gezielte Triggern einer Reaktion oder einer Protein-Protein-Interaktion kann beispielsweise durch sog. *photo-cleaving* von photolabilen Schutzgruppen (PLS) ermöglicht werden.<sup>26–28</sup>

Bisweilen bietet die native MS kaum Möglichkeiten schnelle Reaktionen zu analysieren und kinetische Informationen zu gewinnen. Daher beschäftigt sich ein weiterer Teil dieser Dissertation damit zu untersuchen, ob und wie sich lichtgesteuerte Reaktionen mittels LILBID induzieren und gegebenenfalls auch zeitlich analysieren und charakterisieren lassen können.

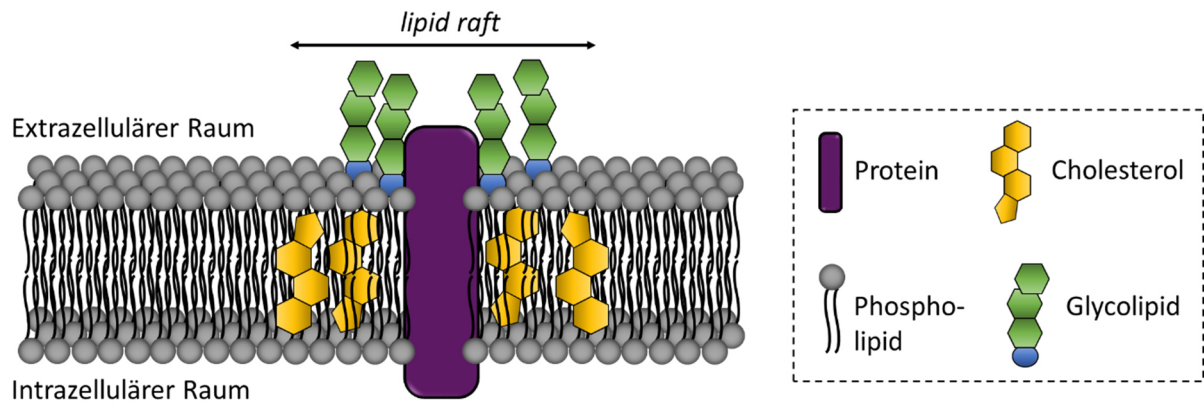
## 2. Biophysikalischer Hintergrund

### 2.1 Biomembranen, Membranproteine & Lipide

Biomembranen spielen eine wichtige Rolle in der Organisation von Zellen. Sie sind selektive, permeable Trennschichten, bestehend aus einer Lipid-Doppelschicht, die den wässrigen Innenraum von Zellen (Cytoplasma) von dem meist ebenfalls wässrigen Außenraum (Extrazellularraum) abgrenzen. In einer Membran sind wiederum viele unterschiedliche Membranproteine lokalisiert, wodurch dieser auch eine aktive Rolle beim selektiven Transport von Ionen oder der Katalyse von chemischen Reaktionen zuteilwird.<sup>29</sup> Auch bei der Übermittlung von Informationen zwischen den intra- und extrazellulären Bereichen einer Zelle spielt sie eine wichtige Rolle.<sup>30</sup> Um die Funktionen einer Zelle und ihrer Membranproteine zu verstehen, ist es daher unerlässlich, die Organisation von biologischen Membranen zu untersuchen.

Lipide stellen eine wesentliche Strukturkomponente im Aufbau von Zellmembranen dar. Sie sind aber auch direkt an einer Reihe von biologischen Prozessen, wie z.B. der Signalweiterleitung oder der Energiespeicherung, beteiligt.<sup>31</sup> Die meisten biologischen Lipide sind amphiphil, d.h. sie besitzen sowohl eine polare hydrophile Kopfgruppe als auch einen lipophilen Kohlenwasserstoff-Rest. Sie bilden in polaren Lösungsmitteln Lipiddoppelschichten (z.B. Liposome) aus.<sup>32</sup>

Der genaue Aufbau von Biomembranen hängt stark von vielen unterschiedlichen Lipiden ab, die die Lipiddoppelschicht der Membran ausbilden. In den meisten biologischen Membranen beträgt der Proteinanteil  $\geq 50\%$ , während der Restbetrag zumeist auf Lipide entfällt. Je nach Zell-Typ können auch bis zu 10% Zucker als Membranbestandteil anfallen.<sup>30,32</sup> Die Lipiddoppelschicht der meisten biologischen Membranen besteht aus drei Klassen von Lipiden, den Glycerophospholipiden, Sterolen (wie z.B. das Cholesterol und seine Derivate) und Sphingolipiden (siehe Abb. 1).<sup>33</sup>

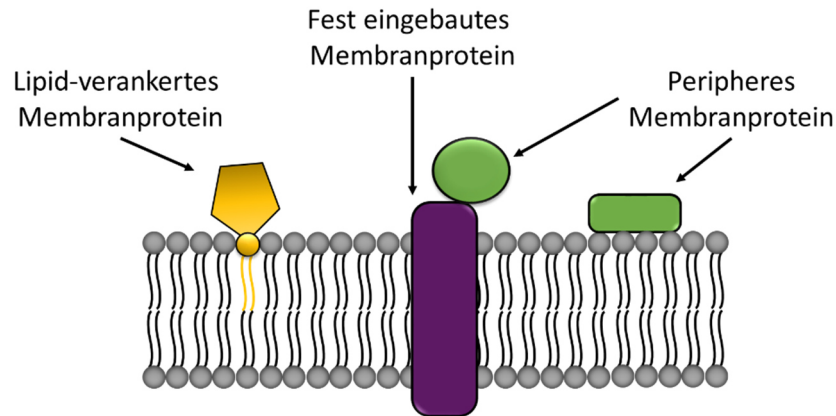


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Domänen-Ausbildung in biologischen Membranen.** Eine Phospholipid-Doppelschicht bildet das Fundament einer Membran. Spezielle Bereiche der Membran, die sog. *lipid-rafts*, sind mit Proteinen, Cholesterin und Glycolipiden angereichert.<sup>nach 34,35</sup>

Die Glycerophospholipide (oft auch nur kurz als Phospholipide bezeichnet) stellen den Hauptbestandteil von Biomembranen dar. Sie bestehen aus Glycerin, welches an zwei der drei Hydroxylgruppen mit zwei Fettsäuren verestert ist. An der endständigen, dritten Hydroxylgruppe ist eine Phosphatgruppe gebunden, die mit verschiedenen Alkoholen verestert sein kann. Phospholipide werden entsprechend ihrer Kopfgruppe in unterschiedliche Klassen eingeteilt, wie etwa Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) oder Phosphatidylcholin (PC). Sowohl die Beschaffenheit der Kopfgruppe als auch die der Kohlenwasserstoffketten bestimmen die physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie Membrankrümmung, -dicke, -fluidität oder die Ausbildung von Mikrodomänen.<sup>36–38</sup>

Um den Aufbau und die Organisation von Biomembranen zu verstehen, ist die Identifizierung der Lipidbestandteile folglich essentiell. Der wissenschaftliche Teilbereich, der sich mit der Analyse des Lipidoms, also der Gesamtheit aller Lipide einer Zelle (oder eines Organismus) beschäftigt, nennt sich Lipidomik. Mittels sensitiven und hochauflösenden Massenspektrometern können heutzutage bereits komplette Lipidom-Analysen durchgeführt werden. In sog. *shotgun*-Experimenten erfolgt hierbei die Identifizierung der Lipide anhand ihrer charakteristischen Fragment-Spektren.<sup>39,40</sup>

Es gibt drei Membranprotein-Typen: Proteine, die über einen Lipid-Anker kovalent mit der Membran verbunden sind, sowie periphere (extrinsische) und fest eingebaute integrale (intrinsische) Membranproteine (siehe Abb. 2).<sup>34,41,42</sup>



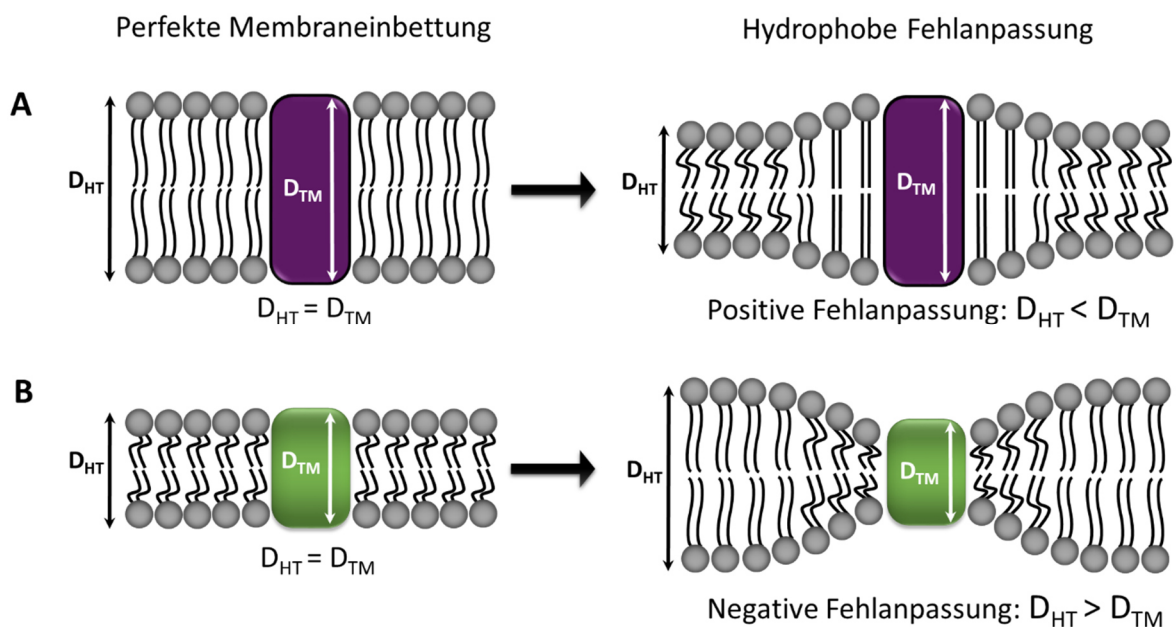
**Abbildung 2: Klassifizierung von Membranproteinen.** Lipid-verankerte MPs (gelb) sind kovalent mit der Membran durch Lipide verknüpft. Intrinsische bzw. fest eingebaute MPs (lila) durchdringen die Phospholipid-Doppelschicht einer Membran. Periphere MPs (grün) können an die Membran assoziiert sein oder mit den fest eingebauten MPs über nicht-kovalente Wechselwirkungen interagieren.<sup>34</sup>

Periphere Proteine sind direkt über nicht-kovalente oder elektrostatische Wechselwirkungen mit den Kopfgruppen der Lipide an die Membran oder an ein integrales Membranprotein gebunden und wechselwirken nicht mit dem hydrophoben Kern der Lipid-Doppelschicht. Integrale Membranproteine wiederum besitzen eine oder mehrere Domänen, die direkt in die Membran eingebettet sind. Sie enthalten üblicherweise hydrophobe Aminosäuren, die mit den Fettsäureketten der Lipide wechselwirken.

Der Aufbau von biologischen Membranen wird üblicherweise auf Basis des von Singer und Nicolson im Jahr 1972 postulierten *fluid-mosaic* Modell beschrieben.<sup>43</sup> Dieses Modell besagt, dass Membranen fluide Phospholipid-Doppelschichten darstellen, in denen sowohl die Lipide, als auch die Proteine zufällig verteilt sind und sich zudem frei bewegen können. Heutzutage wird zudem angenommen, dass die Proteine die Membran ganz oder zur Hälfte durchdringen und die Eindringtiefe der Proteine von deren Hydrophobizität abhängt. Darüber hinaus ist bekannt, dass MPs teils Komplexe aus multimeren Untereinheiten bilden, die sowohl in die Membran eingebettete, als auch periphere Untereinheiten enthalten können.<sup>34</sup>

Ein anderer wichtiger Aspekt in Bezug auf den Aufbau von Membranen stellt deren Schichtdicke dar. Sie beeinflusst sowohl die Struktur als auch die Funktion der Membranproteine.<sup>44</sup> Die Membrandicke wiederum hängt von der Länge, von der Sättigung der Fettsäureketten sowie von deren Anordnung und Zusammensetzung ab.<sup>38</sup>

Wenn sowohl die Dicke des hydrophoben Membrankerns als auch die Länge der Proteintransmembrandomäne eines integralen Membranproteins zusammenpassen, ist dieses, thermodynamisch gesehen, stabil in die Membran eingebaut. Passen jedoch Membrandicke und Länge der transmembran-umspannenden Domäne nicht zusammen, kann ein sog. hydrophober *mismatch* (dt. Fehlanpassung) entstehen (siehe dazu Abb. 3). Je nachdem, ob das Protein zu lang oder zu kurz ist, um gut in den hydrophoben Kern der Membran zu passen, spricht man von einem positiven oder negativen *mismatch*. Um dies auszugleichen, modulieren Lipide die Membrandicke durch Strecken (positiver *mismatch*) oder durch Umordnen ihrer Acylketten (negativer *mismatch*). Proteine wiederum können diesem Problem entgegensteuern, indem sie ihre Orientierung ändern oder andere Konformationen einnehmen, indem sie ihre Transmembranhelices biegen und so ihre Länge anpassen.<sup>45–47</sup> Auch wurde das Clustern von Proteinen und der damit einhergehenden Minimierung der Spannung am fehl-angepassten Protein-Membran-Interface beobachtet.<sup>48</sup> Die Membrandicke kann allerdings auch über den Anteil an Cholesterol, welches die Membrandicke erhöht, reguliert werden.<sup>49</sup>

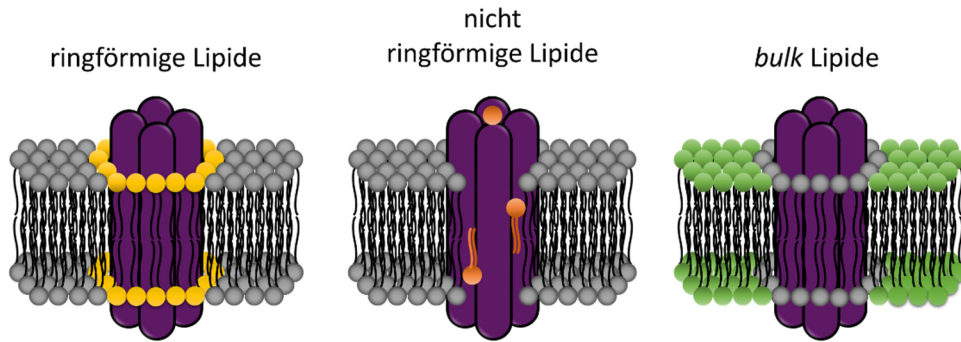


**Abbildung 3: Schema der Membraneinbettung von Membranproteinen.** Eine hydrophobe Fehlanpassung tritt ein, falls die Länge der Transmembrandomäne ( $D_{TM}$ ) und die Dicke der Lipiddoppelschicht ( $D_{HT}$ ) nicht übereinstimmen. Es kann sowohl zu einer positiven (A), als auch negativen (B) Fehlanpassung kommen.<sup>34</sup>

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Membrandicke und ein daraus resultierender hydrophober *mismatch* Einfluss auf die Faltung, Konformation, Oligomerisierung sowie die Proteinaktivität haben kann. Um den Membranaufbau und die Funktionalität von Membranproteinen zu verstehen, ist es folglich auch von enormer Bedeutung die exakte Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht zu kennen.

Einen weiteren wichtigen Punkt stellen auch die Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen dar. So ist bekannt, dass Lipide einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität eines Proteins besitzen.<sup>47</sup> Jedoch gestaltet sich die Untersuchung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen bis heute schwierig und ist Bestandteil aktueller Forschung. Erste Einblicke in die Protein-Lipid-Wechselwirkungen lieferten hochaufgelöste Strukturen von lipidhaltigen Membran-Proteinen. Als Beispiele seien die Cytochrom c Oxydase<sup>50</sup> oder der bc1 Komplex<sup>51</sup> genannt, in dessen Hohlräumen zwischen den Untereinheiten oder in der Peripherie des Komplexes mehrere Lipide lokalisiert wurden.

Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden sind in drei Klassen unterteilt:<sup>44,52</sup> Ringförmig um MPs angeordnete Lipide (*annular lipids*), nicht-ringförmig angeordnete Lipide (*non-annular lipids*; auch als Co-Faktor oder Struktur-Lipide bezeichnet) und sog. *bulk lipids* (siehe dazu Abb. 4). Die sogenannten *annular lipids* (dt. ringförmige Lipide) vermitteln zwischen Protein und den weiteren umgebenden Lipiden und sind daher wichtig für die vertikale Positionierung des Proteins in der Lipid-Doppelschicht. *Non-annular lipids* (dt. nicht ringförmige Lipide) bezeichnet wiederum die Lipide, die sich in Hohlräumen der Proteinoberfläche, zwischen den Transmembranhelices der Proteine oder zwischen den Protein-Protein-Grenzflächen von multi-Untereinheiten-Proteinkomplexen befinden. Es wurde gezeigt, dass mit erhöhter Delipidation dieser Klasse von Lipiden ein Rückgang der Proteinaktivität einhergehen kann.<sup>47,52</sup> Diese spielen demnach eine besondere Rolle für MPs. Wechselwirkungen zwischen ringförmig und nicht-ringförmig angeordneten Lipiden mit Proteinen können auf zwei Arten erfolgen. Erstens, hydrophobe Wechselwirkung zwischen der Seitenkette der Membrandomäne des Proteins und der Fettsäurekette der Lipide, oder zweitens, hydrophile Wechselwirkungen zwischen polaren Aminosäureketten und der polaren Lipid-Kopfgruppe. *Bulk-lipids* hingegen interagieren nicht mit den Membranproteinen und repräsentieren die generelle Lipidzusammensetzung der Membran, die das Protein umgibt.<sup>34,44,52</sup>



**Abbildung 4: Lipid-Typen in Biomembranen.** Die ringförmig direkt um die MPs angeordneten Lipide (gelb) vermitteln zwischen den Proteinen und ihrem Lipidumfeld und sind daher wichtig für die vertikale Positionierung des MPs in der Lipid-Doppelschicht. Die nicht-ringförmigen Lipide (orange) sind entweder in Hohlräumen der Proteinoberfläche, zwischen den Transmembranhelices oder zwischen den Protein/Protein-Trennflächen von Komplexen aus multimeren Untereinheiten lokalisiert. Sie spielen beispielsweise eine wichtige Rolle für die Funktionalität der MPs. *Bulk* Lipide (grün) haben keinen direkten Kontakt mit dem MP und repräsentieren vielmehr die generelle Lipidzusammensetzung der Membran in der ein MP eingebettet ist.<sup>34</sup>

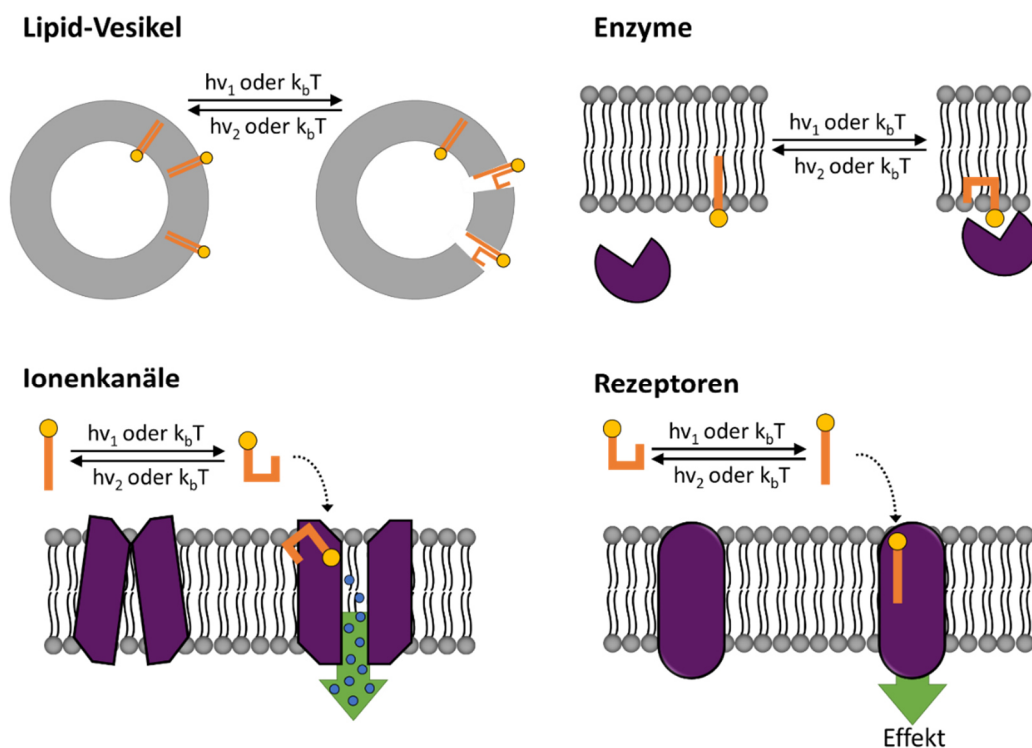
Wie erläutert, stellen die Art, die Beschaffenheit und die Wechselwirkungen zwischen Lipiden und MPs folglich einen wesentlichen Aspekt dar, den es auch hinsichtlich der Analyse eines MPs in Kombination mit MMs zu berücksichtigen gilt. So richtet sich bspw. die Wahl des genutzten Lipids für eine Solubilisierung mittels NDs nach der Art und Beschaffenheit des zu solubilisierenden MPs und muss ggf. zunächst in einem zeitaufwendigen Screening ermittelt werden. In SMALPs-solubilierten MPs hingegen sind die MPs umgeben von ihren natürlichen Lipiden bzw. deren natürlicher Lipidkomposition aus *bulk*, *annular* und *non-annular-Lipids*, was diesem MM-System grundsätzlich einen Vorteil gegenüber anderen MM-Systemen verschafft, wenn es darum geht, MPs funktional zu isolieren und strukturell biologisch zu analysieren. Ein detaillierter Einblick in die Eigenschaften, Besonderheiten, sowie Vor- und Nachteile der verschiedenen MMs, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind, sei unter Kapitel 2.3 gegeben.

### 2.2 Photoschaltbare Lipide als Werkzeug zur Membran- & Membranprotein-Analyse

Als Hauptbestandteil von Biomembranen spielen Lipide nicht nur eine wesentliche Rolle im Aufbau von Biomembranen. Mit ihrer enormen strukturellen und funktionellen Vielfalt sind sie Energiequellen, involviert in zelluläre Signalkaskaden und für die Aktivität von Membranproteinen von Bedeutung.<sup>33</sup> Über 40000 Lipide sind bis heute bereits in sog. „LIPID MAPS“ erfasst und via massenspektrometrischer Lipid-Analysen („*Lipidomics*“) werden stetig weitere neue Lipide entdeckt und identifiziert.<sup>53</sup>

Auf Grund der hohen Anzahl an Lipiden, ihrer geringen Größe und ihren physikalischen Eigenschaften, stellt sich die Aufklärung der biologischen Funktionen von Lipiden als herausfordernd dar.<sup>54,55</sup> Daher wurden verschiedene Methoden entwickelt, um Lipide zu modifizieren und sie so der Analyse zugänglicher zu machen. Die Modifizierung umfassen etwa Fluorophore zur Visualisierung, Isotopenmarkierung zur Quantifizierung oder auch sog. *Photo-Crosslinker*, *-Cages* oder *-Switches*, die eine optische Kontrolle der Lipidfunktionen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erlauben.<sup>56,27</sup>

Photoschaltbare Lipide (PLs) haben sich ebenfalls zu einem wichtigen Hilfsmittel zur präzisen Manipulation und zur Untersuchung von Proteinen entwickelt. Mittels PLs ist es möglich viele biophysikalische Aspekte von Membranen, wie etwa deren Permeabilität, Fluidität, Lipid-Mobilität und Domänenbildung zu untersuchen, aber auch gezielt lipidabhängige Funktionen von Enzymen, Ionenkanälen und Rezeptoren zu induzieren (siehe Abb. 5).<sup>27</sup>



**Abbildung 5: Beispiele der gezielten Manipulation von Membranen und MPs.** Mittels PLs ist es möglich viele biophysikalischen Aspekte von Membranen, wie etwa deren Permeabilität zu manipulieren und untersuchen. Auch können gezielt lipidabhängige Funktionen von Enzymen, Ionenkanälen und Rezeptoren induziert werden.<sup>nach 27</sup>



Photogecagete Lipide wiederum tragen eine Schutzgruppe, die die biologische Funktion eines Lipids inhibiert. Durch Bestrahlung kann die Schutzgruppe wieder entfernt werden, was zur Freisetzung der endogenen Lipide führt.<sup>57,27</sup> Diese Art der Manipulation erfordert allerdings eine chemische Veränderung der Lipid-Kopfgruppe, was signifikanten Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der Lipide haben kann. Im Gegensatz dazu tragen photoschaltbare Lipide Modifikationen für gewöhnlich im Bereich der lipophilen Kohlenwasserstoff-Ketten wodurch die Integrität der Lipid-Kopfgruppen erhalten bleibt.<sup>27</sup> Synthetische Photolipide beruhen beinahe ausschließlich auf Azobenzol-Photoschaltern. Diese können sehr schnell durch photochemische Isomerisierung einer N-N-Doppelbindung von einer linearen *trans*- in eine abgewinkelte *cis*-Konformation überführt werden (siehe Abb. 6).<sup>58</sup>

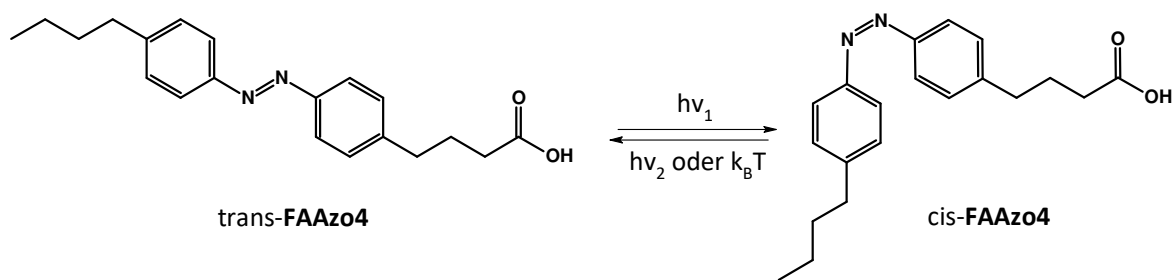


Abbildung 6: Isomerisierung des von Azobenzol abgeleiteten synthetischen photoschaltbaren Lipids FAAzo4 zwischen seiner *trans*- und *cis*-Form.<sup>58</sup>

Um membranbezogene Prozesse zu untersuchen, ist es grundsätzlich sinnvoll Lipide zu nutzen und zu modifizieren, die selbst auch Teil der Membrandoppelschicht sind. Zu diesem Zweck wurden photoschaltbare Amphiphile erforscht, die in Modellsystemen für Biomembranen, wie z.B. großen unilamellaren Vesikeln (*giant unilamellar vesicles*; GUVs), eingebaut werden können. Dies ermöglicht es Einfluss auf die Vesikel-Größe und deren Form, die Lipid-Lipid-Wechselwirkungen oder die Fluidität der Lipid-Doppelschicht zu nehmen sowie kontrolliert eine Membranspaltung zu induzieren.<sup>59–61</sup>

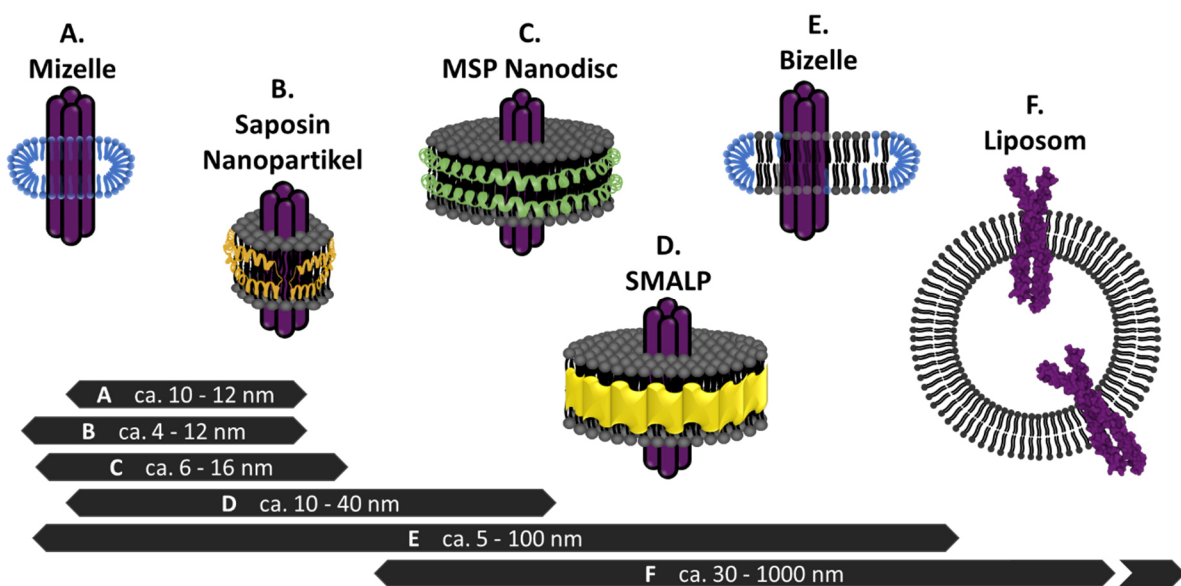
AzoTAB zählt zu einem der meist genutzten photoschaltbaren Amphiphile und enthält einen photoschaltbaren Lipid-Schwanz und ein quartäres Amin als kationische Kopfgruppe.<sup>62</sup> Ein weiterer häufig genutzter Vertreter dieser Klasse stellt das AzoPC dar.<sup>63,60,61</sup>

### 2.3 Membrane Mimicking Systeme zur Analyse von Membranproteinen

Wie unter Kapitel 2.1 beschrieben, hängt sowohl die Struktur als auch die Funktion eines Proteins stark von dessen Umgebung ab. Lipide spielen hierbei eine besondere Rolle. Aus diesem Grund ist man bestrebt Membranproteine in ihrem aktiven Zustand und in einer möglichst natur-ähnlichen Lipid-Umgebung zu untersuchen.

Üblicherweise werden Detergenzien genutzt, um Membranproteine zu solubilisieren. Unglücklicherweise haben diese oft einen negativen Effekt auf Proteine hinsichtlich deren Aktivität und Stabilität, wirken denaturierend oder sind nicht effizient genug, um Proteine aus der Membran zu lösen.<sup>64,65</sup> Aus diesem Grund wurden verschiedenste sog. *membrane mimics* (MMs) entwickelt, um MPs zu solubilisieren. Hierbei handelt es sich um Systeme, die teils auf unterschiedliche Art und Weise eine Lipid-Doppelschicht nachahmen, in die ein Protein eingebettet wird.

Als Beispiele für ein solches MM-System sind die häufig Anwendung findenden Liposome oder Nanodiscs zu nennen.<sup>9,6</sup> Die Massenspektrometrie, insbesondere LILBID-MS, hat sich hierbei als eine sehr wertvolle Methode herausgestellt, um Membranproteine in bzw. aus MMs heraus zu untersuchen. Abbildung 7 zeigt einen Überblick über diverse MM-Systeme, auf die nachfolgend im Einzelnen näher eingegangen werden soll.<sup>8</sup>



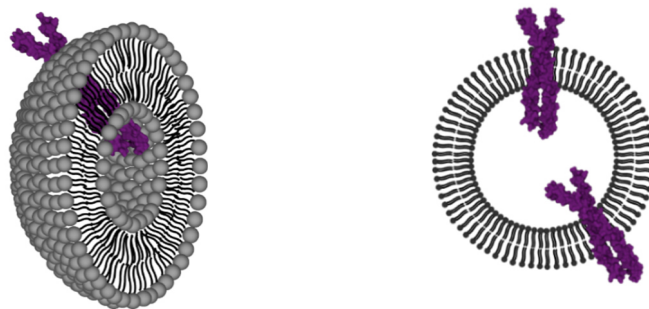
**Abbildung 7:** Schematische Darstellung häufig genutzter *membrane mimicking* Systeme zur Solubilisierung von Membranproteinen. Die Größe der Lipid-Doppelschichten variiert je nach MM-System von 4 nm (SapNPs) bis hin zu 1000 nm (Liposome).<sup>8</sup>

### 2.3.1 Liposome

Liposome stellen die im Grunde einfachste Form eines MM-Systems dar und finden daher häufig Anwendung in der Chemie, Biochemie und Biologie.<sup>66</sup> Bei Liposomen handelt es sich um sphärische Vesikel, bestehend aus Phospholipid-Doppelschichten, die eine wässrige Phase einschließen. Ähnlich den natürlichen Biomembranen ist die polare Kopfgruppe der Lipide der wässrigen Phase entgegengerichtet, während die unpolare Fettsäurekette den Fettsäureketten der gegenüberliegenden Lipid-Einzelschicht hin orientiert ist. In Abhängigkeit der Anzahl an Lipid-Doppelschichten werden Liposome in multilamellare oder unilamellare Vesikel klassifiziert.<sup>66,67</sup>

Liposome können variabel hinsichtlich ihrer Größe, Zusammensetzung und amphiphilen Charakters hergestellt werden, was sie für eine Breite an Anwendungen zugänglich macht.<sup>66</sup> Bei Verwendung von sog. Proteo-Liposomen tritt allerdings ein Problem bezüglich der korrekten Orientierung der Proteine in der Liposom-Membran auf. Es können zwei Populationen resultieren, in denen die Proteine *inside-out* und *outside-out* in der Membran eingebettet sind (siehe Abb. 8).<sup>68,69</sup> Auch ist anzumerken, dass die Liposom-Membran gekrümmt ist und dies grundsätzlich Einfluss auf die Orientierung oder Struktur des Proteins haben kann.<sup>34</sup>

In frühen MS-Studien wurden Liposome genutzt, um den Wasserstoff/Deuterium-Austausch an Membranpeptiden zu untersuchen.<sup>70</sup> Auf Grund ihrer Größe und Heterogenität finden Liposome jedoch kaum Anwendung in der MS.<sup>69</sup> Neueste MS-Studien zeigten allerdings, dass Lipide auch direkt aus Lipid-Doppelschichten von Liposomen identifiziert und quantifiziert werden können.<sup>71</sup>



**Abbildung 8: Schematische Darstellung von Liposomen.** Bei Liposomen handelt es sich um sphärische Vesikel, bestehend aus einer oder mehrerer Phospholipid-Doppelschichten die eine wässrige Phase umschließt. Bei Verwendung von Liposomen tritt allerdings ein Problem auf bezüglich der korrekten Orientierung der Proteine (lila) in der Liposom-Membran. Es können zwei Populationen resultieren, *inside-out* und *outside-out*.<sup>34,69</sup>

### 2.3.2 Nanodiscs

Bei Nanodiscs (NDs) handelt sich um discoidale Lipid-Doppelschichten, welche je von zwei amphipathischen helikalen Ringproteinen eingefasst sind, den sogenannten *membrane scaffold proteins* (MSPs; dt. Membran-Gerüst-Proteine).<sup>72</sup>

Abbildung 9 zeigt den schematischen Aufbau einer Nanodisc. Der ND-Aufbau wurde mit zahlreichen Methoden, wie beispielsweise Cryo-EM<sup>73</sup> (Kryo-Elektronenmikroskopie), SAXS<sup>74</sup> (*small-angle X-ray scattering*; dt. Kleinwinkelstreuung von Röntgenstrahlen) und *solid-state* NMR<sup>75</sup> (*nuclear magnetic resonance*; dt. Festphasen-Kernspinresonanzspektroskopie), untersucht und bewiesen.

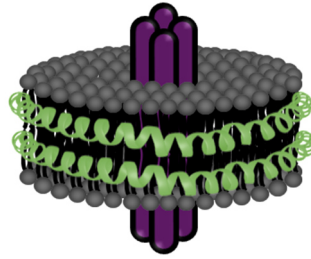
Je nach verwendetem MSP kann die Ringgröße der Discs 8 - 16 nm im Durchmesser betragen und hunderte von Lipiden umfassen. Die Größe einer ND kann mittels *size exclusion chromatography* (SEC; dt. Größenausschluss-Chromatographie) und SAXS ermittelt werden. Zusätzlich kann die Form der ND mit *atomic force microscopy* (AFM; Atomkraftmikroskopie), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) oder SAXS untersucht werden.<sup>76–78,13</sup>

Durch Wahl und Stöchiometrie der zur Assemblierung von NDs genutzten Lipide ist es möglich die Membrandicke den untersuchten Proteinen anzupassen und so auch eine hydrophobe Fehlanpassung zu vermeiden (siehe dazu Kapitel 2.1). Üblicherweise beträgt die Dicke der ND-Doppelschicht etwa um die 6 nm.<sup>72</sup>

NDs sind monodispers und klar definiert und repräsentieren eine gute und nativ-ähnliche Umgebung für Membranproteine.<sup>79</sup> Zudem sind sie stabil in Lösung über einen weiten Temperaturbereich.

Auch sind in den NDs die zu untersuchenden Membranproteine von beiden Seiten gleichermaßen leicht zugänglich, was für eventuell zu untersuchende Ligand-Interaktionen von Vorteil ist.<sup>77,80</sup> Allerdings war es mittels NDs, mangels eines definierten Zellinneren bzw. -äußeren, lange Zeit nicht möglich einen Ionen-Substrat-Transport zu untersuchen. Henrich *et al.*<sup>14</sup> zeigten 2017 jedoch erstmals, dass an immobilisierten NDs auch der Ionen-transport gemessen werden kann und dieser zudem mit dem in Proteo-Liposomen vergleichbar ist.

NDs fanden bereits in vielen Studien Anwendung. Eine gute Übersicht kann in Denisov & Sligar *et al.*<sup>76</sup> gefunden werden.



**Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer Nanodisc.** Zwei sog. *membrane scaffold* Proteine (grün) spannen eine scheibenförmige Lipid-Doppelschicht, in der ein MP (lila) eingebettet werden kann. NDs sind monodispers und klar hinsichtlich ihrer Größe durch die genutzten MSPs definiert.

Neben den genannten Vorteilen von NDs gibt es allerdings auch einige Nachteile. Die MSP Darstellung, Aufreinigung und das Ermitteln einer geeigneten Lipid-Zusammensetzung, in dem das zu untersuchende Protein gänzlich aktiv ist, stellt sich oftmals als zeitaufwendig heraus und erfordert zusätzliche Experimente.<sup>34</sup>

Die Darstellung der NDs gehorcht einem sog. *self-assembly*-Prozess (dt. Selbstassemblierungsprozess). In einem ersten Schritt werden MSPs und Lipide in Detergens solubilisiert und mit einander gemischt. Anschließend Entfernung des Detergens via Dialyse induziert die Assemblierung der MSPs und Lipide von selbst zu NDs.<sup>81,82</sup>

Im Zuge der Darstellung von MPs in NDs werden die Proteine klassischerweise zunächst *in vivo* überexprimiert, die Zellwand aufgebrochen und anschließend in Detergens aufgereinigt, ehe das MP post-translational in die ND insertiert wird. Der Einbau von MPs in NDs kann allerdings auch co-translational erfolgen. Sowohl das Aufbrechen der Zellwand als auch der Kontakt mit Detergens können jedoch die zu untersuchenden Eigenschaften von MPs beeinflussen, was wiederum ein Problem für die weitere Analyse von fragilen und sensitiven MPs darstellen kann. Um diese Problematik zu umgehen, können Cell-Free (CF) Expressionssysteme genutzt werden. Ein CF System benötigt keine Zellwand und sowohl die gesamte Expression als auch die MP Insertion kann gänzlich frei von Detergens erfolgen. Eine detaillierte Beschreibung der CF-Expression und dessen Prinzips ist unter Kapitel 5.3 gegeben.

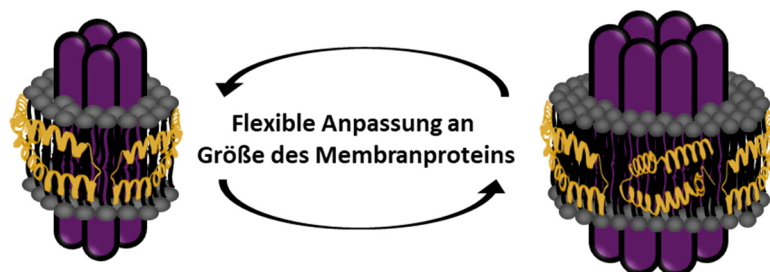
Hinsichtlich der massenspektrometrischen Analyse besitzen NDs einen weiteren Nachteil. Die zusätzlichen Signale von *Bulk*-Lipiden und des MSPs erschweren eine Auswertung der Spektren für viele herkömmliche native MS-Methoden, wie nESI. Zudem werden relativ hohe Kollisionsenergien benötigt, um die Proteine in der Gasphase des Massenspektrometers aus der ND freizusetzen, wodurch der native Oligomierzustand häufig zerstört wird.<sup>34</sup> Um den genannten Problemen entgegenzuwirken, werden spezielle MSPs entwickelt, welche das

Interpretieren der Spektren erleichtern sollen.<sup>83</sup> Auch durch Zugabe spezieller Reagenzien, die die Freisetzung des Proteins aus der ND erleichtern und dabei nur wenige Lipide am Protein gebunden lassen oder gar die ND samt Protein als Ganzes stabilisieren und detektierbar machen, sind derzeit Bestandteil der Forschung.<sup>84</sup>

Die Analyse von MPs in NDs mittels LILBID-MS ist hingegen nicht von den zuvor beschriebenen Problemen betroffen und macht diese Methode daher zu einem hervorragenden Werkzeug um MPs aus NDs heraus zu analysieren. In LILBID-MS Studien von Peetz & Henrich *et al.*<sup>15</sup> wurde beispielsweise gezeigt, dass die Insertion von MP-Monomeren in eine ND schrittweise erfolgt und sich der MP-Komplex erst in der ND ausbildet. Zudem wurden keine Abweichungen vom nativen oligomeren Zustand hin zu größeren, künstlichen Oligomeren im Zuge der Insertion von MPs in NDs und bei deren Analyse mittels LIBLID-MS beobachtet.

### 2.3.3 Saposin-Nanopartikel

Eine neuere alternative Methode zu MSP-NDs stellt das sogenannte „Salipro“-System dar, auch *saposin-derived lipid nanoparticles*, kurz SapNPs genannt.<sup>23</sup> Dieses MM-System basiert darauf, dass die vier Saposin-Proteine A, B, C, D in Gegenwart von Lipiden ND-ähnliche Konstrukte bilden. Ähnlich zu den MSPs in NDs fungieren die Saposine als Gerüst-Proteine (siehe Abb. 10), die es ermöglichen Membranproteine in einer Lipid-Umgebung zu solubilisieren.<sup>85</sup>



**Abbildung 10: Schematischer Aufbau von Saposin-Nanopartikeln.** Ähnlich einer MSP-ND fungieren Saposine (gelb) als Gerüst-Proteine, die eine Lipid-Doppelschicht aufspannen und es ermöglichen so MPs (lila) zu solubilisieren. Je nach Zielprotein können sich mehr oder weniger Saposine um ein Protein anordnen. Dadurch sind sie Verglichen mit MSP-NDs deutlich flexibler hinsichtlich der Solubilisierung von MPs unterschiedlicher Größe.

In ersten Studien wurde z.B. mittels *negative staining* Elektronenmikroskopie eine P-type ATPase in SapNPs charakterisiert.<sup>86</sup> Flayhan *et al.*<sup>85</sup> zeigten anhand eines umfangreichen Lipid-Screenings, dass sowohl das Lipid-Saposin-Verhältnis als auch die Effizienz, mit der sich SapNPs ausbilden, stark von der Lipid-Art abhängt. Ebenfalls konnten Flayhan *et al.*<sup>85</sup> am Beispiel der Proteine PepT<sub>St</sub> und T2 zeigen, dass Sap-NP eingekapselte MPs sowohl korrekt gefaltet vorliegen als auch mit Liganden wechselwirken können. Alle in Sap-NPs rekonstituierten Proteine zeigten zudem eine höhere thermische Stabilität als deren Pendants in Detergens.

Während bei MSP-NDs die Größe des MP-Komplexes, der eingekapselt werden kann, durch die Disc-Größe und folglich durch das genutzte MSP limitiert wird<sup>15</sup>, besitzen die Saposine den wesentlichen Vorteil, dass diese sich der Größe des Zielproteins entsprechend anpassen.<sup>85,23</sup> Je nach Zielprotein können sich mehr oder weniger SapNPs um ein Protein anordnen. Somit kann die zeitaufwendige Suche nach passenden Scaffold-Proteinen im Vergleich zu MSP-NDs reduziert werden.

Cryo-EM Strukturen und SAXS-Daten deuten darauf hin, dass SapNPs MPs auf eine sehr kompakte Art und Weise umgeben, bei der nur einige wenige Lipide zwischen den Saposinen und den MPs eingeschlossen sind.<sup>85</sup>

Da es sich bei den SapNPs um einen relativ neuen Ansatz handelt, bedarf es weiterhin deren Untersuchung in Verbindung mit anderen Analysetechniken, wie beispielsweise der MS. Aus diesem Grund ist eine LILBID-Analyse auch Teil dieser Arbeit.

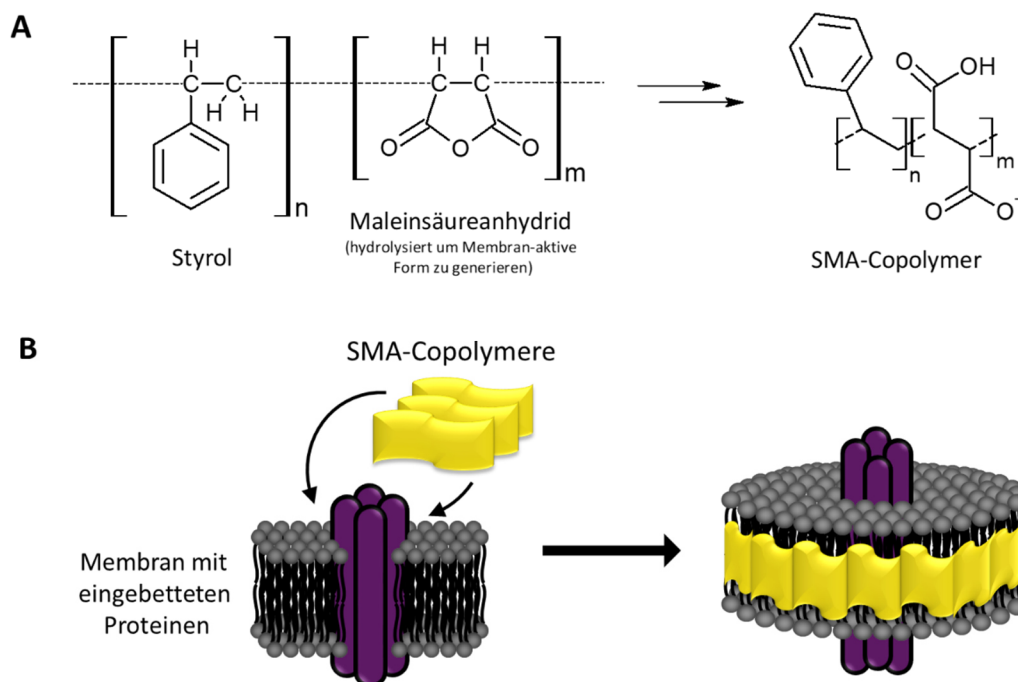
Für nähere Informationen zur Struktur und den Eigenschaften der SapNPs, insbesondere hinsichtlich des SapA, sei auf Kapitel 4.2 verwiesen.

### 2.3.4 SMALPs

Eine weitere neuere Innovation im Bereich der MMs stellen die sogenannten SMALPs dar. Bei dieser Technik werden amphiphile Styrol-Maleinsäureanhydrid (SMA)-Copolymere genutzt, die es vermögen MPs aus ihrer natürlichen Membran „auszustanzen“ (siehe Abb. 11). Der wesentliche Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine Isolierung ohne jeglichen Detergens-Kontakt erfolgen kann und die Proteine samt ihrer natürlichen Lipidumgebung in Lösung gehalten werden können.<sup>87</sup> Wie bereits erwähnt, kann dies hinsichtlich der Wahrung der MP-Funktionalität von großer Bedeutung sein.

Verglichen mit NDs, bei denen ein MSP mit definierter Masse zum Einsatz kommt, zeigt sich im Falle der SMA-Stöchiometrie und des Disc-Durchmessers allerdings eine gewisse Heterogenität, da die Anzahl an SMA-Polymeren, die die Proteine aus der Membran lösen zwar mit der Proteingröße korreliert, jedoch nicht klar definiert ist.<sup>88</sup> Bei aktuellen, kommerziell erhältlichen SMAs ist auch die Polymerkettenlänge und Zusammensetzung oftmals nicht wirklich eindeutig definiert. Die Heterogenität der SMA-Polymere und die damit einhergehenden variierenden Disc-Größen, sowie die gegebenenfalls sehr hohen Lipid-Anteile, stellen hinsichtlich der Auflösung für herkömmliche Massenspektrometer ein Problem dar.<sup>11</sup>

Anzumerken sei an dieser Stelle auch, dass grundsätzlich bei der Verwendung von SMALPs nicht nur direkt das Zielprotein alleine aus seiner natürlichen Membran gelöst wird, sondern alle sich in der Membran befindlichen Proteine, was eine umfangreichere Aufreinigung impliziert.



**Abbildung 11: Schema der MP-Solubilisierung mittels SMALPs. (A)** Die SMA-Copolymere setzen sich aus Styrol und Maleinsäureanhydrid zusammen. **(B)** Die SMA-Copolymere „stanzen“ MPs aus ihrer natürlichen Membran aus. Auf diese Weise können MPs in ihrer natürlichen Lipidumgebung isoliert und solubilisiert werden.<sup>87</sup>



Der Mechanismus wie die SMA-Polymere die Proteine aus der Membran lösen und sich die SMA-Nanodiscs ausbilden ist noch nicht vollständig geklärt. Scheidelaar *et al.*<sup>89</sup> schlagen ein Model vor, in dem davon ausgegangen wird, dass der Hydrophobe Effekt die treibende Kraft der Interaktion der SMA-Copolymere mit der Membran darstellt und durch elektrostatische Wechselwirkungen moduliert wird. Xue *et al.*<sup>90</sup> postulieren auf Basis von *coarse-grained* Molekulardynamik- (MD-) Simulationen einen vierstufigen Mechanismus:

- 1.) Die SMA-Copolymere binden zunächst über die Styrol-Reste an die Membranoberfläche.  
Die hydrophoben Wechselwirkungen initiieren die Insertion mit dem Kern der Lipid-Doppelschicht.
- 2.) Die vollständige Insertion erfolgt über die hydrophoben Seitenketten der SMA-Copolymere und verursachen eine lokale Membranwellenbewegung.
- 3.) Eine Verlagerung der SMA-Copolymere entlastet die induzierte Spannung in der Membran und es bilden sich kleine transmembrane (Wasser-)Poren aus.
- 4.) Ein Wachstum der Transmembranporen setzt ein. Die SMA-Copolymere stabilisieren den Randbereich in dem sich deren Carboxylgruppen in Richtung der Wasserporen orientieren. Die Benzolgruppen schieben sich zwischen die lipophilen Lipidketten. Dies führt zu einem Zerreißen der Membran und begünstigt die Nanodisc-Ausbildung.

## 3. Theorie Massenspektrometrie

### 3.1 Allgemeine theoretische Grundlagen

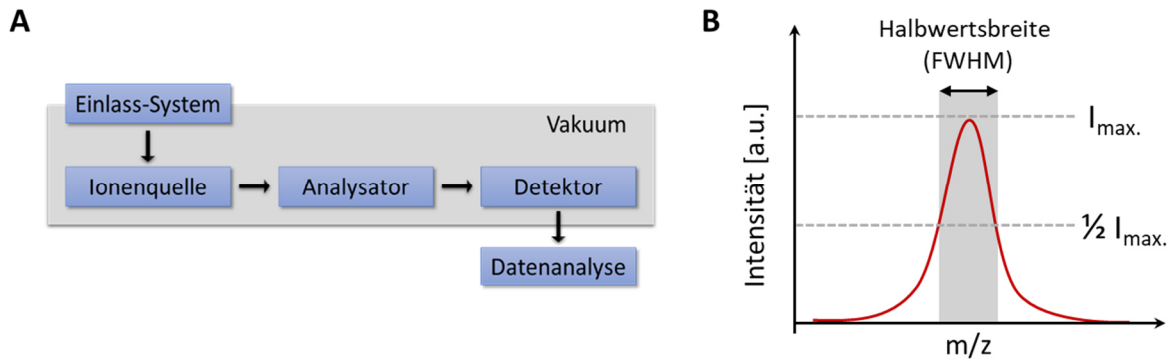
Die Massenspektrometrie (MS) bezeichnet allgemein ein Verfahren mit dem die Masse, bzw. das Masse-zu-Ladungsverhältnis, von Molekülen bestimmt werden kann. Die MS liefert jedoch nicht nur Informationen bezüglich der Masse eines Analyt-Moleküls. Modernste Massenspektrometer ermöglichen ebenfalls Rückschlüsse auf die elementare Zusammensetzung, sowie auf die molekulare Struktur eines Analyten.

Der Grundstein der heutigen MS wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts durch J. J. Thomson gelegt. Thomson stellte basierend auf Experimenten, in denen er in Vakuumröhren Kathodenstrahlen mittels elektromagnetischen Feldern ablenkte, grundlegende Gleichungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen Masse und Geschwindigkeit auf.<sup>91</sup> Die Grundsteine des Designs heutiger Massenspektrometer wurden wiederum 1918/1919 von Arthur Jeffrey Dempster<sup>92</sup> und Francis William Aston<sup>93</sup> gelegt.

#### 3.1.1 Aufbau eines Massenspektrometers & das Massenspektrum

Der Aufbau eines Massenspektrometers besteht grundsätzlich aus drei Hauptkomponenten, der Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor (siehe Abb. 12, A).<sup>94,95</sup> In der Ionenquelle werden die Ionen in die Gasphase überführt oder gasförmige Proben ionisiert. Die Ionisation kann dabei auf vielen unterschiedlichen Wegen erfolgen. Auf die verschiedenen Arten der Ionisation wird im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen. Im Analysator werden die in der Ionenquelle erzeugten Ionen auf Basis des Masse-zu-Ladungs- ( $m/z$ -) Verhältnis separiert. Die Trennung der Ionen kann dabei ebenfalls auf unterschiedlichste Art und Weise erfolgen. Flugzeit-Analysatoren (*Time-of-Flight*; ToF) stellen einen der meist genutzten Analysator-Typen dar. Auf deren Prinzip und Funktionsweise wird unter Kapitel 3.1.3 näher eingegangen.

Ein Massenspektrum ergibt sich letztlich aus den von einem Detektorsystem gezählten Ereignissen bezogen auf das  $m/z$ -Verhältnis. Die Menge an gezählten Ereignissen wird als *counts* oder als Intensität mit willkürlicher Einheit (a.u.; *arbitrary unit*) in einem Histogramm erfasst (Y-Achse). Die X-Achse repräsentiert das  $m/z$ -Verhältnis und wird üblicherweise dimensionslos angegeben (siehe Abb. 12, B).



**Abbildung 12: Grundlegende Bauteile eines Massenspektrometers und Schema eines Massenspektrums.** (A) Jedes Massenspektrometer lässt sich in die drei elementaren Bausteine Ionenquelle, Analysator und Detektor unterteilen. Hinzukommt ein Einlass-System, sowie ein System zur Datenanalyse. (B) Ein Massenspektrum ergibt sich aus den von einem Detektorsystem gezählten Ereignissen bezogen auf das  $m/z$ -Verhältnis. Letzteres wird üblicherweise dimensionslos angegeben. Die Menge an gezählten Ereignissen wird als *counts* oder als Intensität mit willkürlicher Einheit (a.u.; *arbitrary unit*) angegeben. Die Auflösung von Signalen ist in der Regel über die Halbwertsbreite (FWHM) definiert.  $I_{\max}$  = Intensitätsmaximum.

Die Auflösung bzw. Qualität von Signalen (*peaks*) in einem Massenspektrum, das heißt wie gut kann zwischen zwei Signalen unterschiedlichen  $m/z$ -Verhältnisses unterschieden werden, ist wie folgt definiert:<sup>96,97,5</sup>

$$(1) \text{ Resolution } R = \frac{M}{\Delta M_{FWHM}}$$

mit  $M$  = Masse des Peaks und  $\Delta M_{FWHM}$  = Halbwertsbreite (engl. *full width at half maximum*)

Eine höhere Auflösung bedeutet folglich eine bessere Separation von Signalen.

### 3.1.2 Ionenquellen & Ionisationsarten

In der Ionenquelle werden die zu untersuchenden Moleküle in die Gasphase überführt und ionisiert. Durch Zufuhr von Energie werden die Analytmoleküle in gasförmige Ionen überführt. Zur Ionisation kann die kinetische Energie von Elektronen, Photonen oder von anderen Ionen/Molekülen genutzt werden. Ebenso kann eine Ionisation mittels thermischer oder elektrischer Energie erfolgen.<sup>98,94</sup> Tabelle 1 liefert einen Überblick über einige Ionisationsarten in der MS.

Die Art der Ionisationsmethode hat maßgeblichen Einfluss auf das Massenspektrum eines Moleküls. Man unterscheidet daher oft auch zwischen einer harten und einer weichen Ionisation. Während bei letzterer hauptsächlich Molekül- oder Quasi-Molekülionen (z.B.

[M+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>) gebildet werden, sorgt im Gegensatz dazu eine hohe zugeführte Energie im Fall der harten Ionisation zu einer Fragmentierung des Analyt-Moleküls. Da das Fragmentierungsmuster wiederum von der chemischen Struktur des Moleküls abhängt, kann hiermit auch indirekt Strukturaufklärung betrieben werden.<sup>94</sup> Im Falle der weichen Ionisation können Strukturinformationen durch eine zusätzliche Stoßaktivierung in einer sog. *collision cell* erhalten werden (siehe dazu auch Kapitel 3.4).

**Tabelle 1: Übersicht der gängigsten Ionisationsarten in der Massenspektrometrie.**<sup>nach 99,98</sup>

Methode	Englische Bezeichnung	Abk.	Ionisierendes Agens	Typ
<b>Chemische Ionisation</b>	Chemical Ionisation	CI	Ionische Reaktandgase	G
<b>Elektronenstoß-Ionisation</b>	Electron Impact Ionisation	EI	Elektronen	G
<b>Elektrospray-Ionisation</b>	Electrospray Ionisation	ESI	Elektrisches Potential	S
<b>Beschuss mit schnellen Atomen</b>	Fast Atom Bombardment	FAB	Energiereiche Atome	D
<b>Felddesorption</b>	Field Desorption	FD	Elektrisches Feld	D
<b>Feldionisation</b>	Field Ionisation	FI	Elektrisches Feld	G
<b>Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation	MALDI	Laser	D
<b>Plasmadesorption</b>	Plasmadesorption	PD	<sup>252</sup> Cf-Zerfallsnuklide	D
<b>Thermospray-Ionisation</b>	Thermospray Ionisation	TS	Thermische Energie	S

Typ: G = Gasphasenionenquelle; D = Desorptionsquelle, S = *Spray*-Ionenquelle

### 3.1.3 Analysatoren – Prinzip eines ToF-Analysators

Im Analysator werden die in der Ionenquelle erzeugten Ionen auf Basis des Masse-zu-Ladungs- (m/z-) Verhältnis separiert. Die Trennung der Ionen kann dabei auf unterschiedliche Arten erfolgen und beruht auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien:<sup>96,100</sup>

- 1.) Ablenkung von Ionenstrahlen in magnetischen oder elektrischen Feldern. Man spricht hierbei auch von sog. Sektorfeldgeräten.
- 2.) Auf der unterschiedlichen Flugzeit von Ionen in einem feldfreien Raum (Flugzeit-Analysatoren; ToF).
- 3.) Filterung von Ionen unterschiedlicher Masse in elektromagnetischen Wechselfeldern (Ionenfallen (z.B. Orbitrap, Quadrupol-Ionenfalle oder ICR)).

Für spezielle Messungen können auch mehrere Analysatoren hintereinandergeschaltet werden (Tandem-Massenspektrometer; MS/MS).<sup>100</sup>

Bei einem ToF macht man sich zu Nutze, dass im Zuge der Ionisation die Ionen unterschiedlicher  $m/z$ -Verhältnisse unterschiedlich stark durch ein externes elektrisches Feld beschleunigt werden. Sie durchqueren folglich eine feldfreie Flugstrecke bis zum Detektor unterschiedlich schnell. Die Ermittlung der  $m/z$ -Verhältnisse erfolgt somit über das Messen der Zeit, die die Ionen benötigen, um durch die feldfreie Region zwischen Ionenquelle und Detektionseinheit zu fliegen.<sup>96,101</sup>

Unabhängig von der Ionisationsmethode ist hierbei die elektrische Ladung  $q$  eines Ions gleich einer ganzzahligen Anzahl  $z$  von Elementarladungen  $e$ , d.h.  $q = e \cdot z$ . Bevor ein Ion der Masse  $m$  nun die Quelle verlässt, wird es durch ein Potential  $U_s$  beschleunigt. Die potentielle Energie  $E_{el}$  des geladenen Teilchens wird in kinetische Energie  $E_{kin}$  umgewandelt. Es gilt:<sup>96,101</sup>

$$(2) \quad E_{kin} = \frac{mv^2}{2} = qU_s = zeU_s = E_{el}$$

Unter der Annahme, dass das Ion sich ursprünglich im Ruhezustand befand, folgt für die Geschwindigkeit  $v$  des Ions beim Verlassen der Ionenquelle:

$$(3) \quad v = \sqrt{\frac{2zeU_s}{m}}$$

Nach der anfänglichen Beschleunigung fliegen die Ionen mit konstanter Geschwindigkeit  $v$  in einem feldfreien Raum zum Detektor. Die Zeit  $t$ , die benötigt wird die Distanz  $L$  zwischen Ionenquelle und Detektor zu überwinden, ist gegeben durch:

$$(4) \quad t = \frac{L}{v}$$

Durch Einsetzen von (3) in (4) folgt, dass das  $m/z$ -Verhältnis durch Messung von  $t^2$  ermittelt werden kann:

$$(5) \quad t^2 = \frac{m}{z} \left( \frac{L^2}{2eU_s} \right)$$

Aus (5) ergibt sich zudem, dass ein Ion die Detektionseinheit umso schneller erreichen wird, je geringer das  $m/z$ -Verhältnis ist.<sup>96,101</sup>

#### 3.1.4 Detektoren in der Massenspektrometrie

Die in der Ionenquelle gebildeten und vom Analysator gemäß ihres  $m/z$ -Verhältnisses getrennten Ionen werden letztlich von einer Detektor-Einheit registriert. Der Detektor erzeugt wiederum ein elektrisches Signal, das nach Digitalisierung zur Auswertung an ein Datensystem weitergegeben wird.

Je nach Anforderung kommen die unterschiedlichsten Detektoren in der MS zur Anwendung. Man unterscheidet hierbei grundsätzlich zwischen zwei Detektor-Typen, jene bei denen die Aufnahme eines Massenspektrums ortsabhängig und jene bei denen die Aufnahme zeitabhängig erfolgt.<sup>101</sup>

Von ortsabhängiger Detektion spricht man, wenn die Ionen vom/im Analysator auf Bahnen mit unterschiedlichem Radius gelenkt und dadurch an verschiedenen Orten registriert werden (z.B. Fotoplatte; Array-Detektor).<sup>101</sup> Das eingangs erwähnte erste Massenspektrometer von Arthur Jeffrey Dempster und Francis William Aston detektierte auf diese Weise.<sup>102</sup>

Meist erfolgt jedoch die Detektion zeitabhängig, so auch im nachfolgend behandelten LILBID-Massenspektrometer (siehe Kapitel 3.3). Die Ionentrennung ist hierbei so gestaltet, dass Ionen mit unterschiedlichem  $m/z$ -Verhältnis nacheinander bzw. zu unterschiedlichen Zeiten einen Ort erreichen. Nach diesem Prinzip arbeiten beispielsweise Sekundärelektronenvervielfacher- oder Szintillationsdetektoren.<sup>96,101</sup>

Die wichtigsten Kenngrößen eines Detektors sind neben den statischen Größen Genauigkeit und Empfindlichkeit auch der Detektionsbereich, sowie die Ansprechzeit (dynamische Größen). Da nicht jeder Detektor-Typ für alle Kenngrößen gleichermaßen optimale Werte liefert, richtet sich die Detektorwahl nach den Anforderungen des jeweiligen Messproblems.<sup>102</sup> So ist beispielsweise LILBID-MS grundsätzlich eher auf die Detektion von hohen Massen ausgelegt, entsprechend kommt eine auf hohe Massen optimierte Detektoreinheit auf Basis eines Sekundärelektronenvervielfachers und eines Szintillators zum Einsatz (siehe Kapitel 3.3).

### 3.2 Native Massenspektrometrie

Neuere Entwicklungen im Bereich der Massenspektrometrie sorgten dafür, dass die MS eine starke und vielseitige Methode zur Untersuchung von Membranproteinen oder Protein-Lipid-Wechselwirkungen darstellt. Kommerziell erhältliche MS-Geräte bieten heutzutage zudem meist weitaus mehr Möglichkeiten als die reine Massenbestimmung. Oft wird die MS mit anderen Methoden kombiniert, um Substanzen zu untersuchen. Als gängigste Beispiele seien die Kopplung mit Methoden wie Gas-Chromatografie (GC)<sup>100,97</sup> oder der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC)<sup>94</sup> genannt.

Ein kleineres MS-Anwendungsfeld stellt die sogenannte native MS dar. Diese ermöglicht und widmet sich der Untersuchung oftmals weniger stabiler nicht-kovalenter Protein-Protein- und Protein-Ligand-Komplexe. Die native MS fokussiert sich zudem darauf die Struktur und Funktionalität von intakten Membranproteinen zu analysieren. Es können Informationen bezüglich Stöchiometrie und Wechselwirkungen einzelner Untereinheiten von Proteinkomplexen gewonnen werden, ebenso wie der Effekt von Bindungspartnern oder Lipiden bzgl. der Proteinstabilität untersucht werden kann.<sup>103–105</sup> Die native MS stellt somit eine gute Alternative zu anderen gängigen Analysetechniken, wie NMR oder Elektronenmikroskopie, dar.

Ein großer Vorteil der nativen MS liegt in ihrer niedrigen unteren Nachweisgrenze. Während für NMR und X-Ray Probenkonzentrationen im Bereich von Millimol benötigt werden, genügen bei der nativen MS bereits Picomol.<sup>104</sup>

Einen weiteren Aspekt stellt der experimentelle Zeitaufwand dar. So hat sich zwar z.B. Cryo-EM als starke Methode zur Strukturanalyse von Membranproteinen etabliert, sie ist allerdings neben der erhöhten Nachweisgrenze (Nanomol) auch deutlich zeitaufwendiger.<sup>106</sup>

Es gibt zahlreiche weitere Techniken zur biologischen Strukturanalyse, wie etwa Elektronenspinresonanz-Spektroskopie<sup>107</sup> oder Förster-Resonanzenergietransfer<sup>108</sup>, um beispielsweise Abstände zwischen Aminosäuren zu bestimmen. Allerdings ist es im Rahmen dieser Analysemethoden notwendig in das Proteinsystem einzugreifen. Es müssen Farbstoffe oder Radikale kovalent in Biomoleküle eingebaut werden, wodurch ein Einfluss auf einen betrachteten Proteinkomplex nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Zwar liefert die native MS keine Informationen auf atomarer Ebene, dennoch zeichnet sie sich auf Grund der hohen Sensitivität und des nahezu uneingeschränkten Massenbereichs als hervorragende Technik zur Untersuchung der Topologie von MPs ab. Es konnten bereits sogar ganze Viren mit bis zu 18 MDa untersucht werden.<sup>109</sup>

Wie einleitend und in Kapitel 2.1 beschrieben, sind Biomoleküle oftmals sehr sensitiv gegenüber ihrer chemischen Umgebung wie pH-Wert, Puffer, Salzkonzentration, Lipiden und/oder Detergenzien und vielen weiteren Faktoren. Die Idee hinter nativer MS besteht darin, Biomoleküle aus einer so naturnahen Umgebung wie möglich heraus zu untersuchen. Berichte über erste mittels nativer MS nachgewiesener intakter wasserlöslicher Proteinkomplexe gehen zurück bis in die frühen 1990er Jahre.<sup>110</sup>

Eine besondere Herausforderung für die MS stellen jedoch Membranproteine dar. In der MS werden üblicherweise wässrige Lösungen genutzt. Mit ihren hydrophoben Regionen sind MPs allerdings nicht wasserlöslich und es müssen weitere Maßnahmen ergriffen werden, um diese in Lösung zu halten, eine Denaturierung und damit einhergehende unspezifische Aggregation oder Präzipitation zu vermeiden und letztlich für die Analyse mittels MS zugänglich zu machen. Dies kann, wie bereits erläutert, auf verschiedene Art und Weise geschehen, z.B. durch Einsatz eines Detergens oder durch den Einsatz eines MM-Systems.

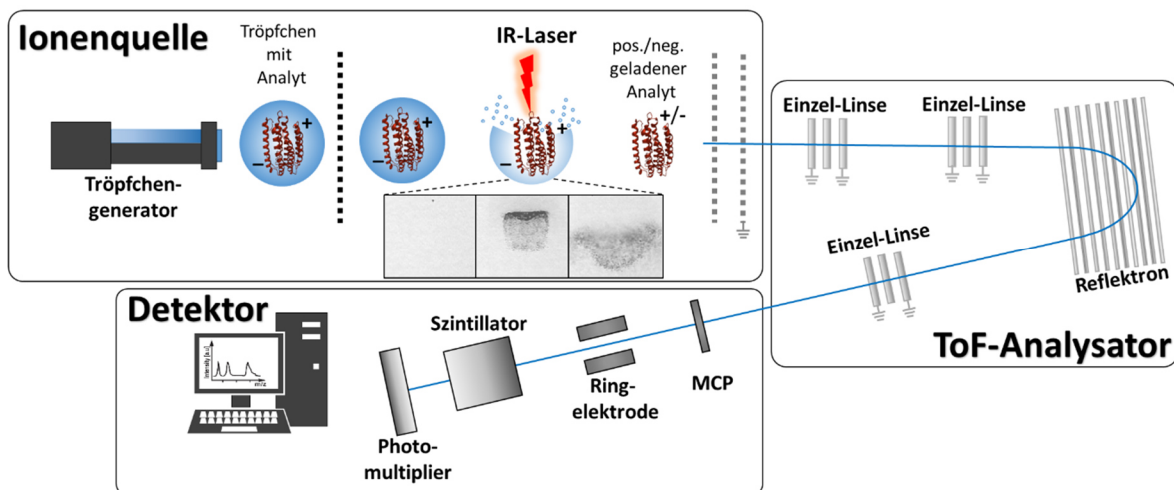
Kommerzielle Massenspektrometer, die im Rahmen der nativen MS Einsatz finden, basieren üblicherweise auf einer ESI-(Elektrospray Ionisation-) Ionenquelle. Im Jahr 2004 wurde erstmals mittels ESI-MS erfolgreich ein intakter MP-Komplex nachgewiesen.<sup>111</sup>

Morgner *et al.*<sup>112</sup> berichteten 2007 erstmals von der erfolgreichen Analyse eines intakten MPs mittels einer neu entwickelten Ionisationsmethode namens LILBID. Obgleich LILBID-MS nicht kommerziell erhältlich ist, so hat sie sich inzwischen als hervorragende native MS-Methode etabliert, um MPs aus MMs heraus zu untersuchen<sup>11,13,113</sup> und findet daher auch in dieser Arbeit Verwendung. Da zudem ESI-MS als kommerziell am meisten genutzte Methode der nativen MS von großer Bedeutung ist, soll in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich auf beide Ionisationsmethoden und ihre Unterschiede eingegangen werden.



## 3.3 LILBID-MS

Bei *laser induced liquid bead ion desorption* (LILBID) handelt es sich um eine sanfte Ionisations-Methode, die es ermöglicht spezifische, nicht-kovalent gebundene Biomolekülkomplexe und insbesondere auch MPs, unter nahezu nativen Bedingungen zu untersuchen. Der Aufbau des LILBID-MS lässt sich analog den unter Kapitel 3.1 genannten drei Bauelementen eines MS in Ionenquelle, Analysator und Detektor unterteilen (siehe Abb. 13). Das Prinzip der Ionenquelle besteht darin, wässrig gelöste Biomoleküle in Form von kleinen Tröpfchen ins Vakuum zu überführen und die Ionen durch anschließende Bestrahlung der Tröpfchen mittels IR-Laser freizusetzen.



**Abbildung 13: Schematischer Aufbau des LILBID-MS.** In der Ionenquelle werden wässrig gelöste Biomoleküle in Form von kleinen Tröpfchen ins Vakuum überführt und die Ionen durch anschließende Bestrahlung der Tröpfchen mittels IR-Laser freigesetzt. Als Analysator kommt ein ToF-Analysator zum Einsatz. In diesem sind zusätzlich drei Einzel-Linsen zur Fokussierung der Ionen, sowie ein Reflektoren integriert. Der Detektor wiederum besteht aus einer Kaskade von *multi-channel-plate* (MCP), Ring-Elektrode, Szintillator und Photomultiplier.

Ursprünglich wurde die LILBID-Ionenquelle 1996 von Bernhard Brutschy und seinen Mitarbeitern entwickelt.<sup>114</sup> Das ursprüngliche LILBID nutzte im Gegensatz zur heutigen Version noch einen flüssigen Alkoholstrahl (Methanol, Ethanol und Propanol), mit dem der Analyt ins Vakuum überführt wurde. Die Ionen wurden mittels eines CO<sub>2</sub>-Lasers, der auf die Wellenlänge der CO-Streckschwingung von Alkoholen eingestellt war, desolvatisiert.<sup>115,114</sup> 1999 wurde der CO<sub>2</sub>-Laser durch einen *mid*-IR-Laser getauscht. Von da an war es möglich die denaturierenden Alkohole durch eine wässrige Lösung zu ersetzen, aus der nun die Ionen freigesetzt werden konnten.<sup>116</sup> 2006 wurde ein Tröpfchenwerfer implementiert, wodurch zudem der Probenverbrauch deutlich verringert werden konnte.<sup>4</sup>

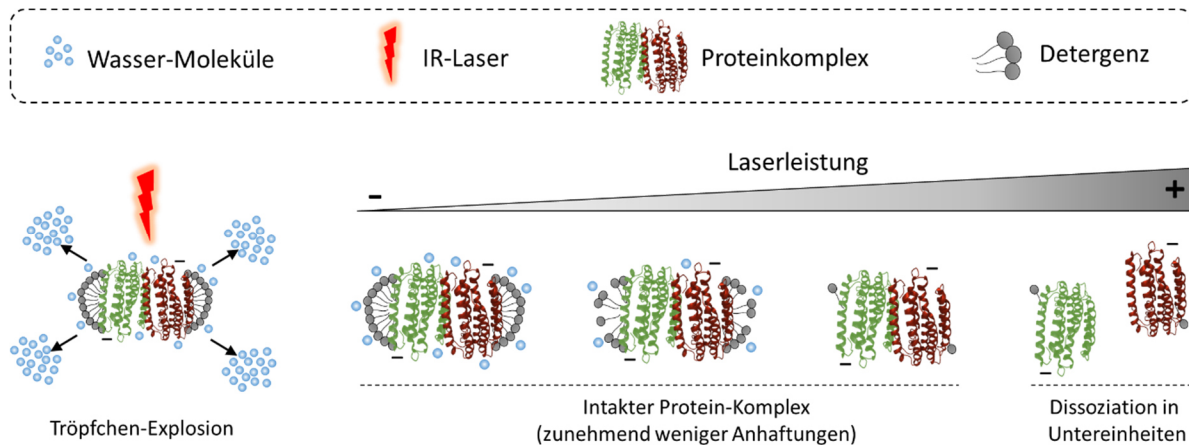
#### 3.3.1 Die LILBID-Ionenquelle

Die Analyt-Tröpfchen werden durch einen kommerziell erhältlichen Tröpfchengenerator von Microdrop erzeugt und arbeiten mit einer Frequenz von 10 Hz. Üblicherweise werden Tröpfchengeneratoren genutzt, die Tröpfchen mit einem Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  oder 30  $\mu\text{m}$  und einem Volumen von 65 pL bzw. 14 pL erzeugen. Die Tröpfchen-Erzeugung erfolgt bei einem Vorvakuum von etwa 100 mbar. Anschließend erfolgt eine Überführung der Tröpfchen über eine differenzielle Pumpstufe ins Hochvakuum (ca.  $10^{-5}$  mbar).<sup>117</sup> Innerhalb der Hochvakuum-Kammer werden die einzelnen Tröpfchen mittels *mid*-IR-Laser bestrahlt und so die Ionen freigesetzt. Das Laser-System besteht aus einem Nd:YAG-Pumplaser, der einen LiNbO<sub>3</sub>-basierten optisch parametrischer Oszillator (OPO) pumpt und bei einer Wellenlänge von 2.9  $\mu\text{m}$  arbeitet. Auf diese Weise kann bei einer Pulsbreite von 6 ns ein Energie-Output von bis zu 23 mJ erreicht werden.<sup>113</sup>

Die genutzte Laser-Wellenlänge entspricht der Absorptionswellenlänge der asymmetrischen und symmetrischen OH-Streckschwingung und führt dadurch zu einer Wärmeentwicklung innerhalb des wässrigen Lösemittel-Tropfens, wodurch dieser explosiv expandiert. Die wahrscheinlichste Erklärung für die hierbei erfolgende Freisetzung der Ionen liegt in einem Laser-induzierten, schnellen Phasenübergang in den superkritischen Zustand. Dieser superkritische Zustand expandiert sehr schnell im Hochvakuum, vergleichbar mit einem stark komprimierten Gas. Während des Prozesses der Ionenfreisetzung reduziert sich die Dielektrizitätskonstante, was zu einer Abschirmung der Ionen und Gegen-Ionen führt und eine Rekombination vieler Ionen zur Folge hat. Einige Ionen wiederum, die sog. *lucky survivors*, rekombinieren nicht und können detektiert werden.

An Protonentransferreaktionen wurde gezeigt, dass die Proteinladung bei LILBID abhängig vom isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins und des korrespondierenden Puffer-pH-Wertes ist.<sup>115</sup>

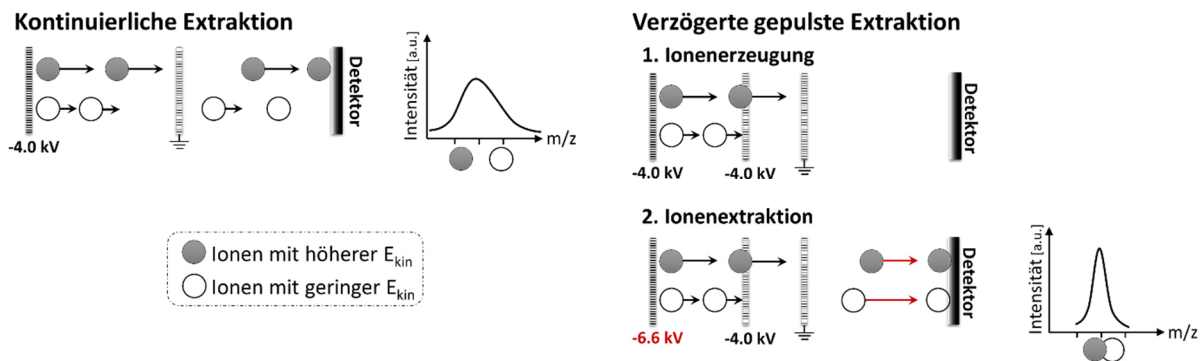
Mit zunehmender Laserleistung können mehr Anhaftungen wie Salze oder Detergenzien vom Proteinkomplex abgestreift werden, was zu einer besseren Auflösung führen kann. Gleichwohl können bei hoher Laserleistung nicht-kovalent-gebundene Proteinkomplexe in ihre einzelnen Bestandteile bzw. Untereinheiten dissoziiert werden (siehe Abb. 14).<sup>112,5</sup>



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der Ionenfreisetzung in Abhängigkeit der IR-Laserleistung bei LILBID-MS.** Mit zunehmender Laserleistung können mehr Anhaftungen wie Wasser-Moleküle, Salze, Detergenzien oder Lipide von intakten Proteinkomplexen abgestreift werden. Bei hoher Laserleistung können nicht-kovalent-gebundene Proteinkomplexe letztlich in ihre einzelnen Bestandteile dissoziiert werden.

Der Ionenquellenaufbau und die Ionenbeschleunigung basiert auf dem Prinzip einer Wiley-McLaren Ionenquelle.<sup>118</sup> Die Laserbestrahlung und die damit einhergehende Freisetzung der Ionen erfolgt zwischen einer Repeller- und einer Extraktor-Linse. Nach einer zeitlichen Verzögerung von 2  $\mu\text{s}$  bis 50  $\mu\text{s}$  wird ein Spannungspuls angelegt und die Ionen werden via Extraktor-Linse über eine dritte geerdete Elektrode in Richtung des Analysators beschleunigt.<sup>5</sup> In der Zeit zwischen Ionenerzeugung und Anlegen der Beschleunigungsspannung verteilen sich freigesetzte Ionen mit gleichem  $m/z$  mit unterschiedlicher kinetischer Energie in alle Raumrichtungen. Ionen mit höherer kinetischer Energie würden folglich den Detektor schneller erreichen, was eine Signalverbreiterung zur Folge hätte. Mittels gepulster *delayed extraction* (DE; dt. verzögerte Extraktion) kann die Streuung und die Geschwindigkeitsverteilung der Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis korrigiert werden (siehe Abb. 15). Auf diese Weise erreicht man eine Energie-Fokussierung der Ionen bzw. eine Signalbreiten-Reduzierung und folglich eine bessere Auflösung. Es sei angemerkt, dass diese Art der Fokussierung massenabhängig ist. Damit einhergehend kann nur ein bestimmter  $m/z$ -Bereich optimiert werden. Bei einer kürzeren DE werden Ionen mit geringerem  $m/z$ -Verhältnis fokussiert.<sup>5</sup>

Der Gradient zwischen der ersten Linse (Repeller) und der geerdeten dritten Linse beträgt immer 6,6 kV. Die angelegte Spannung am Repeller und der zweiten Linse (Extraktor) beträgt 4,0 kV, wobei der Repeller zusätzlich bis auf 6,6 kV gepulst wird.<sup>5</sup>



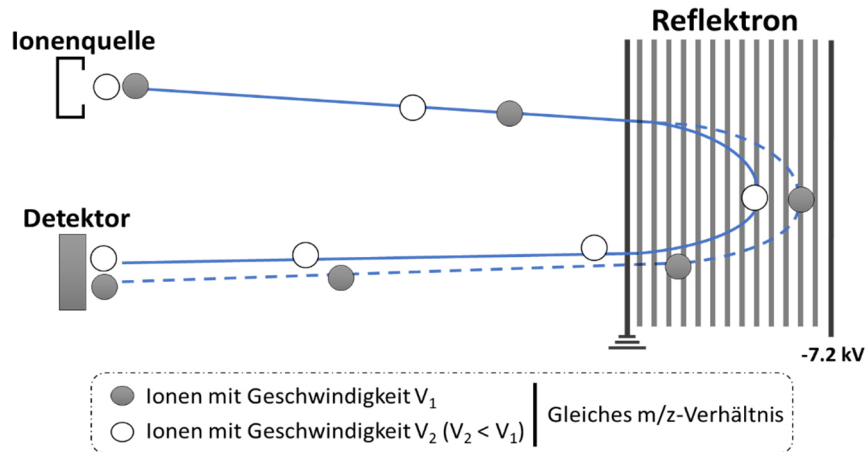
**Abbildung 15: Prinzip der kontinuierlichen und verzögerten gepulsten Extraktion.** Bei der verzögerten Extraktion wird zu einer definierten Zeit nach der Ionenfreisetzung ein gepulstes Feld angelegt. Auf diese Weise kann die anfängliche Geschwindigkeitsverteilung der in alle Raumrichtungen verteilten Ionen in Flugrichtung korrigiert werden.<sup>101</sup>

### 3.3.2 Analysator

Als Analysator kommt beim LILBID-MS ein Eigenbau *time-of-flight* (ToF) zum Einsatz. Das Prinzip dieses Analysator-Typs wurde bereits in Kapitel 3.1 erläutert. Zur Signalbreitenminimierung ist zusätzlich ein Reflektron integriert. Abbildung 16 zeigt das Prinzip eines Reflektrons. Dieses besteht im Grunde aus einer Reihe von Gitter-Elektroden die in äquidistantem Abstand angeordnet sind. Auf Grund eines angelegten Potentialgradienten wird ein Bremsfeld für die Ionen erzeugt. Um die Ionen zu „spiegeln“, muss die Reflektorspannung dabei höher als die Beschleunigungsspannung sein.

Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses und der Geschwindigkeit  $V_1$  dringen tiefer in das elektrische Bremsfeld des Reflektrons ein und verweilen dort länger als Ionen des gleichen  $m/z$ -Verhältnisses mit geringerer Geschwindigkeit  $V_2$ . Auf diese Weise wird erreicht, dass die anfänglich noch schnelleren und die langsameren Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis letztlich zeitgleich am Detektor ankommen.<sup>101</sup> Dies hat somit, analog der DE, eine Minimierung der Ionensignalbreite zur Folge.

Ebenfalls sind entlang der Flugstrecke vor und hinter dem Reflektron weiterhin Einzel-Linsen verbaut. Diese dienen zusätzlich der lateralen Fokussierung der Ionen und tragen folglich zur weiteren Verbesserung/Erhöhung der Transmission bei.<sup>5</sup>

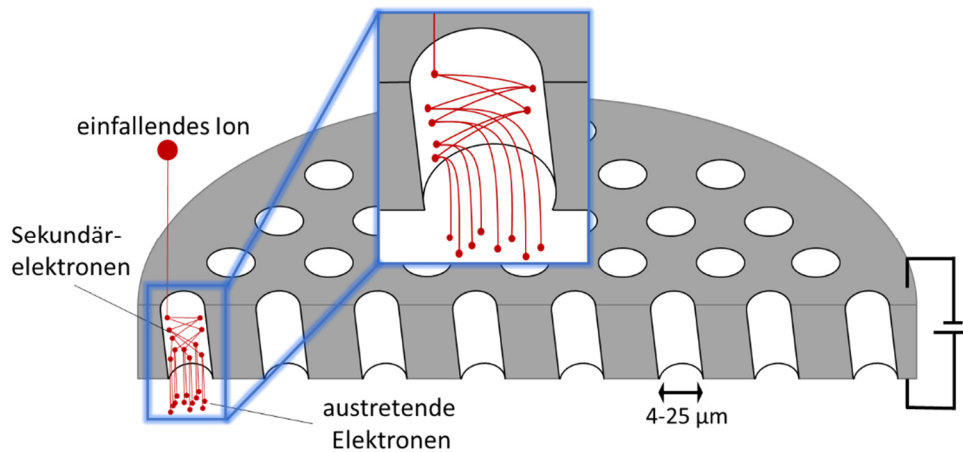


**Abbildung 16: Prinzip eines Reflektors.** Durch ein Reflektorn kann eine Minimierung der Ionensignalbreiten erreicht werden. Ionen mit gewissem  $m/z$ -Verhältnis und Geschwindigkeit  $V_1$  dringen tiefer in das elektrische Bremsfeld des Reflektors ein, als Ionen des gleichen  $m/z$ -Verhältnisses mit geringerer Geschwindigkeit  $V_2$ . Dadurch erreichen die anfänglich noch schnelleren und die langsameren Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis letztlich zeitgleich den Detektor. Die angegebenen Spannungen beziehen sich auf die genutzten Standardwerte im anionischen Betrieb des LILBID-MS.<sup>101</sup>

### 3.3.3 Detektor

Bei dem Detektor des LILBID-Setups handelt es sich um einen Hochmassen-Detektor basierend auf dem Prinzip eines Daly-Detektors.<sup>119</sup> Das Detektorsystem kann als kaskadische Anordnung einer *multi-channel-plate* (MCP), einer Ring-Elektrode, eines Szintillators und eines Photomultipliers betrachtet werden.

Zunächst kollidieren die Ionen mit einer der MCP, woraufhin Sekundärelektronen freigesetzt werden. Bei einer MCP handelt es sich um eine metallisierte Platte zwischen deren Eingangs- und Ausgangsseite ein Spannungsgradient angelegt wird (siehe Abb. 17). Die Platte selbst ist durchzogen von mehreren mikroskopisch feinen zylindrischen Kanälen mit einem Durchmesser von  $4 \mu\text{m}$  – bis  $25 \mu\text{m}$ .<sup>102,120</sup> In den einzelnen Kanälen treffen Elektronen mehrfach auf die Kanalwand und vervielfachen sich hierbei. Um sicherzustellen, dass die Kanalwände auch mehrfach getroffen werden, sind die Kanäle leicht verkippt angeordnet. Ein Gradient von  $1 \text{ kV}$  sorgt hierbei für eine Elektronenvervielfältigung um einen Faktor von  $10^2$ - $10^4$ .<sup>101</sup>



**Abbildung 17: Schematischer Aufbau und Prinzip einer MCP.** Bei einer MCP handelt es sich um eine metallisierte Platte zwischen deren Eingangs- und Ausgangsseite ein Spannungsgradient angelegt wird. Die Platte selbst ist durchzogen von mehreren mikroskopisch feinen zylindrischen Kanälen mit einem Durchmesser von 4 - 25  $\mu\text{m}$ . In den einzelnen Kanälen treffen Elektronen mehrfach auf die Kanalwand und vervielfachen sich hierbei. Um sicherzustellen, dass die Kanalwände auch mehrfach getroffen werden, sind die Kanäle leicht schräg angeordnet.<sup>101,120</sup>

Zwischen Vorder- und Rückseite der MCP liegt ein Gradient von 1 kV an. Bei LILBID-MS werden üblicherweise hohe  $m/z$ -Werte erfasst. Da die Verstärkung einer MCP vom Impuls abhängt und stark mit steigendem  $m/z$ -Verhältnis abfällt, wird die MCP Vorderseite wiederum mit einem Gradienten von 17 kV gegenüber der feldfreien Flugstrecke betrieben.<sup>5</sup>

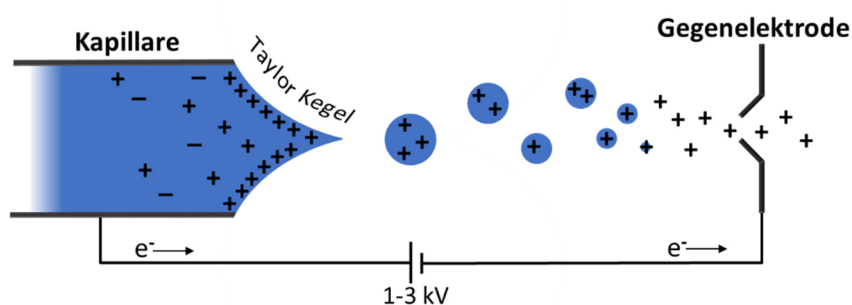
Die hohe Nachbeschleunigungsspannung hat allerdings zur Folge, dass das damit verbundene elektronische Rauschen reduziert werden muss. Dies erfolgt mittels eines  $\text{BaF}_2$  Szintillators, der bei 30 kV arbeitet. Zwischen MCP und Szintillator ist zudem eine Ring-Elektrode (20 kV) verbaut, um die Elektronen in Richtung des Szintillator-Kristalls zu fokussieren, der nach Kollision mit den Elektronen Photonen generiert. Diese Photonen werden wiederum erneut innerhalb eines Photomultipliers in Elektronen umgewandelt. Diese Elektronen werden letztlich von einer 8-Bit Digitalisierungs-/Zählkarte (Aquiris) erfasst und via LabView Software als Spektrum ausgegeben.<sup>5</sup>

### 3.4 ESI-MS

Bei der Elektrospray Ionisation (ESI) handelt es sich um eine der gängigsten kontinuierlichen Ionisationsquellen für Biomoleküle. Die Ionisation des Analyten kann, ähnlich der LILBID Ionisationsmethode, direkt aus einer wässrigen Pufferumgebung heraus erfolgen. ESI kann daher auch z.B. mit Flüssigchromatographiesystemen gekoppelt werden. Die Ionisation bei ESI erfolgt, im Gegensatz zu LILBID, bereits unter Atmosphärendruck. Die anschließende Überführung der Ionen ins Hochvakuum des Analysators erfolgt stufenweise.

#### 3.4.1 Ionisation & Modelle der Ionenüberführung in die Gasphase bei ESI

Die Ionisation erfolgt bei ESI in einer edelmetallbeschichteten Kapillare durch Anlegen einer Hochspannung von 1 bis 3 kV. Die Hochspannung führt durch elektrostatische Abstoßung zu einer konischen Deformation der Flüssigkeitsoberfläche am Kapillarende. Über diesen sogenannten Taylor Kegel verlässt der gelöste Analyt durch einen dünnen Flüssigkeitsfaden die Kapillare und zerfällt in unipolar geladene Tröpfchen. Diese werden vom *Sampling-Cone*, der Gegenelektrode, angezogen und es kommt hierbei zur Evaporation des Lösemittels (siehe dazu Abb.18).<sup>121</sup> Aus diesem Vorgang resultiert eine Verringerung der Tröpfchengröße, die wiederum eine Erhöhung der Ladungsdichte im Tropfen zur Folge hat. Die Erhöhung der Ladungsdichte im Tropfen erfolgt bis zu einer Grenze, bei der die Coulomb-Abstoßung der Ionen mit der Oberflächenspannung im Gleichgewicht steht, dem sogenannten Rayleigh-Limit. Erfolgt die Lösungsmittel- evaporation über diese Grenze hinaus, sorgt die Ladungsabstoßung zum Zerfall in kleinere ladungstragende Tröpfchen. Die Bildung eines feinen Ionensprays resultiert aus einer stetigen Wiederholung dieses Prozesses.<sup>96</sup>



**Abbildung 18: Schematische Darstellung des ESI Ionisationsprozesses.** Die Ionisation erfolgt bei ESI über eine edelmetallbeschichtete Glas-Kapillare durch Anlegen einer Hochspannung.<sup>121</sup>

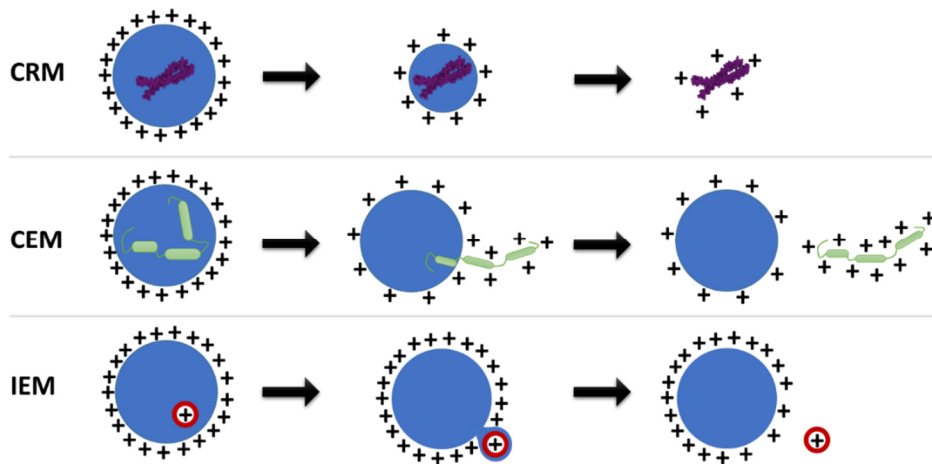
Es existieren drei gängige Modelle, wie genau die Überführung der Ionen in die Gasphase erfolgt (siehe dazu Abb. 19):<sup>121</sup>

Die Überführung großer, globulärer Ionen in die Gasphase erfolgt nach dem *Charge Residue Model* (CRM). Der Tröpfchenzerfall erfolgt hierbei so lange bis maximal ein Protein-Ion je Nanotröpfchen vorhanden ist. Die auf Grund der Lösemittelverdampfung einsetzende Verkleinerung des Tröpfchenradius bewegt sich hierbei nahe des Rayleigh-Limits. Überschüssige Ladung wird über kleine Molekülionen abgegeben und durch die vollständige Verdampfung des Lösemittels wird die verbliebene Ladung letztlich auf das Protein übertragen.<sup>121</sup>

Das *Chain Ejection Model* (CEM) wiederum bezieht sich auf ungefaltete Proteine. Diese verlassen das Tröpfchen vor dessen vollständiger Verdampfung. Proteine liegen in einer pH-neutralen, wässrigen Umgebung überwiegend in ihrer globulären, nativen Konformation vor. Für polare Lösemittel bilden sie hierbei unzugängliche hydrophobe Kernregionen. Bei entfaltenen Proteinen liegen diese hydrophoben Kernregionen indes frei. Auf Grund dessen befinden sich Proteine innerhalb des Tröpfchens in einer unvorteilhaften Umgebung, woraus resultiert, dass sich die Proteine bevorzugt am Tröpfchenrand aufhalten. Kommt es nun zu einer teilweisen Freisetzung des Proteins im Zuge des verdampfenden Tröpfchens, löst dies eine stufenweise Freisetzung des ganzen Proteins aus, bis dieses das Tröpfchen unter Aufnahme von Ladung vollständig verlässt.<sup>121</sup>

Das dritte Modell, das *Ion Evaporation Model* (IEM), bezieht sich wiederum auf Ionen mit niedrigem Molekulargewicht. Die Freisetzung von kleinen, solvatisierten Ionen erfolgt bei Überschreiten des Rayleigh-Limits und auf Grund zunehmender Coulomb-Abstoßung. Hierbei bildet sich eine Lösungsmittelbrücke aus, um den Abstand zur restlichen Ladung zu vergrößern. Da mit zunehmender Lösungsmittel-Verdampfung eine Zunahme der Coulomb-Abstoßung einhergeht, erfolgt früher oder später der Bruch dieser Lösungsmittelbrücke, was letztlich die Freisetzung des Ions zur Folge hat.<sup>121</sup>





**Abbildung 19: Modelle zur Erzeugung von Gasphasenionen.** Das CRM beschreibt den Gasphasenübergang von globulären Ionen durch Lösemittelverdunstung. CEM: Ungefaltete Proteine verlassen stufenweise immer kleiner werdende Tröpfchen. IEM: Ab einem gewissen Tröpfchenradius sind kleine Ionen in der Lage die Tröpfchen zu verlassen.<sup>121</sup>

Es sei angemerkt, dass anders als bei LILBID-MS, der ESI-Ionisationsprozess weitaus mehr mehrfach geladene Analyt-Ionen generiert, wodurch hochmassige Ionen in einen niedrigeren  $m/z$ -Bereich fallen.<sup>113</sup>

Eine bedeutsame Weiterentwicklung der ursprünglichen ESI-Ionisationsquelle stellt die sog. nano Elektrospray-Ionisation (nESI) dar. Verglichen mit regulären ESI kann diese Ionisationsquelle mit deutlich weniger Probenvolumen betrieben werden ( $\mu\text{L}$  statt  $\text{mL}$ ). Zudem sind die im Zuge des Ionisationsprozesses gebildeten Analyt-Tröpfchen um etwa 10 Größenordnungen kleiner als bei ESI. Auf Grund des geringeren Tröpfchen-Durchmessers und der damit einhergehenden Oberflächenspannung zerreißen die Tröpfchen im nESI-Prozess früher, wodurch beispielsweise unspezifische Protein-Wechselwirkungen reduziert werden. Verglichen mit herkömmlichen ESI-MS eignet sich nESI besser zur Analyse von Proteinkomplexen, da es gegenüber Salzen in Puffern toleranter ist<sup>122</sup>, keine organischen Lösemittel benötigt und qualitativ bessere Spektren liefern kann.<sup>123</sup>

Um zwischen unterschiedlichen Ladungszuständen von Proteinkomplexen unterscheiden zu können, ist es oftmals auch nötig Anhaftungen, wie z.B. Salz oder Detergens-Moleküle, vom zu untersuchenden Protein bewusst zu entfernen. Dies kann dadurch erreicht werden, dass man den Proteinkomplex über einen Spannungsgradienten mit einem sog. Kollisionsgas kollidieren lässt (CID, engl. *collision induced dissociation*). Aus diesem Grund besitzen moderne nESI-MS üblicherweise eine sog. Kollisionskammer (*collision cell*).

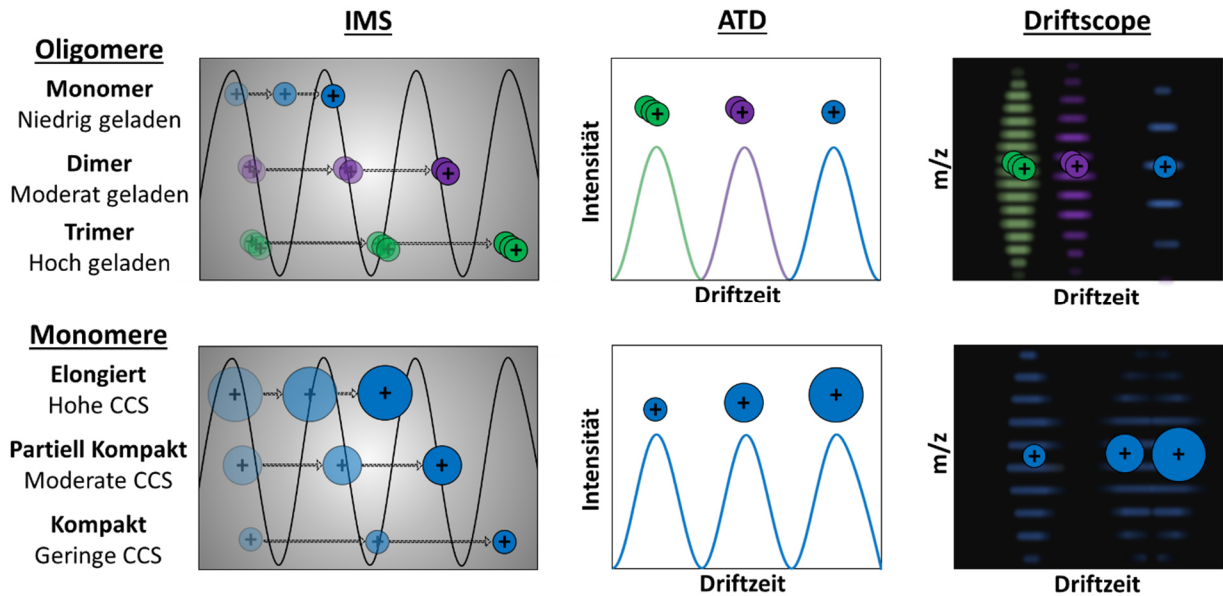
#### 3.4.2 Ionenmobilitätsspektrometrie

Moderne nESI-MS bieten die Möglichkeit Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) zu betreiben. Die Kombination aus IMS und MS ermöglicht eine detaillierte Analyse von komplexen Systemen, da zusätzlich zur Bestimmung der Ionenmasse auch eine Trennung nach deren jeweiligen Kollisionsquerschnitten (*collision cross-section*; CCS) erfolgen kann.<sup>3</sup>

Bei der IMS werden die Ionen in der Gasphase unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in einer mit Inertgas gefluteten Kammer nach deren Wanderungsgeschwindigkeit  $v_D$  aufgetrennt und letztlich deren sog. Driftzeiten (*drift time*;  $t_D$ ) erfasst. Die  $t_D$  beschreibt, wie viel Zeit die Ionen benötigen die Kollisionszelle zu durchlaufen.

Die Separation erfolgt über die Ladung und Geometrie der Ionen und der Anzahl an Stößen mit dem Inertgas. Betrachtet man Ionen gleichen  $m/z$ -Verhältnisses, so erfahren kleinere und kompaktere Ionen weniger Stöße in der Kollisionskammer als deren größere und elongiertere Pendanten. Folglich resultiert für größere Ionen, d.h. für Ionen mit größerer CCS, eine längere  $t_D$ , da diese auf Grund der höheren Stoßzahl mit dem Inertgas mehr Zeit benötigen die Zelle zu durchqueren.<sup>3</sup> Die Ladung der Ionen spielt für die Separation ebenfalls eine Rolle, da höher geladene Ionen im elektrischen Feld stärker beschleunigt werden als niedriger geladene Ionen mit identischem  $m/z$ -Verhältnis. Folglich weisen niedriger geladene Ionen eine höhere  $t_D$  auf als höher geladene Ionen.<sup>124</sup>

Über unterschiedliche Signale in der Ankunftszeitverteilung (*arrival time distribution*, ATD) können so Konformationsunterschiede der Ionen bei einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis aufgezeigt werden. Eine Auftragung der  $t_D$  gegen das  $m/z$ -Verhältnis liefert eine sog. Driftscope-Darstellung, worüber die aus der ATD resultierenden Signale ihrem jeweiligen Ladungszustand zugeordnet werden können (siehe dazu Abb. 20).



**Abbildung 20: Prinzip der Ionenmobilitätspektrometrie.** Es werden die Ladungs- und Größeneinflüsse der zu separierenden Ionen auf die ATD und auf das resultierende Driftscope Spektrum gezeigt. Kleine und kompakte Ionen erfahren weniger Stöße als große und elongierte Ionen gleichen  $m/z$ -Verhältnisses. Folglich resultiert für größere Ionen eine längere  $t_D$ . Die Ladung der Ionen spielt für die Separation ebenfalls eine Rolle. Höher geladene Ionen werden im elektrischen Feld stärker beschleunigt als niedriger geladene Ionen mit identischem  $m/z$ -Verhältnis. Folglich weisen niedriger geladene Ionen eine höhere  $t_D$  auf.<sup>124</sup>

Die Wanderungsgeschwindigkeit  $v_D$  der Ionen lässt sich in Abhängigkeit der elektrischen Feldstärke  $E$  wie folgt definieren:<sup>96</sup>

$$v_D = K \cdot E \quad (6)$$

$K$  bezeichnet die Mobilität eines Gasphasenions. Diese hängt wiederum sowohl vom jeweiligen Ion als auch vom genutzten Puffergas ab.  $K$  lässt sich über die Zeit  $t_D$ , die ein Ion benötigt eine Driftzelle der Länge  $L$  zu passieren, auch wie folgt ausdrücken:

$$K = \frac{v_D}{E} = \frac{L}{t_D \cdot E} \quad (7)$$

Auf Grund der Temperatur- und Druckabhängigkeit des Puffergases wird  $K$  über die reduzierte Ionenmobilitätskonstante  $K_0$  ausgedrückt. Aus Gründen vergleichbarer Ergebnisse erfolgt eine Normierung auf eine Standardtemperatur von 273,15 K und einen Standarddruck von 760 Torr:

$$K_0 = K \cdot \frac{273,15 \text{ K}}{T} \cdot \frac{P}{760 \text{ Torr}} \quad (8)$$

Mittels konventioneller IMS kann die Ionenmobilität  $K$  direkt aus der beobachteten Driftzeit und daraus die CCS ( $\Omega$ ) berechnet werden.<sup>125</sup>

Für  $K$  gilt wiederum folgender Zusammenhang in Abhängigkeit der Masse des Puffergases  $m_{Gas}$ , der Masse des Ions  $m_{Ion}$ , der Ladung des Ions  $z$ , der Elementarladung  $e$ , der Boltzmannkonstanten  $k_B$ , der Dichteanzahl der Puffergasatome  $N$ , der Driftzeit  $t_D$  und des Kollisionsquerschnitts  $\Omega$  des Ions:<sup>125</sup>

$$K = \frac{(18\pi)^{\frac{1}{2}}}{16} \cdot \frac{z \cdot e}{(k_B \cdot T)^{\frac{1}{2}}} \cdot \left[ \frac{1}{m_{Ion}} + \frac{1}{m_{Gas}} \right]^{\frac{1}{2}} \cdot \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\Omega} \quad (9)$$

Aus (7)(8)(9) ergibt sich so ein Ausdruck für  $\Omega$ , der die Proportionalität zur Driftzeit  $t_D$ , zur Ladung des Ions  $z$  und zu dessen Masse  $m$  zeigt:<sup>125</sup>

$$\Omega = \frac{(18\pi)^{\frac{1}{2}}}{16} \cdot \frac{z \cdot e}{(k_B \cdot T)^{\frac{1}{2}}} \cdot \left[ \frac{1}{m_{Ion}} + \frac{1}{m_{Gas}} \right]^{\frac{1}{2}} \cdot \frac{760 \text{ Torr}}{P} \cdot \frac{T}{273,15 \text{ K}} \cdot \frac{1}{N} \cdot \frac{t_D \cdot E}{L} \quad (10)$$

In Bezug auf die unter Kapitel 3.4.1 dargestellten Ionisationsmechanismen sollten nach dem CEM ionisierte Biomoleküle eine höhere CCS aufweisen, da diese auf Grund der hohen Ladung und der damit einhergehenden höheren Coulomb-Abstoßung elongiert und nicht mehr in einer nativen Konformation vorliegen. Die nach dem CRM ionisierten Biomoleküle sollten wiederum eine vergleichsweise geringe CCS aufweisen, da diese in der Regel eine kompaktere Konformation einnehmen.

### 3.5 Membranproteinanalyse mit nativer MS – LILBID vs. nESI

Wie bereits erläutert, stellen MPs sowohl aus präparativer als auch aus analytischer Sicht eine Herausforderung dar. Sowohl die Struktur als auch die Funktion eines MPs hängt stark von seiner Umgebung (wie z.B. Lipiden) ab. Mit ihren hydrophoben Regionen sind MPs zudem nicht wasserlöslich und es müssen weitere Maßnahmen ergriffen werden, um diese in Lösung zu halten. Aus diesem Grund wurden und werden MMs, wie z.B. Nanodiscs oder SMALPS, entwickelt und zur Analyse von MPs eingesetzt (siehe Kapitel 2.3).

Für die native MS von Proteinen eignen sich grundsätzlich die zwei zuvor ausführlich thematisierten, massenspektrometrischen Ionisationsmethoden nESI und LILBID. Beide Ionisationsmethoden haben allerdings ihre Vor- und Nachteile bei der Analyse von Proteinen, insbesondere bei der Analyse von MPs aus MMs.

Peetz & Hellwig *et al.*<sup>113</sup> zeigten beispielsweise in einem direkten Vergleich zwischen nESI und LILBID, dass sich LILBID deutlich toleranter gegenüber Salzen, Glycerin und nicht-flüchtigen Puffern, wie TRIS oder HEPES, verhält als nESI. Auch wurde gezeigt, dass beide Ionisationsmethoden bei der Analyse von MPs nicht immer die gleichen Ergebnisse hinsichtlich des nativen Oligomerzustands liefern. Während sich im Fall von wasserlöslichen Proteinen mit beiden Methoden derselbe dominante Oligomerzustand detektieren ließ, zeigte sich bei Untersuchungen von MPs, dass es zu deutlichen Abweichungen kommen kann. So wurden die nativen Zustände der Membranproteine EmrE (Dimer), DgkA (Trimer) und KcsA (Tetramer) als die dominante Spezies im LILBID-MS-Spektrum detektiert. Bei nESI hingegen konnten nur geringe Anteile der nativ vorliegenden Oligomerzustände detektiert werden. Die Hauptspezies dieser MPs stellte stets das jeweilige Monomer dar. Begründet wurde dies damit, dass sich die beiden Ionenquellen vor allem in den Prinzipien der Komplexdissoziation unterscheiden. Bei nESI erfolgt die Komplexdissoziation durch kontinuierliche Stöße mit einem inerten Kollisionsgas in einer Kollisionskammer (siehe auch Kapitel 3.4). In der Regel dissoziieren hierbei zunächst endständige oder außenliegende Untereinheiten des Proteinkomplexes. Hierbei wird auf diese Monomere ein verhältnismäßig großer Anteil an Ladung vom Komplex übertragen. In LILBID hingegen ist die eingestellte Laserleistung für den Grad der Komplexdissoziation entscheidend (siehe Kapitel 3.3). Im Gegensatz zu nESI werden die Untereinheiten mit den schwächsten nicht-kovalenten Wechselwirkungen zuerst abgestreift.<sup>5,113</sup>

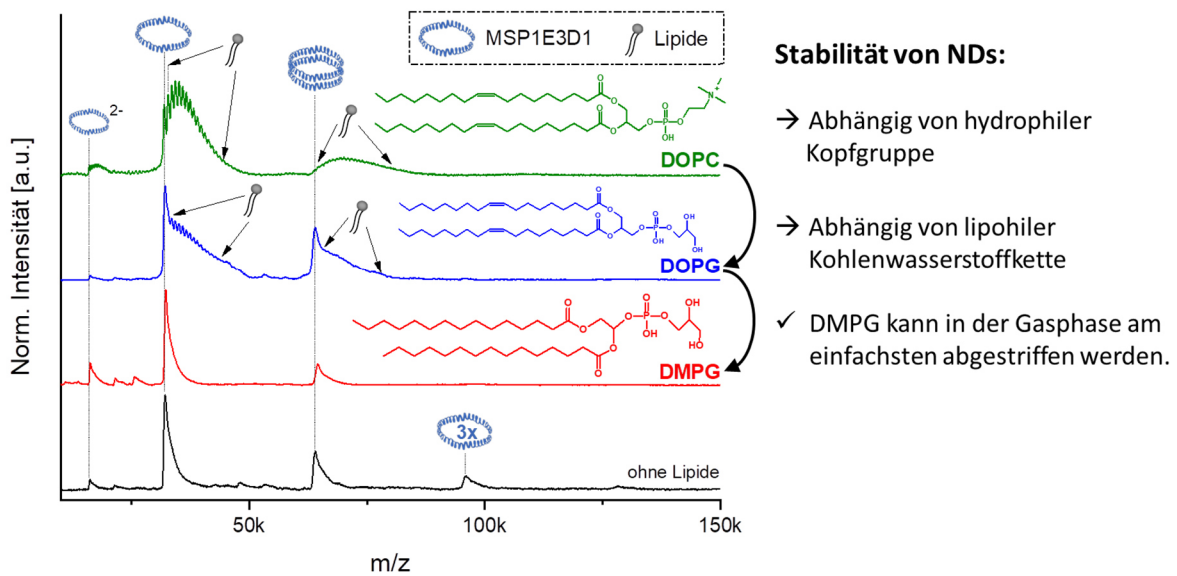
Wie bereits erläutert, erfolgt die Ionisation der Analyte bei LILBID-MS mit Hilfe eines IR-Lasers (siehe Kapitel 3.3). Da die Leistung des Lasers variiert werden kann, ist es möglich die nicht-kovalenten Bindungen, sei es zwischen Oligomeren, Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen, mehr oder weniger stark zu fragmentieren bzw. intakt zu halten.<sup>112</sup> Bei geringer Laserleistung ist es somit möglich Spektren zu erhalten, die intakte Komplexe zeigen, wie z.B. Komplexe bestehend aus NDs samt insertierten MPs. Eine hohe Laserleistung hingegen führt grundsätzlich zu einer stärkeren Fragmentierung bzw. zum „Brechen“ der nicht-kovalenten Bindungen, sodass auch einzelne Subkomplexe detektiert werden können.

In Bezug auf NDs ist es somit möglich, die membranaufspannenden MSPs und Lipide abzustreifen. Die Komplexe, von denen das MSP abgestreift werden, sind von besonderem Interesse, da diese Komplexe als stabil betrachtet werden können. Der größte detektierbare Proteinkomplex ohne MSP repräsentiert somit den größten sich ausgebildeten Komplex innerhalb einer ND oder zumindest den stabilsten Subkomplex, in dem ein MP vorliegt.<sup>126</sup>

Für nESI stellt die Analyse von MPs aus NDs allerdings eine Herausforderung dar. So können zwar grundsätzlich auch mit dieser Ionisationsmethode Proteine aus NDs untersucht werden, allerdings sind die vielen Lipide einer ND sowohl hinsichtlich der Qualität der Spektren als auch hinsichtlich der Auswertung ein Problem. In ersten MS Studien wurden etwa von Marty *et al.* „leere“, d.h. Protein-freie NDs charakterisiert. Bereits hierbei zeigte sich die Komplexität von nESI-ND-Spektren, sodass es nötig war Dekonvolutions-Allgorithmen zu entwickeln, um die komplexen Massenspektren mit überlappenden Ladungszuständen interpretieren zu können.<sup>127,128</sup>

LILBID-MS liefert, im Gegensatz dazu, bei ausreichend hoher Laserintensität deutlich einfacher auszuwertende Spektren, da hierbei die Lipide verhältnismäßig leichter im Zuge des Ionisierungsprozesses abgestreift werden können und folglich weniger bei der Auswertung der Spektren stören. Allerdings sei angemerkt, dass auch bei LILBID die Art der eingesetzten Lipide eine Rolle für die Spektrenqualität spielt und sich nicht alle Lipide gleichermaßen zur Darstellung von NDs eignen. So zeigten Studien von Henrich & Peetz *et al.*<sup>13</sup>, dass eine Korrelation zwischen der Beschaffenheit eines Lipids und der Fähigkeit dieses im Zuge der LILBID-Ionisation von den MSPs und MPs abstreifen zu können besteht. Je nach Schwanz- oder Kopfgruppe, bzw. je fluider ein Lipid (je mehr Doppelbindungen und je weniger Ladung es enthält), desto schlechter kann dieses auch bei hoher Laserleistung abgestreift werden (siehe Abb. 21).

Schlechter abzustreifende Lipide, wie beispielsweise DOPC und DOPG, verursachen auch bei hoher Laserleistung zum Teil massive Lipid-Cluster-Anhaftung am MSP-Signal, was zu Problemen bei der Analyse von Proteinen führen kann, die in jenen Massenbereich der Lipid-Cluster fallen.



**Abbildung 21: Stabilität von NDs.** Die Stabilität von NDs ist sowohl abhängig von der hydrophilen Lipid-Kopfgruppe als auch von der Beschaffenheit der lipophilen Kohlenwasserstoffkette. DOPC und DOPG können verhältnismäßig schlecht aus einer ND, bzw. vom MSP, im Zuge des LILBID-Ionierungsprozesses dissoziiert werden und führen zu signifikanten Lipid-Clustern in den Spektren. DMPG stellt das Lipid dar, welches am einfachsten in der Gasphase abgestreift werden kann. NDs mit diesem Lipid zeigen keine unerwünschten Lipid-Cluster-Anhaftungen am MSP.

Hellwig & Peetz *et al.*<sup>11</sup> zeigten ferner, dass LILBID-MS ebenfalls großes Potential besitzt, MPs direkt aus SMALPs heraus zu untersuchen. Der Einsatz von SMALPs ist, wie unter Kapitel 2.3.4 erwähnt, von besonderem Interesse hinsichtlich der Lipid-Analyse, da MPs samt ihrer natürlichen Lipid-Umgebung isoliert werden können. Es wurde gezeigt, dass in Abhängigkeit der genutzten Laser-Leistung zur Ionenfreisetzung sowohl intakte SMALP-Discs inklusive Protein als auch freie Proteine detektiert werden können. Auf Grund der Heterogenität der SMALP-Population zeigten die Signale des Massenspektrums eine starke Peakverbreiterung bei geringer Laserleistung. Bei höherer Laserleistung indes gelang es die SMA-Disc komplett zu fragmentieren und das Protein herauszulösen sowie scharfe Peaks zu detektieren. Auf Grund der hohen Laserleistung konnte im vorliegenden Fall allerdings der intakte Oligomerezustand nicht mehr erhalten bleiben und lediglich monomeres Protein detektiert werden.

Die erwähnte heterogene Polymer-Verteilung stellte für nESI ein bislang massives und unüberwindbares Problem dar. Erst kürzlich gelang es erstmals mittels ESI-MS Spektren von in SMALPs solubilisierten MPs aufzunehmen.<sup>129</sup>

### 3.6 Zeitaufgelöste Massenspektrometrie

Um biologische Prozesse zu verstehen, ist es nicht nur relevant die beteiligten Proteine an sich zu identifizieren und deren Interaktionen miteinander zu untersuchen. Auch die kinetischen Aspekte einer Reaktion sind von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden innerhalb der letzten Jahrzehnte zahlreiche Ansätze entwickelt mittels MS auch zeitliche Informationen von ablaufenden Reaktionen zu gewinnen und somit beide analytischen Aspekte zu vereinen.<sup>130,131</sup> Die Mehrheit der Publikationen zur zeitaufgelösten (TR; *time-resolved*) MS beschäftigt sich mit der Reaktionsanalyse von kleinen Molekülen und nur wenige haben die native Analyse von Proteinen im Fokus. Alle Ansätze zur nativen TR-MS-Analyse von Proteinen setzen hierbei auf ESI (oder nESI) als Ionenquelle.<sup>132</sup> Auf diese Weise gelang es z.B. mit einer minimalen Zeitauflösung von 10  $\mu$ s strukturelle Veränderungen des Cytochrom c zu untersuchen.<sup>133</sup>

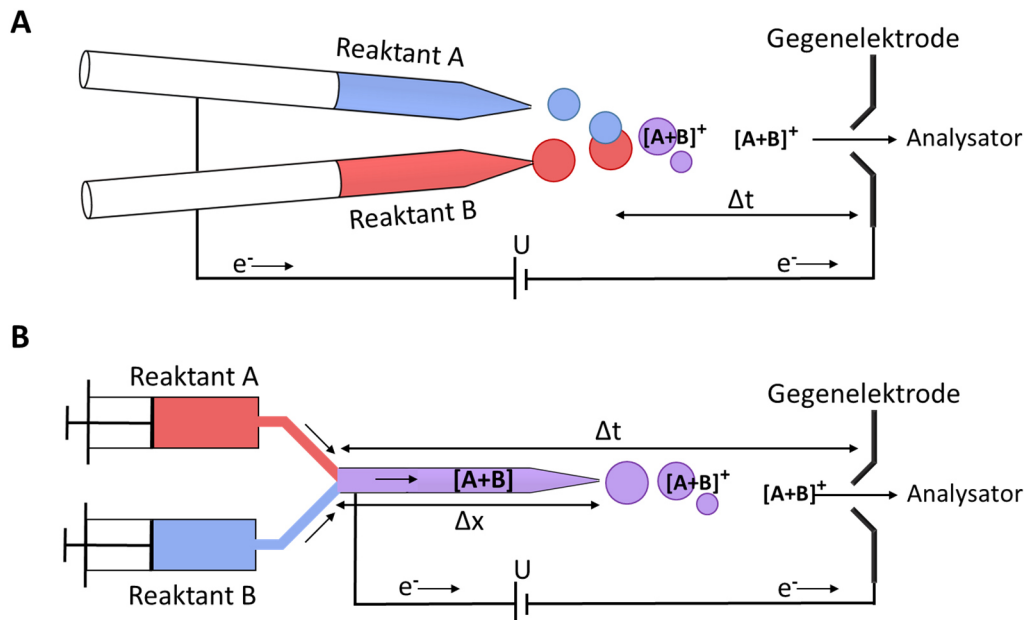
Eine Reaktion in Gang zu setzen kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Sie kann z.B. durch Mischen zweier Reaktionskomponenten gestartet werden. Bei Nutzung einer ESI-Ionenquelle kann der Mischungsvorgang beispielsweise dadurch erfolgen, dass sich die Elektrosprays zweier ESI-Quellen kreuzen und sich so Tropfen mit Reaktionskomponenten vereinen oder man kann Reaktionskomponenten direkt vor dem Spray-Vorgang durch separaten Zulauf in der Kapillare mischen. Beide dieser Möglichkeiten eine Reaktion zu starten haben allerdings ihre Nachteile.<sup>134,131</sup>

Der Ansatz eine Reaktion durch kreuzen zweier Elektrosprays mit je einer Reaktionskomponente zu induzieren erlaubt es grundsätzlich Reaktionen zu erfassen, die im Bruchteil einer Sekunde, d.h. auf einer ms-Zeitskala, ablaufen. Im Zuge der Elektrosprayionisation entstehen allerdings Tropfen, die hinsichtlich ihrer Größe variieren. Eine stöchiometrische Kontrolle der Reaktionskomponenten ist somit nicht möglich.<sup>132</sup>

Das Mischen in der Kapillare erlaubt zwar wiederum eine gute Kontrolle hinsichtlich der Stöchiometrie der eingesetzten Reaktionspartner<sup>132</sup>, ist allerdings im Bereich der Zeitauflösung meist auf Millisekunden bis Sekunden limitiert.<sup>135</sup> Für die zu erreichende Zeitauflösung spielt die Länge der Kapillare, mit der letztlich die Ionisation der gemischten Reaktanten durchgeführt wird, eine entscheidende Rolle (siehe Abb. 22). Um diese „Totzeit“ für die Analyse zu minimieren, wurden z.B. Systeme entwickelt, bei denen zwei Kapillare mit unterschiedlichem Durchmesser leicht versetzt ineinander geführt sind. Über die innere Kapillare kann Reaktant A dem Reaktanten B, der über die äußere Kapillare eingebracht wird,



zugeführt werden. Die Mischung erfolgt nur an der Spitze der Kapillare, wodurch die Weglänge, die die gemischten Reaktanten bis zur Ionisation zurücklegen müssen, deutlich verkürzt ist. Folglich kann eine bessere Zeitauflösung erreicht werden.<sup>131</sup>



**Abbildung 22: Beispiele für ESI-Setups zur zeitaufgelösten Massenspektrometrie. (A)** Schematische Darstellung der Mischung von Reaktionspartnern über zwei ESI-Kapillaren. Auf Grund der kurzen Weglänge, die die gemischten Reaktanten zurücklegen müssen, können Reaktionen im ms-Bereich untersucht werden. Da die im Zuge der Ionisation entstehenden Tropfen hinsichtlich ihrer Größe variieren, ist eine stöchiometrische Kontrolle der Reaktionskomponenten allerdings nicht möglich. **(B)** Schematische Darstellung eines sog. *continuous flow* Setups, in dem die Reaktanten direkt vor der Ionisation gemischt werden. Die Reaktionszeit  $\Delta t$  ist abhängig davon, wie lange das Reaktionsgemisch bis zur Ionisation in der Kapillare verweilt.  $\Delta t$  korreliert folglich mit der Kapillarlänge  $\Delta x$ .<sup>nach 131</sup>

Wie unter Kapitel 3.2 und 3.5 beschrieben, stellt ESI zwar eine gute Ionenquelle dar, um lösliche Proteine zu untersuchen, gerät jedoch bei der Analyse von hochmassigen und nicht-kovalenten Proteinkomplexen sowie hydrophoben Membranproteinen an seine Grenzen. LILBID-MS hingegen ermöglicht es auch hochmassige und nicht-kovalent gebundene Proteinkomplexe sowie MPs zu untersuchen.

Dass sich LILBID-MS grundsätzlich auch eignet, kinetische bzw. zeitliche Informationen bzgl. des Ablaufs von biologischen Prozessen zu gewinnen, konnte am Beispiel von zeitaufgelösten Aggregations- und Inhibierungsstudien zum Protein Amyloid-beta<sub>(1-42)</sub> (kurz A $\beta$ <sub>42</sub>) gezeigt werden, welches bei der Alzheimer-Erkrankung involviert ist. Im Rahmen dieser Studien ließ man A $\beta$ <sub>42</sub> in Eppendorf-Tubes bei Raumtemperatur über mehrere Stunden aggregieren und

entnahm nach diversen Zeitpunkten Proben und untersuchte diese bezüglich des Oligomerisierungsgrades. Mit fortschreitender Aggregationsdauer zeigte sich eine Zunahme der Oligomerisierung, wodurch der Verlauf der Aggregation kinetisch bzw. zeitaufgelöst erfasst werden konnte. Bei diesen Studien bewegte man sich allerdings auf sehr langsamen Zeitskalen im Bereich von Minuten bis Stunden.<sup>136,137</sup>

Ein anderer Ansatz eine Reaktion zu induzieren besteht darin, eine Reaktionskomponente zunächst chemisch mit Hilfe eines sog. *Cages*, wie etwa einer PLS, zu inhibieren. Dies erlaubt es, beide Reaktionskomponenten gleichzeitig und stöchiometrisch in Lösung vorzulegen. Die Reaktion selbst wird dadurch in Gang gesetzt, dass die Schutzgruppe durch Bestrahlung mit Licht abgespalten wird. Die PLS tragen einen Chromophor, der bei einer spezifischen Wellenlänge absorbiert und es so ermöglicht, örtlich und zeitlich sehr präzise die PLS abzuspalten und so eine Reaktion in Gang zu setzen.<sup>26,132</sup>

Die PLS sind bzw. werden so konzipiert, dass sie meist ins Rötliche verschobene Absorptionsmaxima besitzen, um möglichst wenig Schaden an biologischen Systemen zu verursachen. Auch die Löslichkeit und eine mögliche Toxizität der PLS muss hinsichtlich ihres Designs und deren Anwendung bedacht werden.<sup>138,139</sup>

Dieser Ansatz könnte eine Möglichkeit sein, LILBID-MS auch für TR-Analysen schnellerer, biologischer Reaktionen zugänglich zu machen. So bietet die Art der Probenapplikation bei der LILBID-MS grundsätzlich die Möglichkeit, den Analyten auf zwei Wegen direkt vor der Ionenfreisetzung zusätzlich zu bestrahlen. Diesbezüglich sei auf Kapitel 5.4.2 verwiesen.

## 4. Untersuchte Proteine

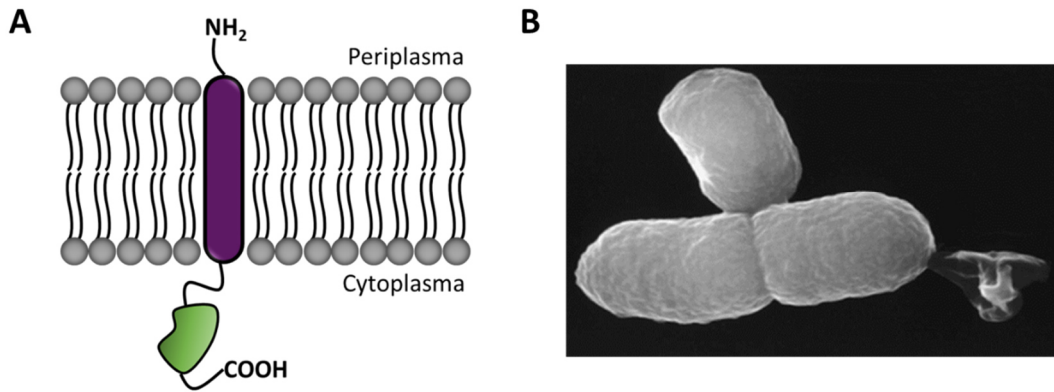
### 4.1 Das Bakteriophage Lyse-Protein $\Phi$ X174-E

Bakteriophagen, also Viren die Bakterien infizieren, spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulierung von Bakterienpopulationen. Auch Medizin und Biologie haben die Bedeutung und das Potential der Phagen für sich erkannt. So wird derzeit auf Grund der immer öfter auftretenden Antibiotikaresistenz intensiv daran geforscht, Bakteriophagen als Antibiotika-Alternative einzusetzen.<sup>17</sup>

Mangels eines eigenen Stoffwechsels benötigen Viren einen Wirt zur Reproduktion, im Falle der Bakteriophagen eine Bakterienzelle. Die Reproduktion bzw. der bakteriophage Lebenszyklus lässt sich in folgende Stufen einteilen: Die Adsorption an die Oberfläche der Wirtszelle, die Injektion der Phagen-Nukleinsäure, die Herstellung der Virionen und die Freisetzung der neuen Viruspartikel. Letzteres erfolgt oftmals unter Lyse der Zellwand.<sup>140</sup>

Wie genau die Zellwand-Lyse erfolgt ist unterschiedlich. Kleine Phagen beispielsweise kodieren ein einzelnes Protein, welches die Lyse auslöst. Das Protein E der einzelsträngigen DNA Bakteriophage  $\Phi$ X174 ( $\Phi$ X174-E) und Protein L der einzelsträngigen RNA Phage MS2 (MS2-L) gehören beispielsweise zu dieser Klasse der Lyse-Proteine.<sup>141</sup>

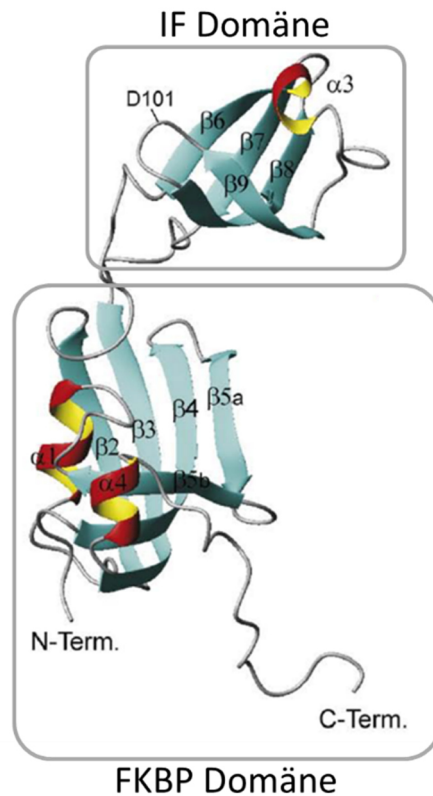
$\Phi$ X174-E kodiert ein 91 Aminosäuren umfassendes Protein, das aus vier Domänen besteht.<sup>142</sup> Die ersten drei Domänen haben einen hydrophoben Charakter und werden vereinfacht als N-terminale hydrophobe Domäne zusammengefasst. Der vierten Domäne wird ein hydrophiler Charakter zugesprochen. Sie wird daher auch als C-terminale lösliche Domäne bezeichnet.<sup>143</sup> Mittels Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass die N-terminale Domäne in der Membran eingebettet ist und die lösliche Domäne in Richtung des Cytoplasmas zeigt (siehe Abb. 23, A).<sup>144</sup>



**Abbildung 23: Topologie des  $\Phi$ X174-E innerhalb der Membran und seine toxische Wirkung auf Zellen. (A)** Der N-Terminus des  $\Phi$ X174-E zeigt in Richtung des Periplasmas, die C-terminale lösliche Domäne ist auf der cytoplasmatischen Seite der inneren Membran lokalisiert. **(B)** Hochaufgelöste Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der  $\Phi$ X174-E induzierten Zell-Lyse.<sup>entnommen aus 145</sup> Während die zelluläre Morphologie beibehalten bleibt, strömt der Inhalt des Cytoplasmas nach außen und lässt leere Zellhüllen (auch *bacterial ghosts* genannt) zurück.

$\Phi$ X174-E wirkt extrem lytisch auf Bakterien. Eine rekombinante Expression von  $\Phi$ X174-E führt zu einer schnellen Lyse von *E. coli* und ist gekennzeichnet durch Ausbildung von 50 – 200 nm großen Poren und einer damit einhergehenden Freisetzung des cytoplasmatischen Inhalts (siehe Abb. 23, B). Die Poren wurden überwiegend an Stellen mit Zellwachstum lokalisiert, was zur Hypothese einer aktiven Porenbildung durch Oligomerisierung von  $\Phi$ X174-E führte.<sup>143,146</sup> Sowohl die Präsenz der N-, als auch die der C-terminalen Domäne sind essentiell für die lytische Funktion des  $\Phi$ X174-E. Durch Verkürzungen am N-Terminus konnte jedoch gezeigt werden, dass die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren für die Lyse keine Rolle spielen.<sup>147</sup> Mutationsanalysen zeigten ferner, dass die Aminosäure Pro21 in der Transmembrandomäne essentiell für die lytische Funktion ist.<sup>147,148</sup> Witte *et al.*<sup>148</sup> gehen davon aus, dass das Prolin entscheidend für eine konformationelle Umlagerung der löslichen Domäne und einer damit einhergehenden lytischen Aktivität ist.

Als molekulare Targets des  $\Phi$ X174-E wurden inzwischen zwei Proteine erfolgreich identifiziert: Die Translokase MraY und das Chaperon SlyD.<sup>149–151</sup> Bei SlyD handelt es sich um ein bifunktionales Protein aus dem Cytosol von prokariotischen Organismen. Neben seiner Aktivität als Chaperon spielt es auch bei der Prolin Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung eine Rolle. SlyD besteht aus zwei Domänen, der FK506 *binding protein*- (FKBP-) Domäne (im Folgenden auch P-Domäne genannt) und einer sogenannten „*insert-in-flap*“ (IF) Domäne (siehe Abb. 24).



**Abbildung 24: Struktur der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase SlyD.** Die Aminosäuren 1-63 und 128-151 bilden die FKBP-Domäne aus. Diese ist für die Isomerase-Aktivität ausschlaggebend. Die IF-Domäne trägt die Polypeptid-Bindestelle und ist für die Chaperon-Aktivität des SlyD von Bedeutung.<sup>entnommen aus 152</sup>

Es wird angenommen, dass die FKBP-Domäne für die Isomerase-Aktivität ausschlaggebend ist, während die IF-Domäne die Polypeptid-Bindestelle trägt und für die Chaperon-Aktivität verantwortlich ist.<sup>151,152</sup> Eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen SlyD und  $\Phi$ X174-E konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden.<sup>153</sup> Man nimmt an, dass SlyD als ein initiales Erkennungs- und Clustering-Ziel für  $\Phi$ X174-E dient, bevor es in die Zellwand inseriert wird und sein eigentliches Target findet.<sup>150</sup> Bernhardt *et al.*<sup>149</sup> wiederum zeigten, dass es sich bei dem eigentlichen Target um MraY handelt, welches eine wichtige Rolle bei der Synthese der inneren Zellwand von Bakterien spielt.

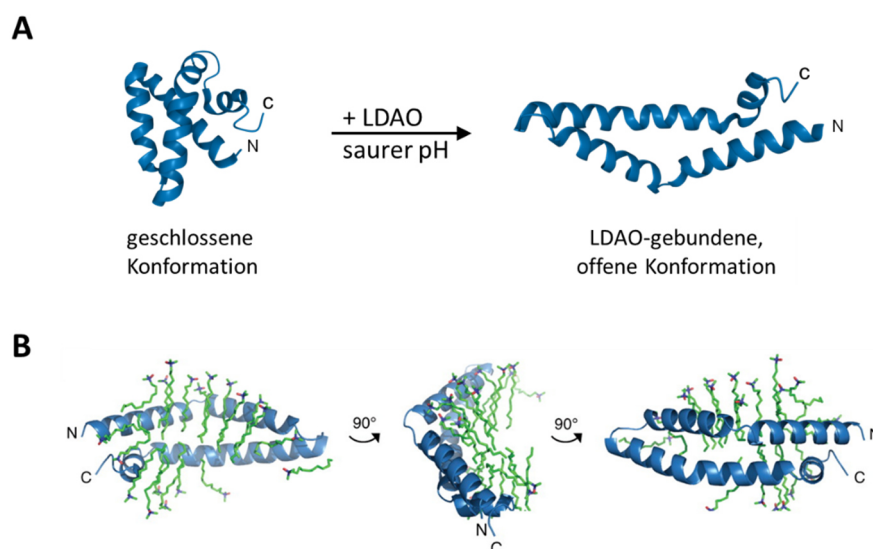
## 4.2 Saposine, Proteorhodopsin & EmrE

### 4.2.1 Saposine

Als Saposine bezeichnet man eine Gruppe von kleinen, hitzestabilen Glykoproteinen, die bei der lysosomalen Hydrolyse von diversen Sphingolipiden als Aktivatorproteine benötigt werden.<sup>154</sup> Bekannt sind bisher die vier Saposine A, B, C, und D. Alle vier Saposine sind Cysteinreiche alpha-helikale Proteine, die aus dem gemeinsamen Vorläufer, dem Präcursorprotein Prosaposin, entstehen.

Frauenfeld *et al.*<sup>23</sup> entdeckten, dass SapA in Anwesenheit von Lipiden Nanopartikel ausbildet, die genutzt werden können, um MPs zu solubilisieren. Flayhan *et al.*<sup>85</sup> wiederum zeigten, dass alle vier Saposine NPs ausbilden können, die jeweiligen Saposine allerdings unterschiedliche Lipid-Spezifitäten bzgl. der SapNP-Bildung besitzen. Das SapA, welches die Hydrolyse des Galactosylceramid durch die beta-galactosylceramidase aktiviert, um Ceramid und Galactose zu produzieren, stellte sich hierbei als das am wenigsten Lipid-spezifische Saposin heraus.

Untersuchungen von Popovic *et al.*<sup>155</sup> zeigten, dass SapA in Anwesenheit des Detergens LDAO aus einer geschlossenen, kompakten Konformation in eine offene Konformation übergeht, wodurch eine konkave hydrophobe Innenseite freigelegt wird, an deren Oberfläche sich die Detergens-Moleküle anlagern. Zwei V-förmige Proteinketten stehen sich gegenüber und formen einen Ring um eine kleine Detergens-Doppelschicht (siehe Abb. 25).

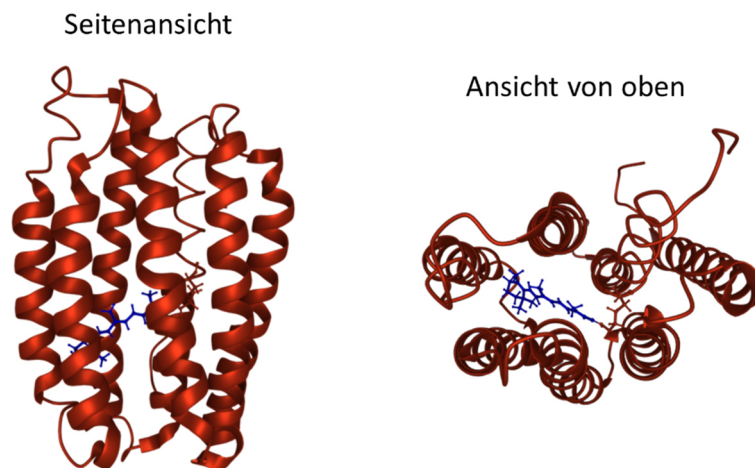


**Abbildung 25: Struktur und Konformation des SapA in Ab- und Anwesenheit von LDAO. (A)** SapA liegt gelöst in einer geschlossenen Konformation vor und geht in Anwesenheit von LDAO in eine offene Konformation über. **(B)** Offene Konformation des SapA in Anwesenheit von LDAO aus unterschiedlichen Blickwinkeln. Entlang der konkaven hydrophoben Innenseite lagert sich das LDAO an.<sup>nach 155</sup>

#### 4.2.2 Proteorhodopsin & EmrE

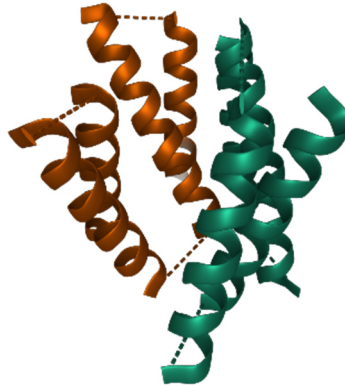
Als Modellprotein bei den Analysen zur Ausbildung von SapA-NPs diente das Proteorhodopsin (PR). Die gewonnenen Erkenntnisse bzgl. der SapA-NP Bildung sollten weiterhin auf EmrE angewandt werden. Daher sei an dieser Stelle ebenfalls auf diese Proteine kurz eingegangen.

Bei PR handelt es sich um einen Vertreter aus der Familie der Retinalproteine, welches lichtgetrieben Protonen über eine Membran pumpen kann. Retinal-bindende Proteine, wie das PR, spielen eine wichtige Rolle als Photorezeptoren in Zellen. Sie können in Prokaryonten, Archaeen oder auch in den Sehzentren höherer Organismen (wie dem Menschen) vorkommen. Allen Retinalproteinen ist eine alpha-helikale Struktur mit sieben Transmembranhelices gemein. Der Chromophor Retinal wird bei PR über eine Schiffsbasis an Lys-231 in einer zentralen Bindetasche im Zentrum des Helix-Bündels gebunden (siehe Abb. 26). Abhängig vom Chromophor und dessen Absorptionsmaximum unterscheidet man zwischen rot, blau und grün absorbierendem PR.<sup>156</sup> Untersuchungen mittels AFM zeigten, dass PR in seiner natürlichen Umgebung bevorzugt zu Pentameren oder Hexameren assembliert.<sup>157</sup>



**Abbildung 26: Struktur und Aufbau des PR.** Bei PR handelt es sich um ein Retinalprotein, dem eine alpha-helikale Struktur mit sieben Transmembranhelices zugrunde liegt. Der Chromophor Retinal (blau) wird über eine Schiffsbasis an Lys-231 in einer zentralen Bindetasche im Zentrum des Helix-Bündels gebunden. [PDB: 2L6X]

EmrE wiederum ist ein dimerer *multi-drug* Transporter aus *E. coli* von hohem medizinischen Interesse. Es ist ein in die innere Membran fest eingebautes MP bestehend aus vier Transmembranhelices und verantwortlich für die Resistenz des Organismus gegenüber vielen toxischen lipophilen Kationen, wie quartäre Ammoniumverbindungen. Getrieben durch einen Protonengradienten transportiert es die lipophilen Kationen vom Cytoplasma ins Periplasma.<sup>158-160</sup>



**Abbildung 27: Struktur des EmrE.** Bei EmrE handelt es sich um einen homodimeren *multi-drug* Transporter. [PDB: 2I68]



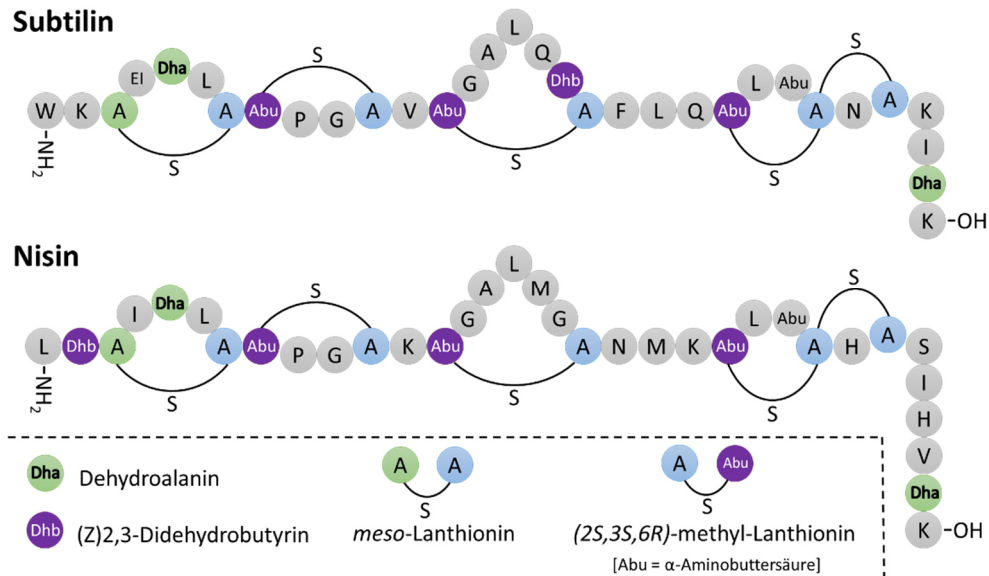
### 4.3 Die Histidinkinasen SpaK, NisK & ihre Lantibiotika

Nahezu alle Bakterien produzieren Bacteriocine. Hierbei handelt es sich um toxische Peptide, die das Wachstum artgleicher oder nahe verwandter Bakterien-Stämme hemmen (bakteriostatische Wirkung) oder diese abtöten (bakteriozide Wirkung). Bacteriocine besitzen einen antibiotischen Charakter mit engem Wirtsspektrum. Auf Grund der immer mehr zunehmenden Problematik der Antibiotika-Resistenz werden sie daher, wie auch die Bakteriophagen (siehe Kapitel 4.1), ebenfalls als Antibiotika-Alternativen erforscht.<sup>18</sup>

So unterschiedlich die je nach Bakterium produzierten Bacteriocine sind, so unterschiedlich ist auch deren Wirkungsweise. Sie können die Peptidoglycan-Synthese inhibieren, für membrane Porenbildung verantwortlich sein oder die DNA-Polymerase hemmen.<sup>161,19</sup> Auf diese Weise dienen sie letztlich der Wachstumshemmung artgleicher oder naher verwandter Bakterienarten und spielen so eine Rolle in der Verteidigung ökologischer Nischen gegen verwandte Bakterienstämme.

Bacteriocine werden basierend auf ihren vorhandenen oder nicht vorhandenen post-translationalen Modifikationen in zwei Klassen unterteilt. Klasse I Bacteriocine weisen eine lineare Struktur auf und unterlaufen nach der Translation eine weitere Modifikation. Sie werden daher auch als ribosomal synthetisierte, post-translational modifizierte Peptide (RiPPs) bezeichnet. Klasse II repräsentiert die weitestgehend unmodifizierten globulären Bacteriocine.<sup>18</sup>

Eine prominente Untergruppe der Klasse I Bacteriocine stellen Lantibiotika dar. Lantibiotika sind Peptid-Antibiotika aus Gram-positiven Bakterien, wie z.B. *Lactococcus lactis* oder *Bacillus subtilis*. Sie zeichnen sich durch die Anwesenheit nichtproteinogener Aminosäuren, wie (2S,6R)-*meso*-Lanthionin und (2S,3S,6R)-3-Methylanthionin sowie Dehydroalanin (Dha) und (Z)-2,3-Didehydrobutyrin (Dhb), aus. Zu den bekanntesten Vertretern von Lantibiotika zählen beispielsweise das Subtilin aus *Bacillus subtilis* und das Nisin aus *Lactococcus lactis* (siehe Abb. 28).<sup>162,19</sup>



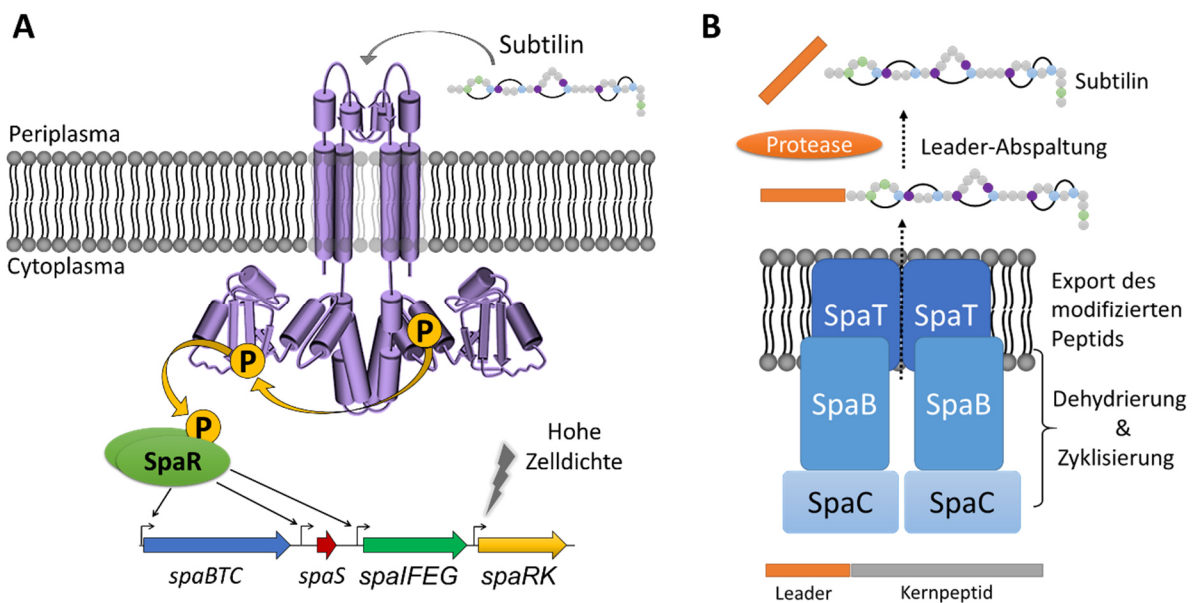
**Abbildung 28: Primärstruktur der Klasse I Lantibiotika Subtilin und Nisin inkl. deren charakteristischen post-translationalen Modifikationen.** Die Klasse I Lantibiotika Subtilin und Nisin zeichnen sich durch eine lineare Struktur aus. Subtilin triggert die Aktivierung der Histidinkinase SpaK aus *Bacillus subtilis*, Nisin die Lantibiotika-vermittelte Autoinduktion der Histidinkinase NisK aus *Lactococcus lactis*.<sup>19,163</sup>

Die Gene zur Lantibiotika-Biosynthese sind generell innerhalb eines Genclusters zusammengefasst und werden allgemein mit *lan* abgekürzt. Das Strukturgen des jeweiligen Lantibiotikums wird mit *lanA* bezeichnet. Die Modifizierungen bzw. Ringstrukturen der Lantibiotika werden von einem multimeren Enzymkomplex, unter anderem bestehend aus einer Dehydratase, allgemein LanB genannt, und einer Zyklase (LanC) eingeführt. LanT, welches für einen Transporter codiert, exportiert das Lantibiotikum in den extrazellulären Raum (siehe Abb. 29, B).

Zwei-Komponenten-Systeme sind ein wichtiger Teil von Signaltransduktionskaskaden und stellen das häufigste Mittel wie Bakterien Umwelteinflüsse erkennen und darauf reagieren dar. Die Lantibiotika-Biosynthese des Subtilin in *B. subtilis* oder des Nisin in *L. lactis* erfolgt mittels eines solchen Zwei-Komponenten-Systems bestehend aus einer allgemeinhin als LanK bezeichneten, meist membrandurchspannenden Histidinkinase sowie einem entsprechenden Response-Regulator LanR. Die meisten Lantibiotika agieren als Autoinduktoren und aktivieren ihre eigene Biosynthese, so auch im Fall des Subtilins und Nisins.

Die Aktivierung der Histidinkinase, wie auch im Fall der Lantibiotikavermittelten Autoinduktion, erfolgt in Abhängigkeit der Zelldichte (auch als *quorum sensing* bezeichnet). Eine hohe Zelldichte löst die vermehrte Expression des LanRK in den Bakterien aus.<sup>164</sup>

Die Histidinkinase wird nach Bindung von extrazellulärem Lantibiotikum autophosphoryliert. Die Phosphoryl-Gruppe wird anschließend von LanK auf den Response-Regulator LanR übertragen. LanR bindet wiederum an die *spa*-Boxen innerhalb der Promotoren von *lanBTC*, *lanS* und *lanFEG* und induziert deren Expression (siehe Abb. 29, A). Auf diese Weise wird so lange das Lantibiotikum produziert, bis eine Sättigung einsetzt.<sup>164</sup>



**Abbildung 29: Schema der Lantibiotika-vermittelten Autoinduktion und Lantibiotika-Biosynthese am Beispiel des SpaRK. (A)** Bei einer hohen Zelldichte wird die Expression des Zwei-Komponenten-Systems SpaRK induziert. Die Histidinkinase SpaK wird durch die Sensierung von extrazellulärem Subtilin autophosphoryliert und die Phosphoryl-Gruppe wird von SpaK auf den Response-Regulator SpaR übertragen. Dieser bindet wiederum an die *spa*-Boxen innerhalb der Promotoren von *spaBTC*, *spaS* und *spaIFEG* und induziert deren Expression. **(B)** Das Lantibiotikum Subtilin wird ribosomal synthetisiert und setzt sich aus einem Leader- und einem unmodifizierten Kern-Peptid zusammen. Es folgt eine post-translationalen Modifizierungen durch einen multimeren Enzymkomplex, bestehend aus einer Dehydratase (SpaB) und einer Zyklase (SpaC). Über einen Transporter (SpaT) wird das Lantibiotikum in den extrazellulären Raum transportiert. Die Leader-Sequenz dient den Modifikationsenzymen zur Erkennung und wird im Periplasma durch eine Protease wieder abgespalten.<sup>nach 164,22</sup>

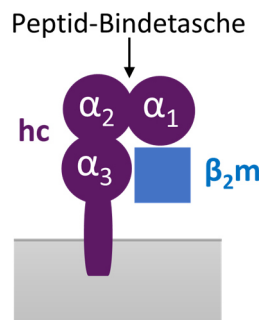
Um sich vor dem eigens produzierten Lantibiotikum zu schützen, besitzen Bakterien ein Immunitätssystem. Dieses besteht je nach Organismus aus einem spezifischen ABC-Transporter (LanFEG), der auch mit einem spezifischen membranassoziierten Immunitätsprotein LanI kombiniert sein kann.<sup>165,166</sup>

Es ist bekannt, dass jede der beiden Komponenten in der Lage ist an sich Schutz zu gewährleisten, eine volle Immunität allerdings nur erreicht wird, wenn beide Systeme exprimiert werden. Ob es sich hierbei um einen additiven oder einen kooperativen Mechanismus handelt, ist nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert.<sup>165,167,168</sup> Für die beiden ABC-Transporter NisFEG und SpaFEG konnte gezeigt werden, dass die vermittelte Immunität auf dem Transport der Lantibiotika-Moleküle in den extrazellulären Raum beruht.<sup>168</sup> Der genaue Wirkmechanismus der Lipoproteine NisI und SpaI ist jedoch noch nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass SpaI spezifisch Immunität gegen Subtilin vermittelt, es aber zu keinerlei Kreuzimmunität mit dem strukturell ähnlichen Nisin kommt.<sup>169</sup> Hacker *et al.*<sup>170</sup> konnten mittels NMR zeigen, dass Nisin an die C-terminale Domäne von NisI bindet. Vergleichbare Interaktionsnachweise von Subtilin mit SpaI konnten bislang nicht erbracht werden.<sup>169</sup> Crosslinking-Experimente legten aber nahe, dass es auch hier eine direkte Interaktion zwischen dem Lipoprotein und dem Lantibiotikum geben könnte.<sup>171,172</sup>

#### 4.4 Der MHC-I *peptide-loading-complex*

Beim Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*; MHC) handelt es sich um eine Gruppe von Genen bei Wirbeltieren, die für Proteine codieren, welche für die Funktion des Immunsystems von zentraler Bedeutung sind. Zu den codierten Proteinen zählt etwa der als MHC-Klasse-I (kurz MHC-I) bezeichnete Proteinkomplex, der sich auf nahezu allen Zellen des Organismus befindet und der zur Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen dient.<sup>173</sup>

Der MHC-I Proteinkomplex besteht aus einer größeren Untereinheit, die an der Zellmembran verankert ist und als *heavy chain* (hc) bezeichnet wird, sowie aus einer kleineren löslichen Untereinheit, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ). Im MHC-I-Komplex lassen sich wiederum vier Domänen unterscheiden (siehe Abb. 30). Die hc-Untereinheit umfasst drei Domänen, die als  $\alpha_1 - \alpha_3$  bezeichnet werden. Das  $\beta_2m$  stellt die vierte Domäne dar. Die Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden eine peptidbindende Grube aus. In diese Bindetasche können (fremdartige) Peptide aus intrazellulärem Proteinabbau durch Proteasome angelagert werden.<sup>173,174</sup>



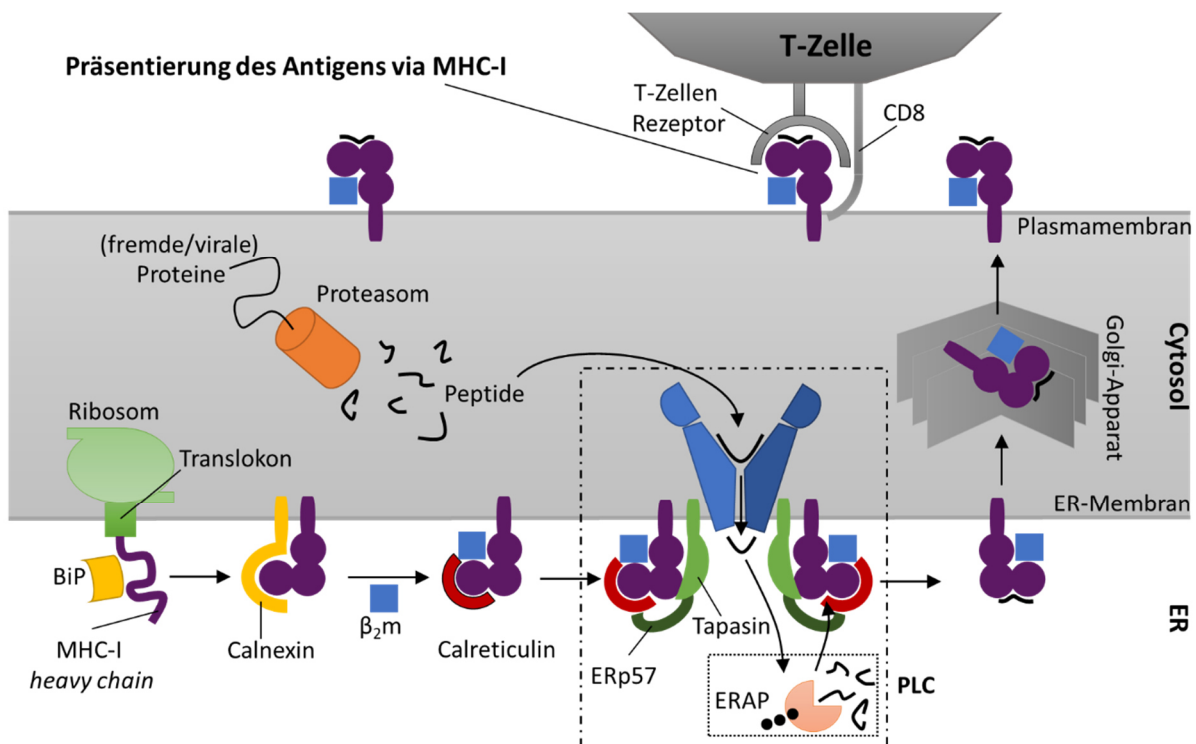
**Abbildung 30: Schematische Darstellung des MHC-I Proteinkomplexes.** Der MHC-I-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, der *heavy chain* (hc; lila) und der  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) Untereinheit (blau). Die hc-Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden eine Peptid-Bindestelle aus.<sup>175</sup>

Um eine Immunantwort zu induzieren ist es nötig, dass infizierte oder bösartige Zellen identifiziert werden. Die Antigen-Information wird, wie einleitend erwähnt, durch einen MHC-Peptid-Komplex an der Zelloberfläche „präsentiert“. Fremdartige Proteine werden durch das Proteasom im Cytosol abgebaut und durch den heterodimeren Antigenpeptid-Transporter TAP (*Transporter associated with antigen processing*) zunächst ins Endoplasmatischen Retikulum (ER) überführt. Die antigenen Peptide bzw. Peptidfragmente werden im ER durch ERAP weiter zu 8-10 Aminosäuren umfassenden Peptiden geschnitten und anschließend auf

MHC-I Moleküle geladen. Die heterodimeren MHC-I Komplexe werden vorab gebildet und stabilisiert (siehe Abb. 31).<sup>174</sup>

Der „Beladungsprozess“ wird wiederum von einer Reihe von verschiedenen Proteinen bewerkstelligt, die zu einem makromolekularen Komplex assembliert sind und als *peptide loading complex* (PLC) bezeichnet werden. Der PLC umfasst neben dem MHC-I und TAP, die Chaperone Calreticulin und Tapasin sowie das Protein ERp57.<sup>174,176</sup>

Neu synthetisierte hc-Untereinheiten des MHC-I binden zunächst an das Chaperon Calnexin, welches diese Untereinheit in einem partiell gefalteten Zustand hält. Im nächsten Schritt bindet  $\beta_2m$  an den hc-Calnexin-Komplex, woraufhin der hc- $\beta_2m$ - bzw. der fertige MHC-I-Komplex vom Calnexin dissoziiert. Anschließend bindet wiederum Calreticulin an das MHC-I und formt letztlich zusammen mit dem heterodimeren Peptidtransporter TAP, ERp57 und Tapasin den PLC-Komplex.<sup>174</sup>



**Abbildung 31: Schema der MHC-I PLC vermittelten Antigen-Präsentation.** Der PLC setzt sich zusammen aus dem heterodimeren Peptidtransporter TAP, der zusammen mit Tapasin/Erp57 den vorab synthetisierten MHC-I-Calreticulin-Komplex bindet. Die Bildung des MHC-I erfolgt über Synthese der hc, die durch BiP (*Binding immunoglobulin protein*) stabilisiert wird. Anschließend bindet Calnexin, woraufhin die Assemblierung des  $\beta_2m$  erfolgt. Fremdartige Peptide aus dem intrazellulärem Proteinabbau durch Proteasome werden mittels TAP vom Cytosol ins ER transportiert und via des PLCs auf MHC-I übertragen. Die Aminopeptidase ERAP (*Endoplasmic reticulum amino peptidase*) kürzt die aus dem Cytosol transportierten Peptide weiter und macht diese für das Beladen des MHC-I zugänglich. Der MHC-I-Peptid-Komplex wird einer weiteren Qualitätskontrolle durch TAPBPR unterzogen und anschließend über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert, um dort den CD8+ T-Zellen zur Immunreaktion präsentiert zu werden.<sup>174</sup>

Aus dem PLC gehen wiederum nur stabile MHC-I-Peptidkomplexe hervor, die anschließend einer weiteren Qualitätskontrolle durch das Tapasin-Homolog TAPBPR (*TAP-binding protein-related*) unterlaufen, ehe sie vom ER freigesetzt werden und mittels Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert, um dort den CD8+ T-Lymphozyten zur Immunreaktion präsentiert zu werden.<sup>175</sup>

## 5. Material & Methoden

### 5.1 Allgemeines & Kollaborationen

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden von Kollaborationspartnern exprimiert und aufgereinigt oder im Rahmen des CLiC-Graduierten-Kollegs zur Verfügung gestellt.

Die untersuchten Proben bezüglich des Insertionsmechanismus und der Assemblierung des  $\Phi$ X174-E sowie die Analysen zur Protein-SapA-Nanopartikelbildung erfolgten in enger Zusammenarbeit mit **Julija Mezhyrova** und **Roman Levin**, der Arbeitsgruppe Dötsch der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von **Dr. Frank Bernhard** (Gruppenleiter der Zellfreien Synthese). Alle mittels LILBID-MS untersuchten  $\Phi$ X174-E Konstrukte (siehe Tabelle 2) und SlyD-Proben wurden von **Julija Mezhyrova** hergestellt. Auch die Solubilisierungs- und Pulldown-Experimente, gezeigte SEC-Läufe sowie das Carboxyfluorescein-Liposom-Lyse-Assay und die damit verbundenen und unter Kapitel 6.1 gezeigten Ergebnisse sind ihr anzurechnen.

Die Darstellung der analysierten Proteine PR (grün absorbierend) und EmrE in SapA-NPs erfolgte durch **Roman Levin**. Ihm sind zudem die unter Kapitel 6.2 in den Abbildungen 51, 56, 57 und 59 gezeigten Experimente und Ergebnisse zuzuschreiben.

In beiden Projekten erfolgte die Protein-Darstellung und Analyse unter Verwendung eines CFPS-Systems. Auf diese Methode soll daher unter Kapitel 5.3 näher eingegangen werden.

**Tabelle 2: Mittels CF synthetisierte und analysierte  $\Phi$ X174-E Konstrukte.**

Konstrukt	Aminosäuren	Sequenz*
$\Phi$ X174-E/ $\Phi$ X174-E-[P21A]	1-91	MVRWTLWDTL AFLLLLSLLL [P/A] SLLIMFIPS TFKRPVSSWK ALNLRKLLM ASSVRLKPLN CSRLPCVYQA ETLTFLTLQK KTCVKNYVQK <u>EGTGGWSHPQ FEK</u>
$\Phi$ X174-Epep/ $\Phi$ X174-Epep- [P21A]	1-37	<u>M</u> K RWTLWDTL AFLLLLSLLL [P/A] SLLIMFIPS TFKRPV <u>SGTG</u> <u>GWSHPQFEK</u>
GFP-Esol	33-91	MSKGEELFTG VVPILVELDG KLTLKFICTT GKLPVPWPTL VTTLTYGVQC FSRYPDHMKR HDFFKSAMPE GYVQERTISF KDDGTYKTRA EVKFECDTLV NRIELKGIDF KEDGNILGHK LEYNFNSHNH YITADKQKNG IKANFKIRHN VEDGSVQLAD HYQQNTPIGD GPVLLPDNHY LSTQSVLSKD PNEKRDHMVL LEFVTAAGIT HGMDELYKHH <u>HHHH</u> LEVLVLFQ GPGSKRPVSS WKALNLRKTL LMASSVRLKP LNCSRLPCVY AQETLTLFLT QKTCVKNYV <u>QKEGTGGWSH PQFEK</u>

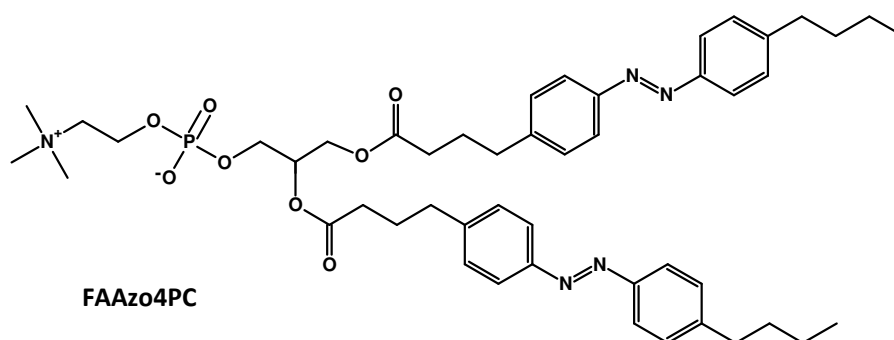
\* Die punktmutierte Aminosäure ist mit [ ] markiert. Modifikationen innerhalb des  $\Phi$ X174-E und C-terminale StreppII/His<sub>6</sub>-Tags sind unterstrichen.



Die Analysen zu den Histidinkinasen SpaK und NisK erfolgten in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Wöhnert und der Arbeitsgruppe Entian (beide Goethe-Universität, Frankfurt am Main). Die Isolierung und Aufreinigung des SpaK und der untersuchten SpaK-Konstrukte mittels Detergens und SMALPs wurde von **Michael Häsler** durchgeführt. Die Experimente bzgl. der Lantibiotika-induzierten Aktivität des SpaK wurden ebenfalls von **Michael Häsler** durchgeführt. Die Analysen des Immunitätsproteins Spal, sowie der Histidinkinase NisK erfolgte zudem in Zusammenarbeit mit **Christoph Geiger** (Arbeitsgruppe Entian).

Alle mittels LILBID-MS untersuchten MHC-I Allomorphe, das photospaltbare Peptid sowie die Proteine TAPBPR, Tapasin/ERp57 wurden Rahmen des CLiC-Graduierten-Kollegs durch **Ines Katharina Müller** (Arbeitsgruppe Tampé, Goethe-Universität, Frankfurt am Main) dar- und zur Verfügung gestellt.

Die untersuchten Proben mit UV-schaltbaren Lipiden in NDs wurden ebenfalls von **Julija Mezhyrova** hergestellt. Als UV-schaltbares Lipid wurde das *FattyAcidAzo4PhosphoCholine* (FAAzo4PC) eingesetzt (siehe Abb. 32). Dieses wurde im Rahmen des CLiC-Graduiertenkollegs von **Max Löffler** (Arbeitsgruppe Wieneke, Goethe-Universität, Frankfurt am Main) synthetisiert.



**Abbildung 32: Strukturformel des FAAzo4PC in der all-trans-Form.** Das UV-schaltbare Lipid trägt zwei Azobenzol-Photoschalter, die durch UV-Bestrahlung von der *trans*- in die *cis*-Konformation überführt werden können.






Die gezeigten Daten und Ergebnisse unter Kapitel 6.1, sowie 6.3.4, entstanden teilweise auch in interner Zusammenarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Nina Morgner zusammen mit **Dr. Oliver Peetz** und wurden in ähnlicher Form bereits veröffentlicht:

- Mezhyrova, J.; Martin, J.; Peetz, O.; Dötsch, V.; Morgner, N.; Ma, Y.; Bernhard, F. *The FEBS journal* **2021**, DOI: 10.1111/febs.15642.
- Geiger, C.; Korn, S. M.; Häslner, M.; Peetz, O.; Martin, J.; Kötter, P.; Morgner, N.; Entian, K.-D. *Applied and environmental microbiology* **2019**, DOI: 10.1128/AEM.00534-19.

Alle Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Powerpoint 2016 (Microsoft), ChemSketch (Version 12.01; ACD/Labs) und/oder Origin 2018 (OriginLab) erstellt. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei den markierten Signalen in den Spektren um einfach negativ geladene Spezies.

Die in den Spektren/Abbildungen als Piktogramme genutzten Strukturen der Proteine entspringen den in Tabelle 3 angegebenen Einträgen der RCSB Protein Data Bank (PDB; [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

**Tabelle 3: Übersicht der zur Piktogramm-Darstellung genutzten PDB-Einträge.**

Piktogramm	Protein	PDB-Eintrag
	PR	2L6X
	EmrE	2I68
	MSP	6XBD
	SapA	4DDJ
	Komplex der N-terminalen Region des SNAP25 und der SNARE Region von Syntaxin 1a	1JTH

## 5.2 Probenpräparation im Rahmen der LILBID-MS Analysen

Die ΦX174-E und SlyD-Proben sowie die Proben der NDs mit UV-schaltbaren Lipiden wurden vor der LILBID-MS Analyse mittels *Micro Spin Desalting Columns* (MSDCs) (Thermo Scientific; #89877; 7 kDa *cut-off*) umgepuffert bzw. entsalzt. Zur Equilibrierung der MSDCs wurden diese viermal mit dem gewünschten Puffer bei 1500 rpm für 1 min zentrifugiert bzw. gewaschen. Der finale Pufferaustausch erfolgte durch Beladen der MSDCs mit 15 µL Probe, die für 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert und so wieder eluiert wurde.

Im Fall der ND-Proben (DMPG-NDs) wurde hierbei als Puffer eine Ammoniumacetat-Lösung (50 mM; pH 7,4) verwendet. Detergens-solubilisierter Proben wurden indes in TRIS-HCl (50 mM; pH 8,0) mit 0,02% Brij 35 umgepuffert.

Alle Proben im Rahmen der Analyse von Protein-SpaA-NPs (mit DOPG als Lipid) wurden direkt in einem TRIS-HCl-Puffer (20 mM; pH 8,0) bereitgestellt und bedurften keines Pufferaustausches.

Im Zuge der SpaK -Bindungsstudien mit den Lantibiotika Subtilin, Nisin und der Subtilin Mutante C11A wurde der Ligand in dreifachem Überschuss zugegeben. SpaK wurde mit allen untersuchten Liganden für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Selbiges gilt für die Analysen bzgl. der Spa/ Subtilin-Interaktion.

Analog den ΦX174-E und SlyD-Proben wurden diese Proben ebenfalls vor den LILBID-MS Analysen mit Hilfe von MSDCs umgepuffert. Im Fall von Detergens-solubiliertem SpaK wurde ein TRIS-HCl Puffer (50 mM; pH 8,0) mit 0,01% DDM genutzt. Für SpaK in SMALPs kam ein TRIS-HCl Puffer (20 mM; pH 8,0) zum Einsatz. Der letztgenannte Puffer fand ebenfalls Einsatz im Zuge der Analysen von Spa.

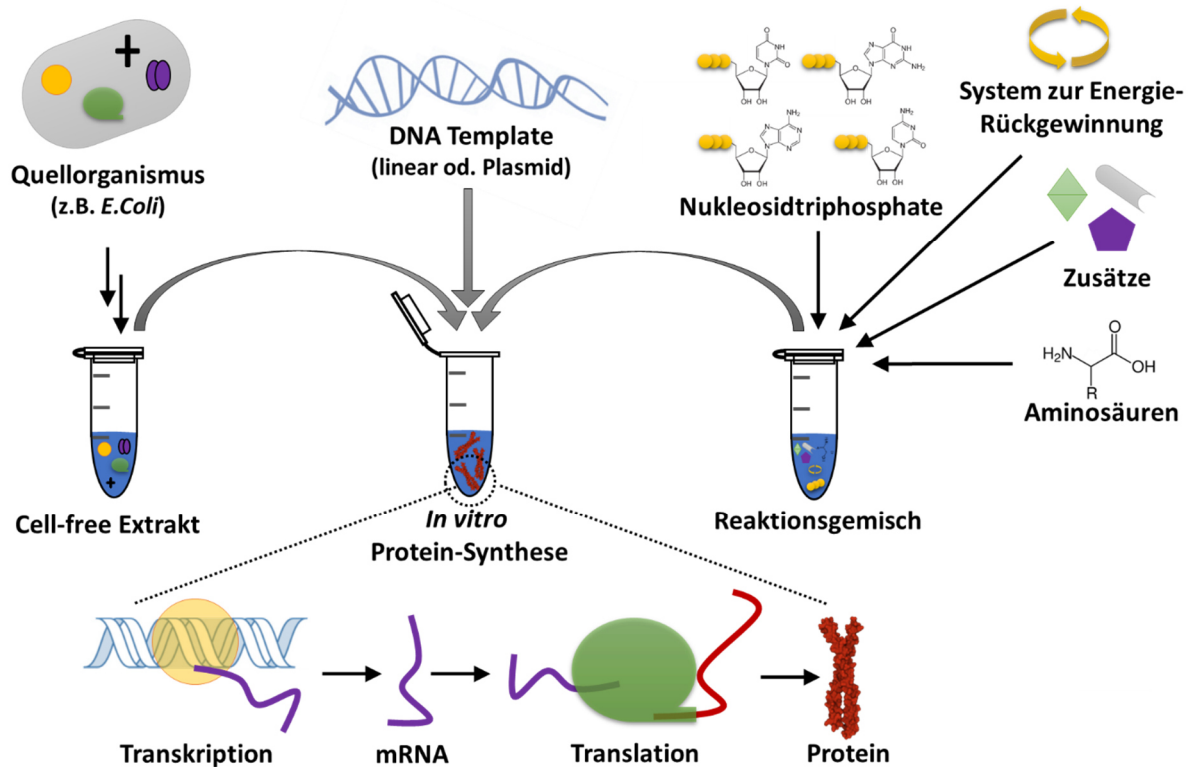
Die Proteine TAPBPR, Tapasin und ERp57 sowie die MHC-I Allomorphe (mit und ohne PP) wurden vor den Messungen mittels MSDCs in Ammoniumacetat-Lösung (50 mM; pH 7,4) umgepuffert bzw. entsalzt. Bei Experimenten mit reinem PP wurde lyophilisiertes PP genutzt, welches in destilliertem Wasser gelöst wurde.

### 5.3 Zellfreie Protein-Synthese

Um Proteine analysieren zu können, müssen diese zunächst in ausreichenden Mengen, am besten in aktiver funktioneller Form, gewonnen bzw. synthetisiert/isoliert werden. Oft erfolgt die Expression von Proteinen dabei *in vivo*, also in lebenden Zellen. Doch nicht jedes Protein kann in Zellkulturen zufriedenstellend synthetisiert werden. Die zellfreie Protein-Synthese (CFPS; *cell-free protein synthesis*) stellt eine effiziente *in vitro* Alternative zur Protein-Expression in lebenden Zellen dar.<sup>177</sup>

An Stelle lebender Zellen kommen bei der CFPS spezielle Zellextrakte bzw. –lysate zum Einsatz. Diese enthalten alle wesentlichen Bestandteile des Protein-Synthesapparates einer Zelle, wie z.B. Ribosomen, Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und alle weiteren benötigten Komponenten zur Protein-Synthese. Die Extrakte lassen sich prinzipiell aus jeder Art von Zellen gewinnen. Die Wahl des Extrakts richtet sich allerdings nach den Anforderungen des Zielproteins. Am häufigsten werden Systeme auf *E. coli* Basis verwendet, da diese eine hohe Ausbeute liefern, kostengünstig sowie einfach in der Handhabung sind und zudem die Möglichkeit der Genmanipulation mit gängigen und etablierten Methoden bieten.<sup>178</sup>

Durch Zugabe von Aminosäuren, Salzen, Nukleosidtriphosphaten und je nach Zielprotein weiteren Zusätzen (z.B. Cofaktoren, MMs, uvm.) zum Zellextrakt, kann somit nahezu jedes Protein, kodiert durch ein DNA- oder RNA-Template, synthetisiert werden (siehe dazu Abb. 33).



**Abbildung 33: Prinzip der zellfreien Protein-Synthese.** Das Extrakt der *in vitro* Protein-Synthese kann aus diversen Organismen erhalten werden und enthält alle für die Transkription- und Translationsreaktion benötigten Substanzen (*Cell-free* Extrakt). Das DNA-Template besteht aus regulatorischen Sequenzen und kodiert das Zielprotein. Das Reaktionsgemisch enthält Bausteine und Energieträger für die mRNA- und Protein-Synthese sowie gegebenenfalls weitere zusätzliche Substanzen (z.B. NDs).<sup>nach 179</sup>

Eine zellfreie Expression zeichnet sich im Vergleich zu zellbasierten Methoden vor allem durch eine kürzere Prozeßzeit und in der Regel hohe Ausbeuten aus. Proteine können binnen weniger Stunden in Konzentrationen einer Größenordnung von einigen mg/ml hergestellt werden. Die CFPS ermöglicht zudem eine direkte Kontrolle der Reaktionsbedingungen. Als Beispiele seien hier die Regulierung der Expressionstemperatur genannt und die Zugabe von Chaperonen oder Protein-Disulfid-Isomerasen, die die Proteinfaltung unterstützen. Ebenso ist der Einsatz und Einbau von modifizierten Aminosäuren möglich. Auf diese Weise können z.B. spezifisch isotope markierte Aminosäuren für NMR-Untersuchungen in das Zielprotein eingebaut werden.<sup>177</sup>

Mittels CFPS ist es auch möglich schwer zu synthetisierende Proteine, wie membranverankerte oder sogar zytotoxische Proteine, zu exprimieren. Als Beispiel sei das bakteriophage Lyse-Protein  $\Phi$ X174-E genannt, welches in lebenden Zellen nicht produziert werden kann (siehe dazu Kapitel 4.1).

Während MPs für *in vivo* Systeme auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften oft eine Herausforderung darstellen, ermöglicht das CFPS-System es, die Synthese und Solubilisierung von MPs durch Zugabe von Detergens oder *membrane mimics*, wie NDs oder Saposinen, zu unterstützen. Wie bereits erwähnt, kann bei Rekonstitution eines MPs in Detergens allerdings dessen Funktionalität leiden. Kehlenbeck *et al.*<sup>7</sup> zeigten dies kürzlich am Beispiel des MsbA. Während MsbA in MMs aus NDs und Salipros noch aktiv war, konnte bei Verwendung eines Detergens kaum noch Aktivität nachgewiesen werden.

Die CFPS erlaubt drei unterschiedliche Strategien der co-translationalen Solubilisierung von MPs z.B. in NDs: (I) Pre-Assemblierung, (II) Co-Assemblierung und (III) Co-Expression. Bei der Pre-Assemblierung werden vorgeformte leere NDs mit definierten Konzentrationen zur CF-Reaktion hinzugegeben. Bei der Co-Assemblierung macht man sich zu Nutze, dass sich spontan NDs aus Lipiden (in der CFPS bereitgestellt in Form von Liposomen) und MSPs bilden, die zuvor separat exprimiert und der CF-Reaktion hinzugegeben werden. Der Ansatz der Co-Expression ist ähnlich der Co-Assemblierung. Hierbei wird allerdings das MSP zusammen mit dem Zielprotein co-exprimiert und nicht vorher separat aufgereinigt.<sup>180,181</sup>

Das erste CFPS-System wurde von Nierenberg & Matthaei<sup>182</sup> 1961 etabliert und seitdem vielfach weiterentwickelt und für viele Anwendungen optimiert. Jin & Hong<sup>177</sup> sowie Rolf & Rosenthal *et al.*<sup>179</sup> liefern einen guten Überblick über die Entwicklung, die Optimierungen und das breite Anwendungsspektrum der CFPS.

## 5.4 LILBID-MS

### 5.4.1 Setup-Einstellungen

Sofern nicht anders angegeben, wurde in allen Experimenten ein Tröpfchen-Generator (MD-K-130, Microdrop Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit einer Kapillare mit 50  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser genutzt. Die Tröpfchen wurden mit einer Frequenz von 10 Hz bei ca. 100 mBar produziert.

Der Gradient zwischen Repeller und der geerdeten Linse betrug stets 6,6 kV. An die Extraktor-Elektrode wurden 4,0 kV DC angelegt, die Repeller-Elektrode wurde mit 4,0 kV DC betrieben und zusätzlich mit 2,6 kV auf 6,6 kV gepulst (Pulslänge 370,2  $\mu\text{s}$ ).

Der IR-Laser wurde bei einer Wellenlänge von 2,94  $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 6 ns betrieben. Die genutzte Laserenergie wurde je nach Anforderung zwischen 12 mJ (*soft mode*) und 23 mJ (*harsh mode*) variiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die gezeigten Spektren im *harsh mode* aufgenommen. Zudem wurden alle Spektren mit einem Laser-Delay von 0,1  $\mu\text{s}$  aufgenommen.

Die MCP und der Szintillator der Detektoreinheit wurden mit 17 kV, respektive 21,6 kV, betrieben und die Spannung am Photomultiplier wurde zwischen 25 kV und 30 kV variiert. Zur Optimierung auf niedrige Massenbereiche wurde eine DE von 10  $\mu\text{s}$  und Linsensspannungen von 1,5/1,8 kV eingestellt, im Fall hoher Massen eine DE von 20  $\mu\text{s}$  und Linsensspannungen von 3,0/3,3 kV. Zum besseren Verständnis und bezüglich der Bedeutung der hier angegebenen Einstellungen sei auf Kapitel 3.3 verwiesen.

Für jede Messung wurden 4  $\mu\text{L}$  Probenvolumen genutzt. Die Ionendetektion erfolgte ausschließlich im anioischen Modus.

Es wurden in der Regel Intensitätssignale aus ursprünglich 500 bis 1000 Tropfen aufsummiert. Die Datenerfassung und -verarbeitung erfolgte mit Hilfe der auf LabView basierenden Software Massign.<sup>183</sup> Die Daten wurden kalibriert, linearisiert, geglättet und einer *Background*-Korrektur unterzogen. Die Kalibrierung aller Spektren erfolgte auf Basis von Messungen einer wässrigen 10  $\mu\text{M}$  *bovine serum albumin*- (BSA-) Lösung (Fluka, #05480).

Die Darstellung der Spektren erfolgte mittels Origin 2018. Alle gezeigten Spektren sind zudem, sofern nicht anders angegeben, auf 1 normiert.

#### 5.4.2 Implementierung von UV-Bestrahlungsquellen

Wie unter Kapitel 3.6 erwähnt, konnte an Aggregationsstudien zu A $\beta$ <sub>42</sub> gezeigt werden, dass sich LILBID-MS grundsätzlich sehr gut eignet, um auch zeitliche Informationen bzgl. des Ablaufs von biologischen Prozessen zu gewinnen. Die Aggregation des A $\beta$ <sub>42</sub> läuft auf verhältnismäßig langsamen Zeitskalen von Minuten bis Stunden ab, wohingegen die meisten biologischen Prozesse im Zeitrahmen von ms stattfinden und somit deutlich schneller ablaufen. Ein häufig genutztes Mittel, um schnelle Reaktionen gezielt zu triggern und zu untersuchen, stellen, wie bereits erwähnt, PLS oder PLs dar (siehe Kapitel 2.2).

Die Art der Probenapplikation bei der LILBID-MS bietet nun grundsätzlich zwei Möglichkeiten den Analyten, der bspw. eine PLS trägt oder PLs enthält, vor der Ionenfreisetzung zusätzlich zu bestrahlen und so eine Reaktion in Gang zusetzen:

Zum einen können die in die Ionenquelle überführten Analyt-Tröpfchen direkt vor der Ionenfreisetzung mittels IR-Laser in der Ionenkammer bestrahlt werden, zum anderen kann eine Bestrahlung der Probe bereits in der Kapillare des Tröpfchenwerfers, d.h. vor deren Überführung in die Ionenkammer, erfolgen. Allerdings sei angemerkt, dass man sich mit den beiden genannten Möglichkeiten der zusätzlichen Bestrahlung zum Triggern einer Reaktion hinsichtlich der analysierbaren Kinetiken auf unterschiedlichen Zeitskalen bewegt. Während eine direkte Bestrahlung der Tröpfchen vor der Ionenfreisetzung es ermöglichen sollte sehr schnelle Reaktionen ( $\mu$ s-Zeitskala) kinetisch zu untersuchen, eignet sich eine Bestrahlung der Kapillare des Tröpfchenwerfers lediglich für langsamere Reaktionen (s bis min). Im Nachfolgenden sei hierauf näher eingegangen.

Um nun in Experimenten zu untersuchen, ob sich LILBID eignet, um lichtgesteuerte Reaktionen zu induzieren und zu analysieren sowie zu klären, ob der Einsatz von UV-schaltbaren Lipiden in NDs zusätzliche Informationen bezüglich spezifisch bindender Lipide liefern kann, wurde das LILBID-MS-Setup entsprechend mit zusätzlichen UV-Lichtquellen versehen.

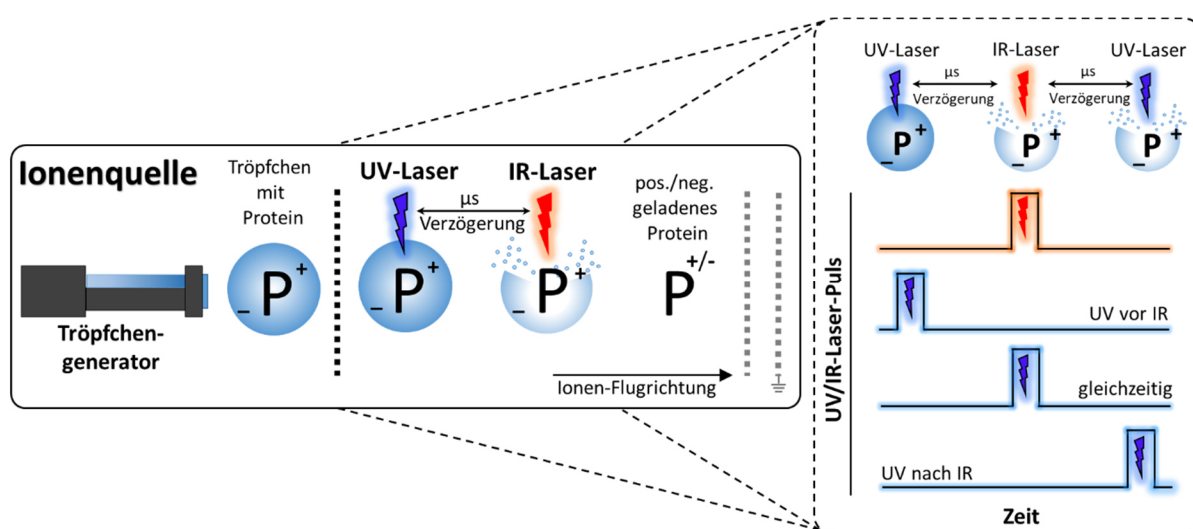
Um schnelle Reaktionen zu triggern, wurde analog zum IR-Laser ein zusätzlicher UV-Laser (InnoLas Laser GmbH, Krailing, Deutschland), der bei 355 nm arbeitet, zur Tröpfchen-Bestrahlung in die Ionenkammer eingespiegelt. IR- und UV-Laser wurden mit Hilfe eines



digitalen *Delay*-Puls-Generators (Quantum Composers, 9520 Series, Bozeman, USA) gekoppelt, um den Zeitpunkt der zusätzlichen UV-Bestrahlung definieren bzw. variieren zu können. Es ergeben sich drei Möglichkeiten die Bestrahlungsereignisse erfolgen zu lassen (siehe dazu Abb. 34):

- 1.) Bestrahlung des Tropfens mit UV- und IR-Laser zum gleichen Zeitpunkt.
- 2.) UV-Laserbestrahlung vor Ionenfreisetzung durch den IR-Laser.
- 3.) UV-Bestrahlung des durch den IR-Laser bereits zerrissenen Tropfens.

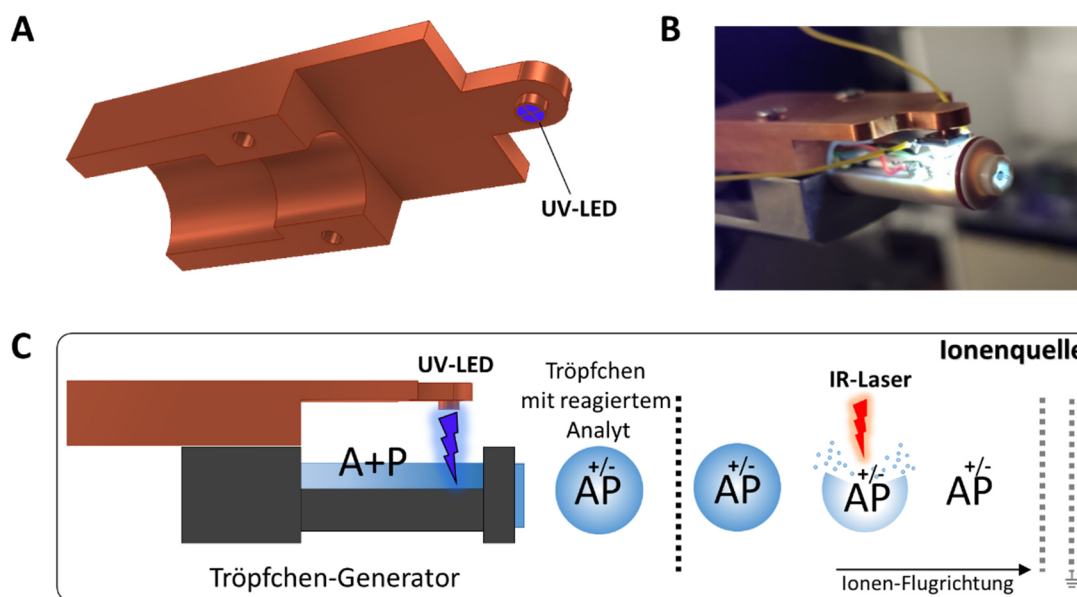
Der Pulsgenerator ermöglicht es das Bestrahlungsereignis zwischen UV- und IR-Laser auf einer  $\mu\text{s}$ -Zeitskala zu variieren. Das *UV/IR-Laser-Delay* definiert somit die maximal erreichbare Zeitauflösung.



**Abbildung 34: Prinzip der zusätzlichen UV-Bestrahlung von Analyt-Tropfen innerhalb der LILBID-Ionenkammer.** Durch Kopplung des IR- und UV-Lasers mit Hilfe eines digitalen *Delay*-Puls-Generators kann der Zeitpunkt der zusätzlichen UV-Bestrahlung definiert bzw. variiert werden.

Die zweite Möglichkeit der zusätzlichen Proben-Bestrahlung kann, wie eingangs erwähnt, bereits in der Kapillare des Tröpfchenwerfers, d.h. vor der Tröpfchen-Überführung in die Ionenkammer, erfolgen (siehe Abb. 35). Via Kapillare erfolgt allerdings nicht nur die Erzeugung der Analyt-Tröpfchen, sie dient ebenfalls als Reservoir für die Probe. Die Bestrahlung der Kapillare mit einem einzelnen Lichtimpuls hat somit zur Folge, dass im gesamten Probenvolumen eine Reaktion induziert wird. Während die ersten Analyt-Tröpfchen bereits in

die Ionenkammer überführt und die darin erhaltenen Ionen freigesetzt werden, kann die in der Kapillare verbliebene (aktivierte) Probe weiter reagieren. Da zur Aufnahme von Spektren über mehrere einzelne Tröpfchen aufsummiert werden muss (besseres Signal-Rausch-Verhältnis), werden somit über den Messzeitraum Moleküle aus Tröpfchen erfasst, in denen eine Reaktion bereits zunehmend weiter abgelaufen ist. Zudem gibt es eine verhältnismäßig lange Totzeit, ehe der Tropfen in die Desorptionskammer überführt wird. Daher ist diese Art der zusätzlichen UV-Bestrahlung, wie erwähnt, nicht geeignet schnelle Reaktionskinetiken zu erfassen. Bei UV-Laser-Bestrahlung der Tröpfchen in der Ionenkammer entfällt diese Problematik, da je ein einzelner Tropfen mit einem Lichtimpuls getriggert wird. Dennoch sollte auch diese Art der Bestrahlung die Möglichkeit bieten für bestimmte Systeme zeitliche Informationen generieren zu können oder zumindest Tendenzen aufzuzeigen, vorausgesetzt diese sind ausreichend langsam (s bis min).



**Abbildung 35: Prinzip und Realisierung der zusätzlichen UV-Bestrahlung des Analyts innerhalb der Tröpfchenwerferkapillare. (A)** CAD-Zeichnung der LED-Halterung. Diese kann oberhalb des Tröpfchenwerfers montiert werden und besteht zur besseren Abfuhr der durch die LED entstehenden Wärme aus Kupfer. **(B)** Bestrahlung der Tröpfchenwerferkapillare im realen LILBID-MS-Setup. **(C)** UV-induziertes Starten einer Reaktion und anschließende Ionenfreisetzung. Die Kapillare des Tröpfchenwerfers dient als Reservoir. In dieser können mittels UV-Bestrahlung zwei vorgelegte Substanzen A und P zur Reaktion gebracht werden. Die reagierten Stoffe (AP) können anschließend via IR-Laser freigesetzt und analysiert werden.

Auf Grund des begrenzten Platzes oberhalb der Kapillare des Tröpfchenwerfers wurde als UV-Bestrahlungsquelle eine kleine *high power* LED (LuxiGen 356nm UV LED Gen4 Emitter; LZ1-00UV0R; LED Engin, San Jose, USA) mit 1,3 W und einer Wellenlänge von 365 nm eingesetzt.

Zur Stromversorgung der LED wurde ein Labornetzteil genutzt, dass über vakuumdichte Durchführungen im Flansch der Tröpfchenwerferhalterung mit der LED verbunden wurde. Um die UV-LED über der Kapillare zu platzieren, wurde eine Halterung konstruiert, auf der die LED, abgeschirmt von den zur Stromversorgung leitenden Pins, aufgelötet wurde (siehe Abb. 35). Als Material für die Halterung wurde Kupfer verwendet, um möglichst gut die durch die LED erzeugte Wärme über angrenzende Bauteile abzuleiten. Die Leistung der LED kann über die eingestellte Spannungs- und Stromversorgung moduliert werden.

## 6. Experimente & Ergebnisse

### 6.1 Mechanismus der Membraninsertion & Assemblierung des $\Phi$ X174-E

Obwohl *E. coli* der bis heute meist genutzte Wirt zur rekombinanten Proteinexpression darstellt<sup>184</sup>, ist er dennoch limitiert hinsichtlich der Expression von Membranproteinen und Toxinen, wie dem Lyse-Protein  $\Phi$ X174-E. Mehrere Versuche wurden unternommen  $\Phi$ X174-E unter Verwendung von zellbasierten Systemen zu produzieren, aber effiziente Protokolle, die eine detaillierte funktionelle Analyse zulassen, fehlen bis dato.<sup>153,185,186</sup>

Um dieses Problem zu adressieren, galt es im Rahmen dieser Arbeit  $\Phi$ X174-E mit Hilfe eines CF-Systems und unter der Verwendung von NDs darzustellen und zu analysieren. Wie unter Kapitel 5.3 erläutert, sind CF-Systeme nicht vom Überleben des Hosts abhängig und ermöglichen daher die Darstellung toxischer Proteine im präparativen Maßstab. Zudem erlauben sie die Implementierung von definierten Membransystemen, wie beispielsweise NDs.<sup>81</sup> In Kombination mit LILBID-MS ergibt sich so die Möglichkeit, die Membraninsertion, Oligomerisation und molekulare Wechselwirkungen zwischen synthetisierten Proteinen, wie dem  $\Phi$ X174-E, zu untersuchen.

Vorrausgegangene Studien zeigten, dass das Chaperon SlyD von entscheidender Bedeutung für den Lyse-Mechanismus von  $\Phi$ X174-E sein muss.<sup>187,153</sup> Allerdings ist dessen genaue Rolle in den verschiedenen Schritten des Lyse-Mechanismus (initiale Solubilisierung, Membraninsertion, Oligomerisierung) weitestgehend ungeklärt. Eine direkte Protein-Protein-Interaktion konnte bisher ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund lag ein Augenmerk dieser Arbeit darauf, erstmalig mittels MS eine mögliche Bindung von SlyD und  $\Phi$ X174-E zu untersuchen, sowie den Einfluss bzw. die Rolle des SlyD in den verschiedenen Schritten des  $\Phi$ X174-E Lyse-Mechanismus zu bestimmen und so die Lyse auf molekularer Ebene näher zu charakterisieren.

#### 6.1.1 $\Phi$ X174-E Solubilisierung durch SlyD

Wie einleitend erwähnt, zeigten frühere *in vivo* Studien, dass die Anwesenheit von SlyD einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität des  $\Phi$ X174-E hat. Um die Interaktion zwischen  $\Phi$ X174-E und SlyD zu charakterisieren, wurde daher  $\Phi$ X174-E sowie das Konstrukt  $\Phi$ X174-Epe zunächst mittels CF co-translational in An- und Abwesenheit von SlyD synthetisiert und der

Einfluss des SlyD hinsichtlich der Solubilisierung von  $\Phi$ X174-E untersucht. Der Solubilisierungsgrad des  $\Phi$ X174-E und seiner Derivate wurde via *Immunoblotting* des Überstands und Pellets mit StrepII-Antikörpern ermittelt.

Es zeigte sich, dass bei Anwesenheit von SlyD ca. 50 % an  $\Phi$ X174-E bereits ohne weitere Zugabe von amphiphilen Komponenten, wie z.B. Detergens, in Lösung blieb (siehe Abb. 36, A, blau). Im Gegensatz dazu zeigten analoge Experimente in Abwesenheit von SlyD lediglich einen geringen solubilisierten Anteil an  $\Phi$ X174-E. Dass SlyD  $\Phi$ X174-E in Lösung hält, legt bereits die Vermutung nahe, dass eine direkte Interaktion zwischen SlyD und  $\Phi$ X174-E stattfinden muss.

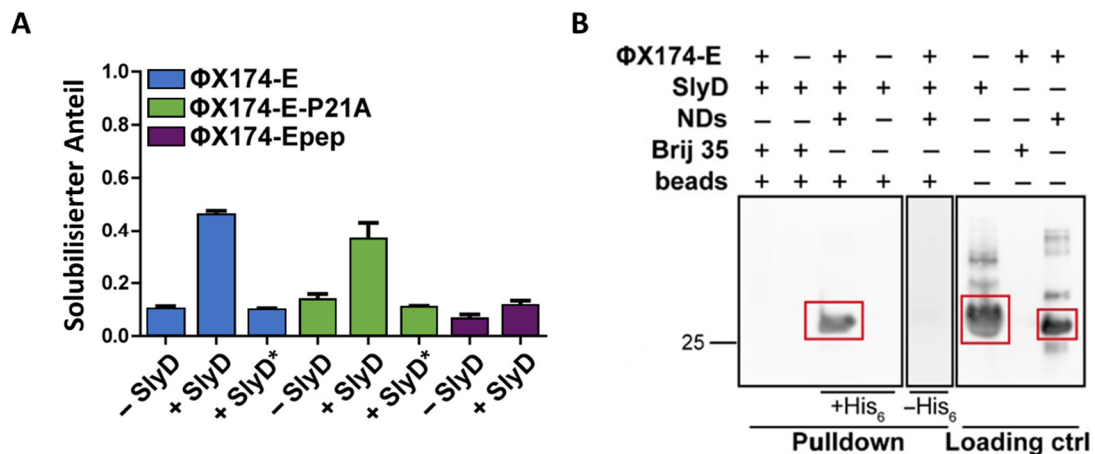
Im Fall des  $\Phi$ X174-Epep zeigte sich kein Einfluss auf die Solubilisierung durch SlyD (siehe Abb. 36, A, lila). Dies lässt weiterhin vermuten, dass die lösliche Domäne des  $\Phi$ X174-E einen entscheidenden Beitrag zur intermolekularen Wechselwirkung zwischen  $\Phi$ X174-E und SlyD leistet.

Vorausgegangene Mutationsanalysen zeigten weiterhin, dass die Aminosäure Prolin 21 (P21) in der Transmembrandomäne essentiell für die lytische Funktion des  $\Phi$ X174-E ist. Zudem wird angenommen, dass P21 ein Target der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerisierungsdomäne (P-Domäne) des SlyD ist.<sup>187,147</sup> Um den Einfluss und die Rolle dieser Aminosäure ebenfalls zu untersuchen, wurde analog das entsprechend punktmutierte Konstrukt  $\Phi$ X174-E-P21A in Gegenwart und Abwesenheit von SlyD synthetisiert. Es zeigte sich ein ähnlicher Effekt bzgl. der Solubilisierung durch SlyD wie im Falle des  $\Phi$ X174-E (siehe Abb. 36, A, grün). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Aminosäure P21 zwar eine entscheidende Rolle für die Aktivität besitzen mag, dennoch nicht essenziell für eine grundsätzliche SlyD/ $\Phi$ X174-E-Komplexbildung ist. Die erhöhte Variation bzgl. des Solubilisierungsgrades und ein nicht ganz so stark ausgeprägter Effekt wie beim  $\Phi$ X174-E lassen zudem vermuten, dass die Interaktion zwischen beiden Proteinen auf Grund der Mutation womöglich nur weniger stark ausgeprägt ist.

Wie unter Kapitel 4.1 erläutert, besitzt SlyD zwei Domänen, zum einen die P-Domäne, welche für die Isomerase-Aktivität ausschlaggebend ist, und zum anderen die IF-Domäne (Chaperon-Funktion). Um die Bedeutung der SlyD-Domänen für die Wechselwirkung mit  $\Phi$ X174-E näher zu untersuchen, wurden ebenfalls Solubilisierungsexperimente durchgeführt, in der SlyD durch die Doppelmutante SlyD-I42S-F132Y (=SlyD\*) ersetzt wurde. Es ist bekannt, dass diese Mutationen zu einer Inaktivierung der P-Domänen-Funktion des SlyD führen.<sup>188</sup>

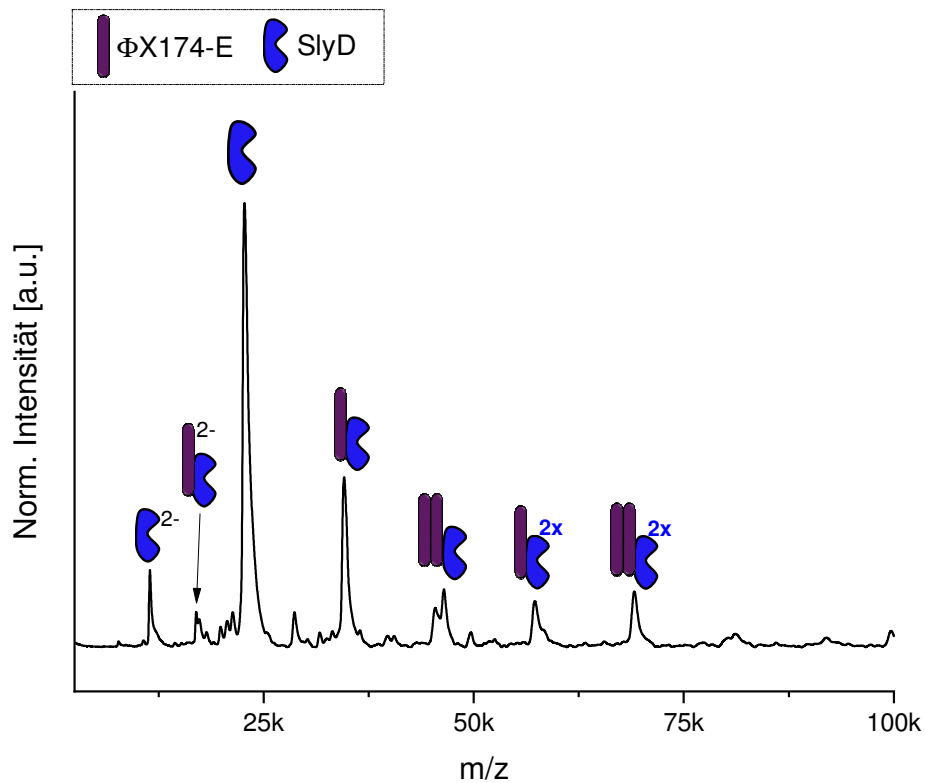
Der Einsatz des SlyD\* hatte zur Folge, dass sowohl bei  $\Phi$ X174-E als auch bei  $\Phi$ X174-E-P21A ein SlyD-bedingter Solubilisierungseffekt aufgehoben wurde. Dies zeigt ebenfalls, dass die P-Domäne eine entscheidende Rolle bzgl. der Komplex-Bildung mit  $\Phi$ X174-E spielen muss.

In weiteren Experimenten wurde die Solubilisierung des  $\Phi$ X174-E ebenfalls im Zuge einer post-translationalen Zugabe von SlyD untersucht (siehe Abb. 36, B). Hierzu wurde  $\Phi$ X174-E zunächst co-translational durch Detergens (Brij35) und in NDs mit DMPG-Lipiden solubilisiert und anschließend via *Pulldown Assay* mit SlyD als *prey*-Protein untersucht. Allerdings war weder mit  $\Phi$ X174-E in NDs, noch mit  $\Phi$ X174-E in Detergens ein *Pulldown* möglich, was die Vermutung nahelegt, dass SlyD nur mit naszierendem  $\Phi$ X174-E interagiert.



**Abbildung 36: Co-translazionale vs. post-translazionale Solubilisierung/Komplex-Bildung von  $\Phi$ X174-E und SlyD.** (A) Co-translational synthetisierte  $\Phi$ X174-E Derivate in An- und Abwesenheit von SlyD oder SlyD\* (isomerisierungsinaktive Mutante). Der Solubilisierungsgrad wurde via Immunoblotting des Überstands und des Pellets ermittelt. Das Signal von Pellet und Überstand wurde addiert und auf 1 normiert. Die Balken repräsentieren das Mittel aus 6 unabhängigen CF-Reaktionen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM; *standard error of the mean*). (B) *Pulldown*-Assays zur Analyse der post-translationalen Interaktion von  $\Phi$ X174-E mit SlyD.  $\Phi$ X174-E wurde in Anwesenheit von Detergens (Brij 25) und NDs (mit und ohne His<sub>6</sub>-Tag) synthetisiert und über einen c-terminalen StrepII-Tag immobilisiert. SlyD wurde als *prey* Protein genutzt, um eine mögliche Bindung zu analysieren. Potentiell bindendes SlyD wurde via *Immunoblotting* detektiert. Das erste Feld zeigt Proben von SlyD mit  $\Phi$ X174-E in Detergens und NDs sowie die zugehörige SlyD Kontrolle ohne immobilisiertes  $\Phi$ X174-E. Es konnte kein *Pulldown* detektiert werden. Die Bande in Feld 3 gehört zu MSP1E3D1, welches ebenfalls einen His-Tag trägt. NDs mit MSP1ED1 ohne His-Tag zeigen kein Signal (zweites Feld). Das dritte Feld zeigt die Kontrollproben von SlyD und immobilisiertem  $\Phi$ X174-E in Detergens oder NDs.<sup>126</sup>

Um die direkte Interaktion zwischen SlyD und  $\Phi$ X174-E zweifelsfrei zu bestätigen, wurden LILBID-MS Spektren aufgenommen. Abbildung 37 zeigt beispielhaft ein entsprechendes Spektrum. Es konnten Signale detektiert werden, die einem SlyD- $\Phi$ X174-E-Komplex im Verhältnis 1:1, 2:1, 1:2 und 2:2 zugeordnet werden konnten und sind Beweis für eine direkte Interaktion von SlyD mit  $\Phi$ X174-E.



**Abbildung 37: LILBID-MS Spektrum des mittels CF in Gegenwart von SlyD synthetisierten ΦX174-E.** In Anwesenheit von SlyD bildet ΦX174-E einen Dimer aus. Signale von Komplexen im SlyD:ΦX174-E-Verhältnis von 1:1 und 2:2 lassen darauf schließen, dass ΦX174-E äquimolar von SlyD komplexiert wird.

Die SlyD/ΦX174-E-Komplexe im Verhältnis 1:1 und 2:2 deuten darauf hin, dass ein SlyD ein ΦX174-E im Zuge der Assemblierung komplexiert. Die Signale, die einem SlyD/ΦX174-E Verhältnis von 1:2 und 2:1 entsprechen, resultieren womöglich aus der Dissoziation des 2:2-Komplexes im Zuge des Prozesses der Ionenfreisetzung bzw. durch die hierbei eingesetzte (hohe) Laserleistung.

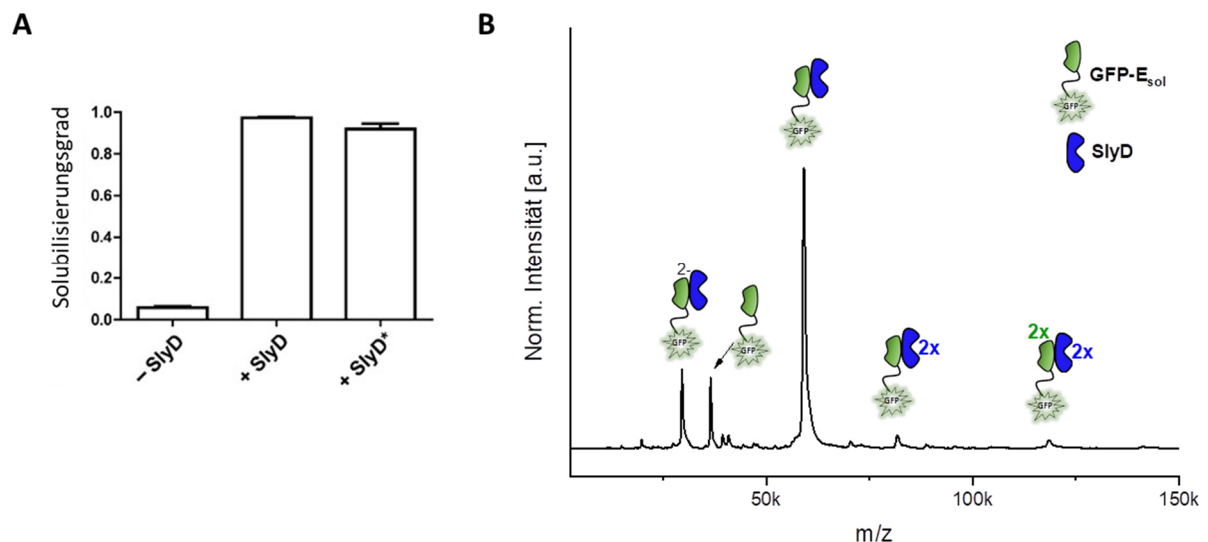
### 6.1.2 SlyD interagiert mit der löslichen Domäne von ΦX174-E

Das Unvermögen von SlyD ΦX174-E-ep zu solubilisieren legt einen Einfluss der löslichen Domäne des ΦX174-E bezüglich der intermolekularen Wechselwirkungen nahe. Diese Vermutung wurde mit Hilfe eines GFP-Esol Konstrukts weiter untersucht. Bei diesem Konstrukt wurde die lösliche Domäne ΦX174-Esol (aa 33-91) an den C-Terminus von GFP fusioniert (siehe dazu Kapitel 5.1).

Das GFP-Esol-Konstrukt erwies sich, entgegen den Erwartungen, als schwer löslich und präzipitierte zu etwa 70 % während der CF-Expression. Durch Zugabe sowohl von SlyD als auch von SlyD\* konnte der Anteil an gelöstem GFP-Esol jedoch deutlich erhöht werden (siehe Abb. 38, A).

Um einen Einfluss des GFP auf die Wechselwirkung mit SlyD auszuschließen, wurde als Kontrolle zusätzlich GFP alleine ebenfalls unter Zugabe von SlyD und SlyD\* exprimiert. Dies hatte jedoch keinen Effekt auf dessen Löslichkeit zur Folge (Daten siehe eigene Publikation [122]).

Die Daten implizieren, dass die SlyD P-Domäne womöglich eine Rolle bezüglich der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen SlyD und  $\Phi$ X174-E spielt, allerdings eher eine untergeordnete. Mittels LILBID-MS konnte gezeigt werden, dass die IF-Domäne ebenfalls mit  $\Phi$ X174-E wechselwirkt, genauer mit der löslichen Domäne. Folglich muss diese ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Interaktion von SlyD mit  $\Phi$ X174-E spielen. Ähnlich der Komplexbildung von SlyD/ $\Phi$ X174-E konnte mittels LILBID-MS auch hier ein stabiler 1:1-Komplex aus SlyD und GFP-Esol nachgewiesen werden (siehe Abb.38, B).



**Abbildung 38: Interaktion von SlyD mit der löslichen Domäne des  $\Phi$ X174-E (GFP-Esol).** (A) Die Löslichkeit des GFP-Esol nimmt in Anwesenheit von SlyD zu. Auch die SlyD Doppelmutante (SlyD\*) steigert die Löslichkeit, was auf eine Interaktion der IF-Domäne des SlyD mit  $\Phi$ X174-E hindeutet.<sup>126</sup> (B) Mittels LILBID-MS konnte eine direkte Interaktion zwischen der löslichen Domäne des  $\Phi$ X174-E und SlyD nachgewiesen werden. GFP-Esol bildet mit SlyD einen stabilen Komplex im Verhältnis 1:1.



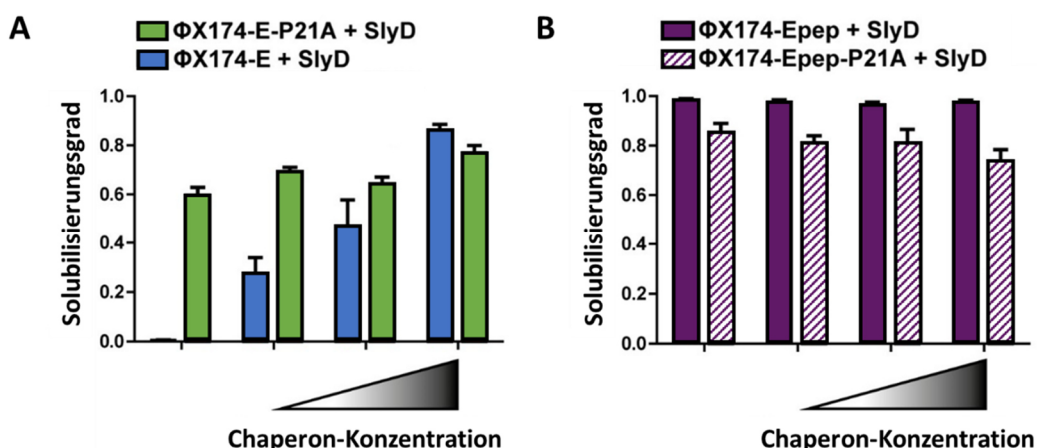
6.1.3 Assemblierung & Membran-Insertion des  $\Phi$ X174-E

Um den Effekt von SlyD auf die Membran-Assoziation/Insertion von  $\Phi$ X174-E Derivaten näher zu untersuchen, wurden die Proteine ebenfalls mit einer festgelegten Konzentration an NDs ( $10 \mu\text{M}$ ) und unter steigender SlyD-Konzentration mittels CF synthetisiert.

Während die Solubilisierung von  $\Phi$ X174-E mit NDs in Abwesenheit von SlyD sehr gering ausfiel, sorgte eine Erhöhung der SlyD-Konzentration für eine deutlich zunehmende Solubilisierung (siehe Abb. 39, A, blau).

Im Gegensatz dazu deutet allerdings die effiziente Solubilisierung der Lyse-inaktiven Mutante  $\Phi$ X174-E-P21A in Abwesenheit von SlyD auf einen SlyD-unabhängigen Mechanismus hin. So zeigte sich sogar im Fall der höchsten SlyD-Konzentration nur ein geringer Effekt auf die Löslichkeit des  $\Phi$ X174-E-P21A (siehe Abb. 39, A, grün). Dies lässt wiederum die Annahme aufkommen, dass die Konformation der P21 Peptidyl-Prolin-Bindung scheinbar einen limitierenden Faktor für die effiziente Membraninsertion des  $\Phi$ X174-E darstellt.

Ähnlich zum  $\Phi$ X174-E-P21A kann auch das verkürzte Konstrukt  $\Phi$ X174-Epep und  $\Phi$ X174-Epep-P21A unabhängig von SlyD mit den zur Verfügung gestellten NDs solubilisiert werden (Abb. 39, B). Dieses Ergebnis lässt ebenfalls vermuten, dass die lösliche Domäne von  $\Phi$ X174-E in Kombination mit der Aminosäure P21 einen kritischen Einfluss auf die Membraninsertion des Toxins hat.



**Abbildung 39: Solubilisierung und Membran-Insertion von  $\Phi$ X174-E und seinen Derivaten in Anwesenheit von SlyD und NDs.** (A) Während eine Erhöhung der SlyD-Konzentration eine erhöhte Löslichkeit des  $\Phi$ X174-E zur Folge hat, zeigt sich hingegen kein Effekt auf die Solubilisierung im Fall der Mutante  $\Phi$ X174-E-[P21A]. (B) SlyD zeigt nahezu keinen Effekt auf die Löslichkeit der gekürzten  $\Phi$ X174-E Konstrukte. Die Balken repräsentieren das Mittel aus 6 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.<sup>126</sup>

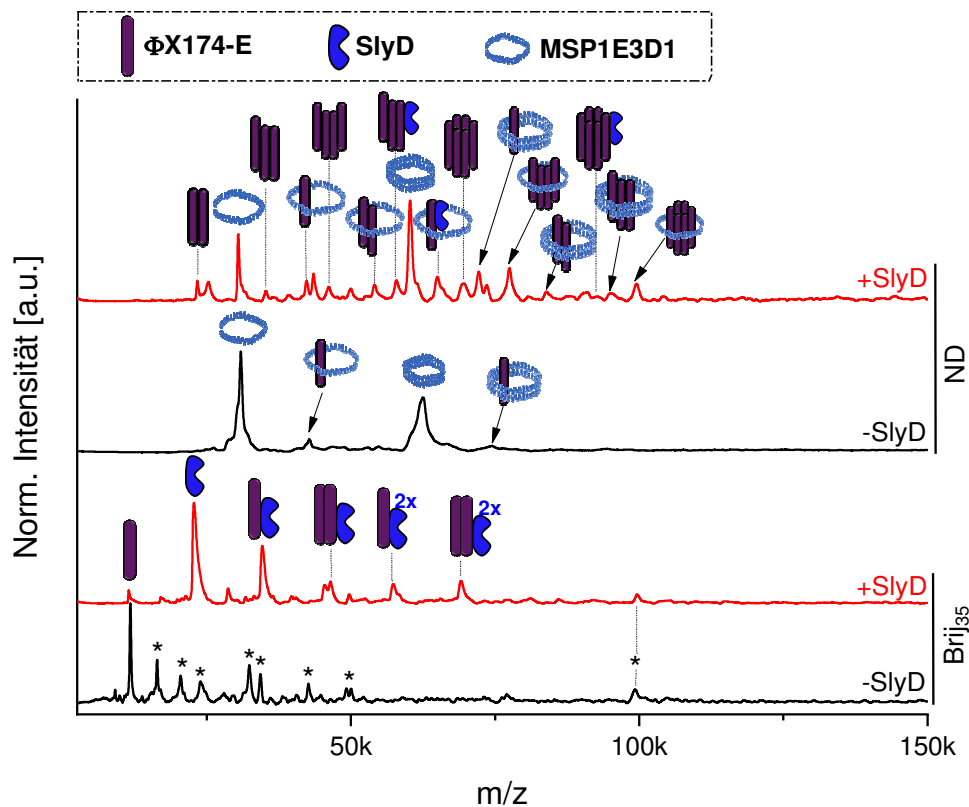
An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Solubilisierung des  $\Phi$ X174-E in Gegenwart hoher SlyD-Konzentrationen noch keinen Beweis für eine SlyD-modulierte Assoziation/Insertion von  $\Phi$ X174-E in die bereitgestellten NDs darstellt. Es wurde gezeigt, dass SlyD/  $\Phi$ X174-E – Komplexe bereits in Abwesenheit von NDs löslich sind. Dennoch deuten die Solubilisierungsexperimente daraufhin, dass eine Insertion von mehreren  $\Phi$ X174-Epеп und womöglich auch von  $\Phi$ X174-E in eine ND erfolgen könnte. Unklar bleibt jedoch, ob mehrfach insertierte Monomere zu einem Oligomeren-Komplex assemblieren.

Dass in NDs insertierte Monomere zu einem Oligomeren-Komplex assemblieren, konnte wiederum durch LILBID-MS-Analysen gezeigt werden. LILBID-MS eignet sich, wie bereits mehrfach erläutert, hervorragend, um den Oligomerzustand eines MPs in einer ND zu ermitteln. Durch sorgsames Abstimmen der Laserleistung ist es möglich, Komplexe teilweise zu dissoziieren. Komplexe, von denen das MSP abgestreift werden kann, sind von besonderem Interesse, da diese Komplexe als besonders stabil betrachtet werden können. Der größte detektierbare Proteinkomplex ohne MSP repräsentiert somit den größten sich ausgebildeten Komplex innerhalb einer ND, oder zumindest den stabilsten Subkomplex.<sup>126</sup> Kleinere detektierbare Oligomere können ebenfalls existieren oder auf Grund der Laser-induzierten Dissoziation resultieren.

Abbildung 40 zeigt eine Reihe von Spektren des CF-synthetisierten  $\Phi$ X174-E in NDs und solubilisiert mit Detergens Brij35 in An- und Abwesenheit von SlyD. Im Fall des ohne SlyD synthetisierten  $\Phi$ X174-E in NDs konnten zwei dominante Signale detektiert werden, die dem freien Monomer und Dimer des MSPs zugeordnet werden konnten. Weiterhin zeigt das Spektrum zwei schwache Signale, die dem  $\Phi$ X174-E Monomer in Verbindung mit dem Monomer und Dimer des MSPs entsprechen.

Wurde  $\Phi$ X174-E in Anwesenheit von NDs und SlyD dargestellt, so zeigten die Spektren nach wie vor dominante Signale des MSPs (Monomer und Dimer), jedoch zusätzlich auch eine Verteilung des  $\Phi$ X174-E bishin zum Hexamer mit einem MSP. Weiterhin ließ sich eine Verteilung des MSP-freien  $\Phi$ X174-E bis hin zum Hexamer ermitteln. Wie zuvor erwähnt, kann die Verteilung vom freien  $\Phi$ X174-E Dimer bis hin zum Hexamer, der den stabilsten detektierbaren Komplex darstellt, durch Laser-induzierte Dissoziation erklärt werden. Ein Signal des  $\Phi$ X174-E Monomers ist, gerätebedingt bzw. den Einstellungen geschuldet, im gezeigten Spektrum nicht ersichtlich, da, um die höhermassigen Komplexe noch mit

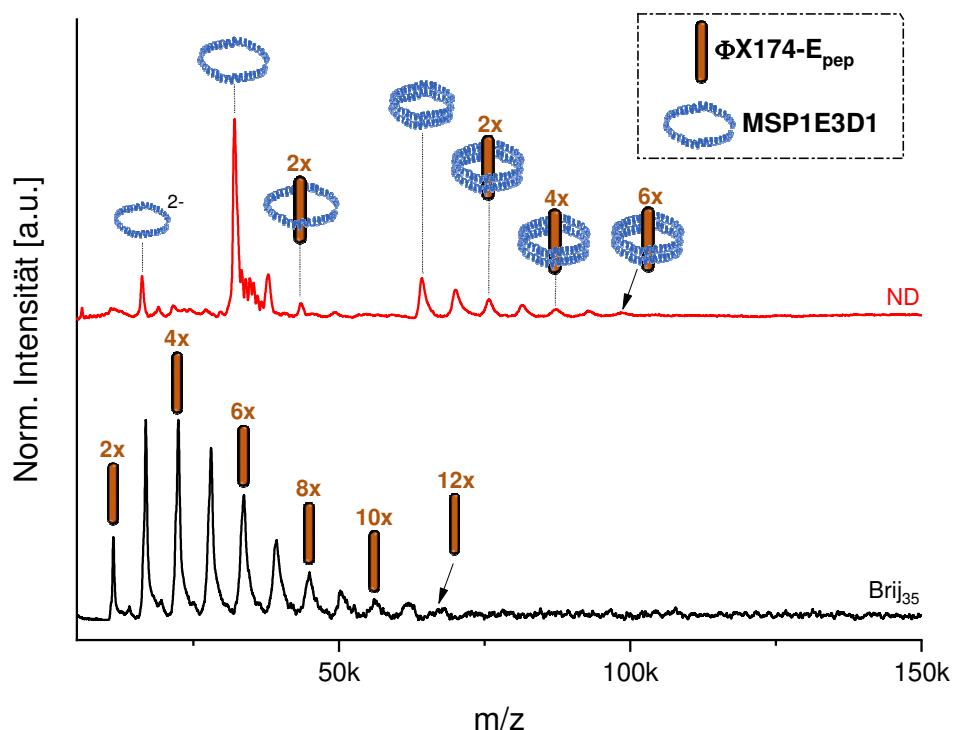
ausreichend Intensität detektieren zu können, entsprechend auf hohe Massen optimiert wurde. Auch konnten Signale identifiziert werden, die einem  $\Phi$ X174-E bis hin zum Trimer mit zwei MSPs entsprechen. Ein gewisses Mindestmaß an Laserleistung wird benötigt, um im Zuge des Ionenfreisetzungprozesses das Protein aus den NDs zu dissoziieren, Lipide von den MSPs und MPs abzustreifen und damit einhergehend eine entsprechend gute Auflösung der Signale zu erhalten (siehe auch Kapitel 3.5). Es ist anzunehmen, dass auf Grund der benötigten hohen Laserleistung hierbei Komplexe aus höheren  $\Phi$ X174-E Oligomeren mit zwei MSPs bereits dissoziierten, weshalb als höchster  $\Phi$ X174-E Oligomer mit zwei MSPs nur noch lediglich ein Trimer detektiert werden konnte.



**Abbildung 40: LILBID-MS Spektren des CF synthetisierten  $\Phi$ X174-E in NDs und solubilisiert mit Detergens (Brij 35) in An- und Abwesenheit von SlyD.** Während sowohl bei Solubilisierung in Detergens als auch in NDs bei Abwesenheit von SlyD lediglich ein  $\Phi$ X174-E Monomer detektiert werden konnte, bilden sich in Anwesenheit von SlyD im Fall einer Detergens-solubilisierung  $\Phi$ X174-E-Dimer-Komplexe mit bis zu zwei SlyD. Im Fall von NDs können  $\Phi$ X174-E Oligomere bis hin zum Hexamer detektiert werden, was auf eine SlyD modulierte Membran-Insertion und Assemblierung schließen lässt.

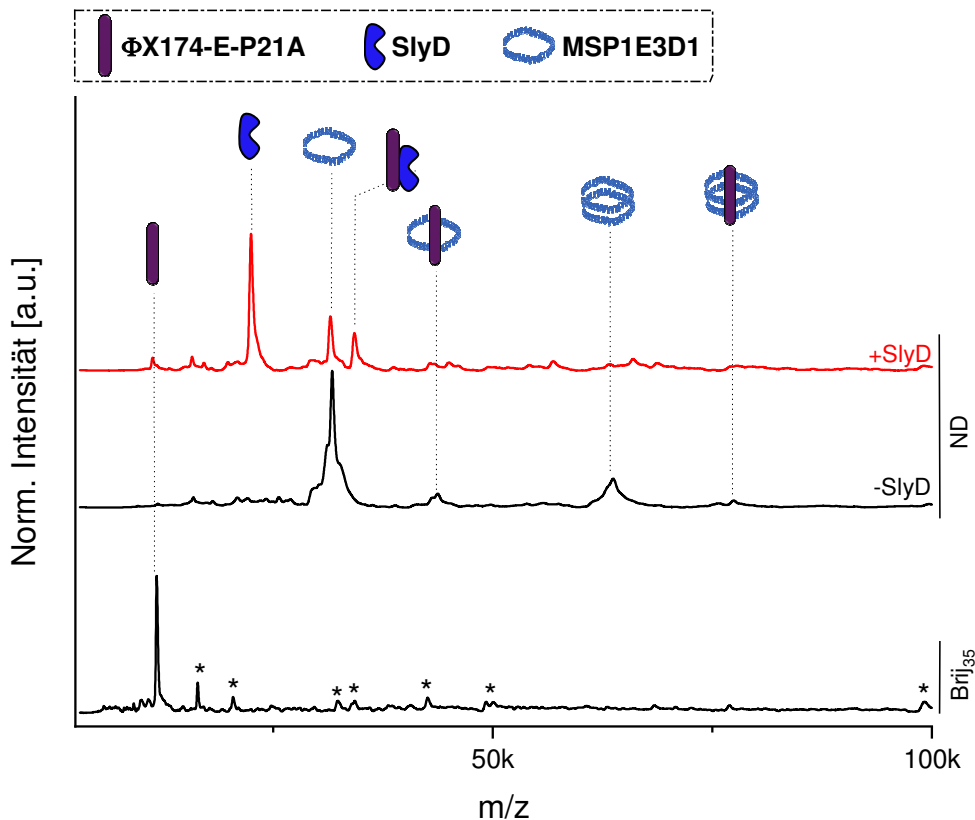
Bei Synthese des  $\Phi$ X174-E mittels CF unter Verwendung eines Detergens zeigte sich ein gänzlich anderes Bild. In Abwesenheit von SlyD konnte lediglich ein Signal von monomerem  $\Phi$ X174-E detektiert werden. Zudem zeigt das Spektrum einige Signale von Verunreinigungen (Abb. 40, markiert mit \*).

Analog den Experimenten mit  $\Phi$ X174-E konnten im Fall des gekürzten Konstrukts  $\Phi$ X174-Epep mit NDs ebenfalls Oligomere bis hin zum Hexamer detektiert werden, allerdings bereits ohne Zugabe von SlyD. Dies steht im Einklang mit den vorausgegangenen experimentellen Ergebnissen, die zeigten, dass auch das verkürzte Konstrukt  $\Phi$ X174-Epep unabhängig von SlyD mit den zur Verfügung gestellten NDs solubilisiert werden kann. Interessanterweise zeigte  $\Phi$ X174-Epep bei der CF-Synthese unter Verwendung eines Detergens sogar eine höhere Tendenz zur Oligomerisierung. Es konnten Oligomere bis hin zum Dodekamer beobachtet werden (siehe Abb. 45). Dies könnte wiederum ein Indiz dafür sein, dass die in NDs beobachteten Hexamere womöglich keinem festen und endgültigen Oligomerzustand entsprechen. Durch die Größe der NDs ist der beobachtbare Oligomerisierungsgrad womöglich limitiert.



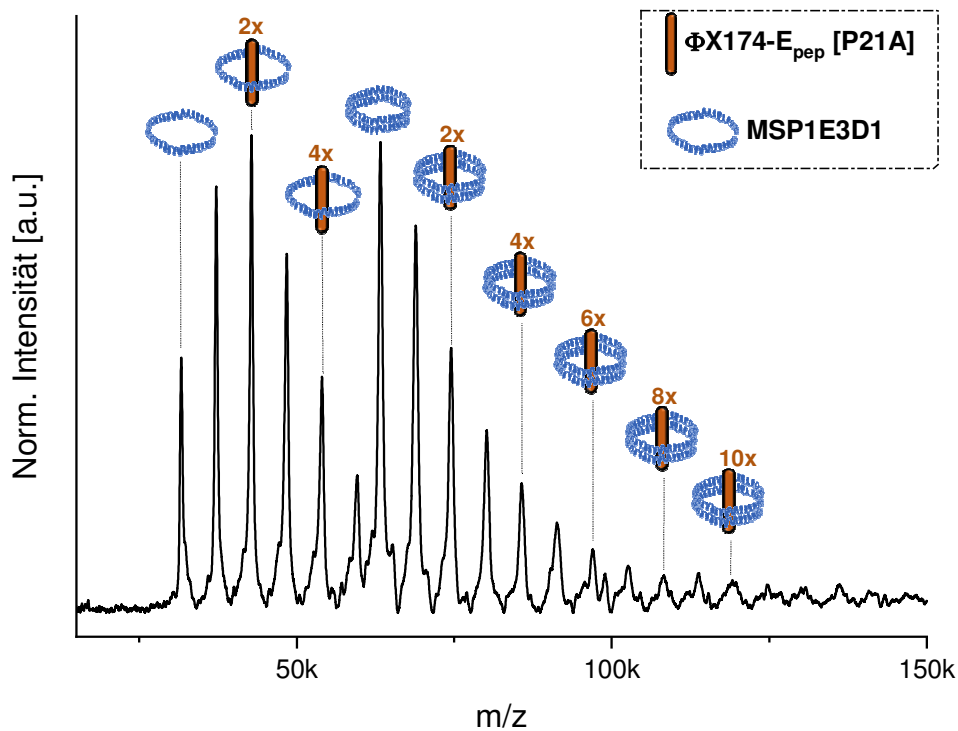
**Abbildung 45:** LILBID-MS Spektren des  $\Phi$ X174-Epep in NDs und solubilisiert mit Detergens (Brij<sub>35</sub>) in An- und Abwesenheit von SlyD. Das verkürzte Konstrukt  $\Phi$ X174-Epep kann unabhängig von SlyD mit den zur Verfügung gestellten NDs solubilisiert werden. Sowohl unter Verwendung von NDs als auch von Detergens bildet das  $\Phi$ X174-Epep Oligomere aus. In Detergens zeigt sich sogar eine höhere Tendenz zur Oligomerisierung.

In weiteren Messungen wurde der Einfluss der Aminosäure P21 auf die Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-E mittels LILBID-MS näher untersucht. Spektren des aufgereinigten  $\Phi$ X174-E-P21A/ND Komplexes zeigten sowohl mit als auch ohne SlyD lediglich monomeres  $\Phi$ X174-E-P21A. Selbiges galt für eine CF-Expression mit Brij35 (siehe Abb. 46).



**Abbildung 46:** LILBID-MS Spektren des punktmutierten Konstrukts  $\Phi$ X174-E-P21A in NDs und solubilisiert mit Detergens (Brij 35) in An- und Abwesenheit von SlyD. Die Punktmutation hat erheblichen Einfluss auf die beobachtbare Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-E. Auch bei Anwesenheit von SlyD kann lediglich ein  $\Phi$ X174-E Monomer detektiert werden.

Im Gegensatz zum  $\Phi$ X174-E-P21A zeigte dieselbe Punktmutation beim verkürzten Konstrukt  $\Phi$ X174-Epep-P21A keinen negativen Effekt hinsichtlich der Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-Epep. Abbildung 47 zeigt ein Spektrum des  $\Phi$ X174-Epep-P21A in ND. Bereits ohne SlyD kann eine Verteilung des  $\Phi$ X174-Epep-P21A mit einem MSP und zwei MSPs bis hin zum Dekamer beobachtet werden.



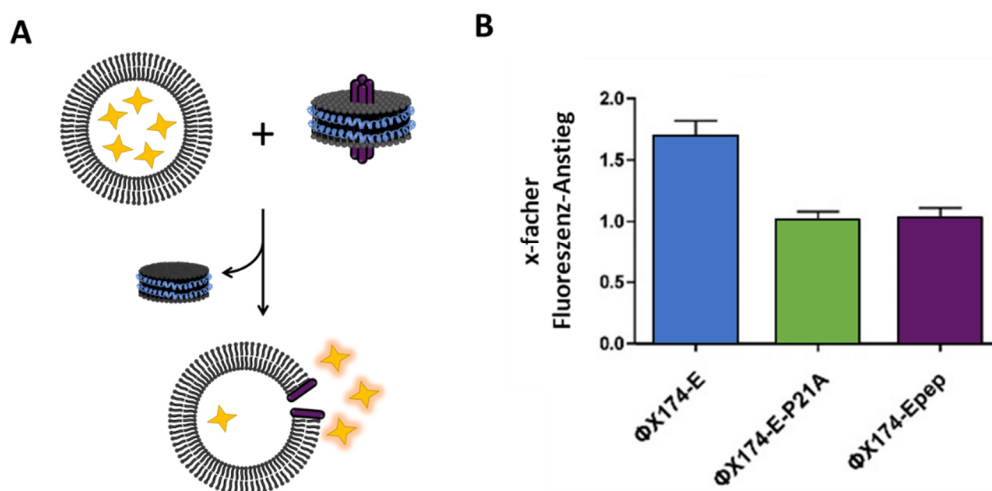
**Abbildung 47:** LILBID-MS Spektrum des punktmutierten  $\Phi$ X174-Epep-P21A in NDs.  $\Phi$ X174-Epep-P21A bildet unabhängig von SlyD in NDs Oligomere aus. Es können Oligomere bis hin zum Dekamer detektiert werden.

Auf Grund der LILBID-MS-Analyse konnte festgestellt werden, dass eine Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-Epep und der entsprechenden Mutation  $\Phi$ X174-Epep-P21A unabhängig von SlyD ist. Im Fall des  $\Phi$ X174-E spielt die Mutation jedoch für die Oligomerisierung bzw. Assemblierung in die NDs eine entscheidende Rolle.

Die LIBID-MS-Analysen und die damit nachgewiesene Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-E unter Mitwirken des SlyD bis hin zu stabilen Hexameren in NDs stützt die Hypothese, dass die Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-E möglicherweise zu einer Porenbildung innerhalb der Membran führt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine mögliche Porenbildung auf Basis von Hexameren eine finale Porengröße definiert.

Um die Hypothese der Porenbildung weiter zu untermauern, wurden daher zusätzlich Experimente unter Verwendung einer neu entwickelten Technik, eines Liposom-Lyse-Assays, weiter untersucht. Bei diesem Assay werden mit Carboxyfluorescein gefüllte Liposome mit Protein/ND- Komplexen inkubiert. Es findet ein Transfer des Proteins von der ND in die Liposom-Membran statt.<sup>189</sup> Eingeschlossenes Carboxyfluorescein kann nun im vorliegenden Fall bei  $\Phi$ X174-E Übertrag und einer damit einhergehenden Porenbildung aus dem inneren der Liposome austreten und durch Fluoreszenz-Messungen quantifiziert werden (siehe Abb. 48, A).

Im Gegensatz zu der Lyse-defizienten Mutante  $\Phi$ X174-E-P21A und dem lytisch inaktiven Derivat  $\Phi$ X174-Epep, welches ebenfalls Oligomere ausbildet, zeigte das  $\Phi$ X174-E eine deutliche Zunahme des Carboxyfluorescein-Austretens aus den Liposomen (siehe Abb. 48, B) und bekräftigte folglich die Annahme, dass die Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-E zu einer Porenbildung führt.



**Abbildung 48: Schema und Ergebnisse des Liposom-Lyse-Assays. (A)** Carboxyfluorescein-gefüllte Liposome werden mit Protein/ND-Komplexen inkubiert. Das Protein wird daraufhin auf die liposomale Membran transferiert. Kommt es hierbei wiederum zur Zerstörung der Liposomen-Membran, wie bzw. in Form einer Porenbildung induziert durch  $\Phi$ X174-E, kann das eingeschlossene Carboxyfluorescein aus dem Inneren der Liposome austreten und durch Fluoreszenz-Messungen quantifiziert werden. **(B)** Die Konstrukte  $\Phi$ X174-E-P21A und  $\Phi$ X174-Epep haben keinen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz zur Folge. Lediglich im Fall des  $\Phi$ X174-E kann ein Fluoreszenzanstieg detektiert werden, was eine Porenbildung nahelegt.<sup>126</sup>

#### 6.1.4 Vorgeschlagener Mechanismus der SlyD-modulierten $\Phi$ X174-E Assemblierung

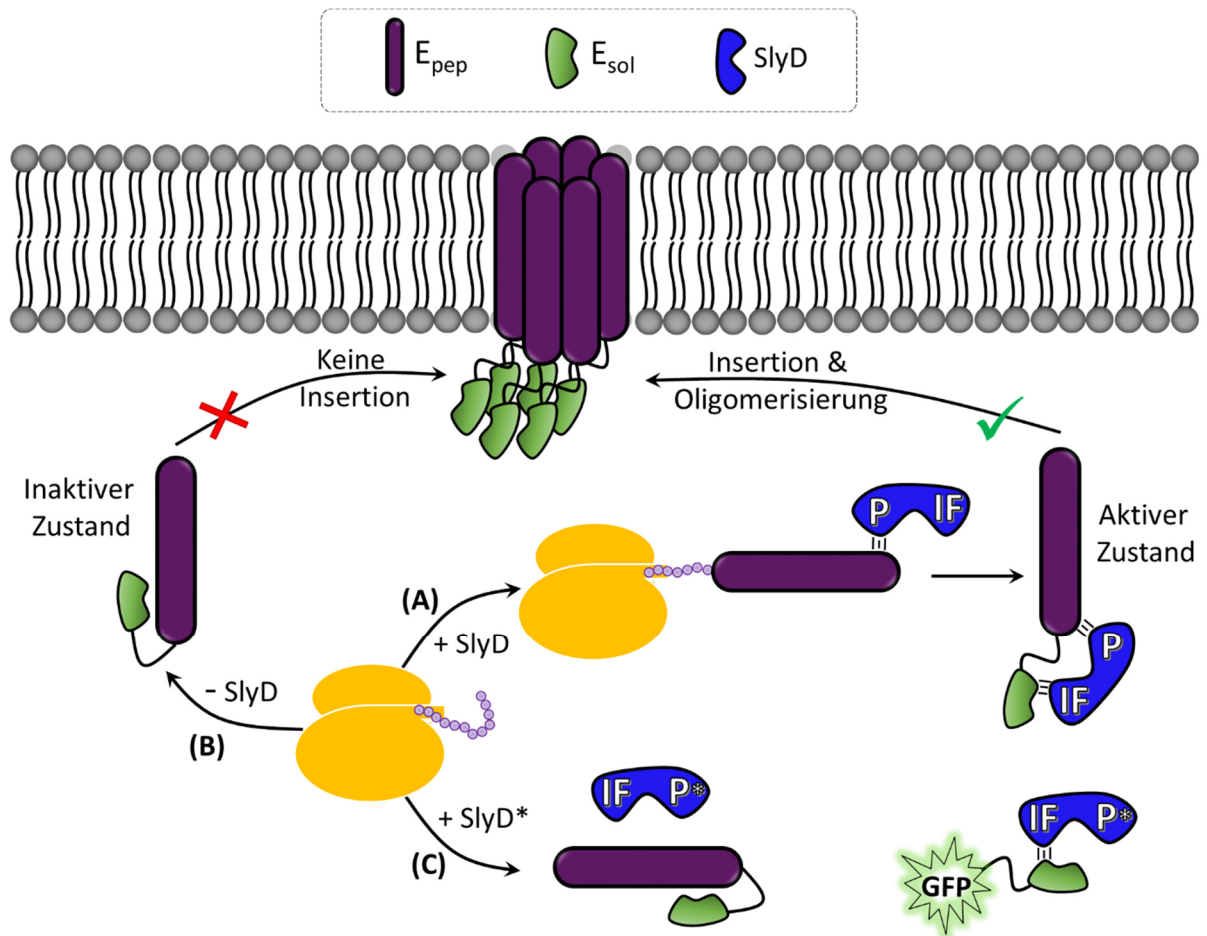
Auf Basis der Solubilisierungsexperimente, den Pulldown-Assays sowie den LILBID-MS Daten wurde ein Model für die  $\Phi$ X174-E Aktivierung und Assemblierung durch SlyD entwickelt (siehe Abb. 49):

Eine intermolekulare Wechselwirkung der beiden  $\Phi$ X174-E Domänen hat in Abwesenheit von SlyD die Ausbildung eines auto-inhibitorischen Komplexes zur Folge (siehe Abb. 49, B). Sobald sich eine inaktive Konformation mit  $\Phi$ X174-E ausgebildet hat, ist ebenfalls keine Interaktion mehr mit SlyD möglich. Dies erklärt, warum keine post-translationale Wechselwirkung von SlyD mit  $\Phi$ X174-E, solubilisiert in NDs oder Detergens, detektiert werden konnte. Ein initialer Kontakt der SlyD P-Domäne, sehr wahrscheinlich mit der naszenten Transmembran-Domäne der Vollängen- $\Phi$ X174-E Derivate, ist jedoch notwendig, um einen stabilen Komplex auszubilden. Falls dieser Kontakt nicht zu Stande kommen kann, wie im Fall des SlyD\* (siehe Abb. 49, C), präzipitieren die synthetisierten  $\Phi$ X174-E Derivate direkt.

Es wird weiterhin angenommen, dass die initiale Wechselwirkung der SlyD P-Domäne mit der Transmembrandomäne des  $\Phi$ X174-E entweder nur schwach ausgeprägt oder transienter Natur ist, da das  $\Phi$ X174-Epep Konstrukt nicht durch SlyD in Lösung gehalten werden konnte. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, in denen es nicht möglich war eine Interaktion von SlyD mit synthetischem  $\Phi$ X174-Epep durch CD-Spektroskopie nachzuweisen.

Im Gegensatz dazu bindet SlyD stark an die lösliche Domäne  $\Phi$ X174-Esol, wodurch die SlyD-Komplexe mit naszentem  $\Phi$ X174-E,  $\Phi$ X174-E-P21A oder GFP-Esol stabil aufgereinigt werden konnten. Basierend auf diesen Ergebnissen wird ein zweistufiges Model der Interaktion von SlyD mit  $\Phi$ X174-E vorgeschlagen (Abb 49, A). In einem ersten vermutlich schwachen oder transienten Kontakt wird die Transmembrandomäne des  $\Phi$ X174-E durch die P-Domäne des SlyD gebunden. Diese Interaktion könnte in einer Isomerisierung an P21 resultieren, begleitet von einer intermolekularen Konformationsänderung, die den späteren Einbau in die Membran erlaubt. In einem zweiten Schritt wird der Komplex durch eine Interaktion von der löslichen Domäne des  $\Phi$ X174-E mit SlyD über die IF-Domäne stabilisiert, ehe es zur Membraninsertion und Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-E kommt.





**Abbildung 49: Vorgeschlagener Mechanismus der SlyD-vermittelten Assemblierung und Membraninsertion des  $\Phi$ X174-E.** (A) In Gegenwart eines funktionalen SlyD kann dessen P-Domäne mit der naszierenden  $\Phi$ X174-E-pep Domäne interagieren. Nach abgeschlossener Translation interagiert die IF-Domäne des SlyD wiederum auch mit der  $\Phi$ X174-E-sol Domäne und bildet einen stabilen SlyD/ $\Phi$ X174-E-Komplex. Das durch SlyD solubilisierte  $\Phi$ X174-E kann dann in die Membran überführt werden und oligomerisieren. (B) In Abwesenheit von SlyD, interagiert  $\Phi$ X174-E-sol mit  $\Phi$ X174-E-pep und es bildet sich ein inaktiver intramolekularer Komplex. (C) Ein SlyD mit defekter P-Domäne (SlyD\*) kann nicht mit der naszierenden  $\Phi$ X174-E-pep Domäne interagieren und ein inaktiver  $\Phi$ X174-E-sol/ $\Phi$ X174-E-pep-Komplex bildet sich aus. Die intakte IF-Domäne eines SlyD\* kann jedoch noch mit  $\Phi$ X174-E-sol interagieren.<sup>126</sup>

## 6.2 Analyse & Optimierung der MP-Solubilisierung durch SapA-Nanopartikel

Wie einleitend erwähnt, sind MPs auf Grund ihrer Hydrophobizität in wässrigen Lösung nicht stabil. Daher stellt die funktionelle und strukturelle Analyse von MPs eine große Herausforderung dar. In den letzten Jahrzehnten haben sich diverse MMs, wie die Nanodisc- und Salipro-Technologie, als Standardmethoden etabliert, um MPs zu rekonstituieren und in Lösung zu halten. Sowohl im Zuge der Rekonstitution von MPs in NDs als auch in Salipro-Partikeln wird jedoch üblicherweise Detergens benötigt, was beispielsweise einen negativen Effekt auf die Aktivität eines MPs haben kann.<sup>7</sup>

Eine Möglichkeit MPs Detergens-frei in MMs zu solubilisieren, stellt ebenfalls das zuvor bereits im Zuge der Analysen des  $\Phi$ X174-E erfolgreich genutzte CFPS-System dar. Wie unter Kapitel 5.3 beschrieben, erlaubt die CFPS hierbei unterschiedliche Strategien zur Darstellung von MPs in MM-Systemen. Eine Möglichkeit besteht darin *in vitro* vorgeformte leere NPs der CF-Reaktion zuzuführen, woraufhin es zu einer co-translationalen Insertion von naszentem MP in die NPs kommt. Alternativ können auch Lipide und separat aufgereinigtes SapA oder MSP getrennt der CF-Reaktion zugeführt werden, sodass es zu einer Co-Assemblierung von NPs zusammen mit dem naszierenden Ziel-MP kommt. Unabhängig von der Solubilisierungsstrategie erlaubt die CFPS den Typ des gewünschten MM-Systems sowie dessen Konzentration die eingesetzten Lipid-Protein-Verhältnisse etc. zu modulieren.<sup>177</sup>

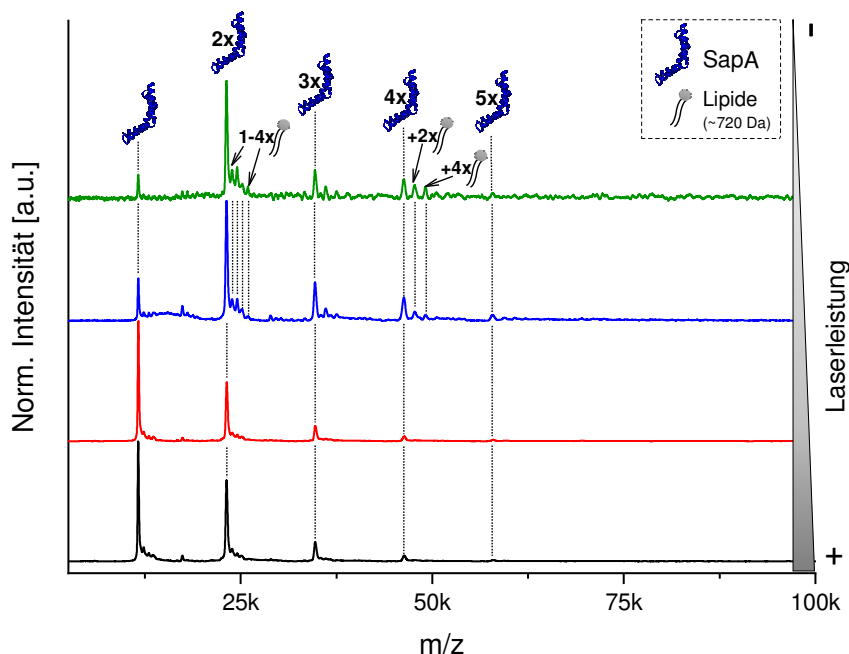
Unter Kapitel 3.5 wurde bereits ausführlich dargelegt, wie gut sich LILBID-MS in Kombination mit NDs zur Analyse von MPs eignet. Das MM-System der NDs konnte ebenfalls in Verbindung mit der CFPS im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich genutzt werden, um die Assemblierung des Toxins  $\Phi$ X174-E zu untersuchen (siehe Kapitel 6.1). Eine Analyse von MPs mittels LILBID-MS unter Verwendung von Saposin-Nanopartikeln gab es allerdings bisweilen nicht. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob und wie gut sich LILBID-MS eignet, um MPs unter Verwendung von SapA-NPs zu analysieren. Als Modellprotein diente hierbei das bereits vielfach untersuchte PR. Von diesem ist beispielsweise bekannt, dass es unter natürlichen Bedingungen bevorzugt als Penta- oder Hexamer vorliegt.<sup>157</sup>

Um die Assemblierungsmodi im CFPS-Systems besser verstehen zu können und die präparativen Bedingungen hinsichtlich der Darstellung eines MPs in SapA-NPs zu optimieren, galt es zudem zu untersuchen, ob und wie welche Parameter der CFPS (wie z.B. die eingesetzte Lipidmenge) einen Einfluss auf die MP-Insertion bzw. deren Darstellung in SapA-NPs haben.

## 6.2.1 Einfluss des SapA auf die Ausbildung von PR-SapA-NPs

In ersten Experimenten wurde zunächst SapA aus *E. coli* exprimiert und mittels LILBID-MS untersucht. Hierbei zeigte sich, dass SapA Oligomere bis hin zum Pentamer ausbildet, wobei das dominanteste Signal allerdings einen Dimer repräsentiert (siehe Abb. 50).

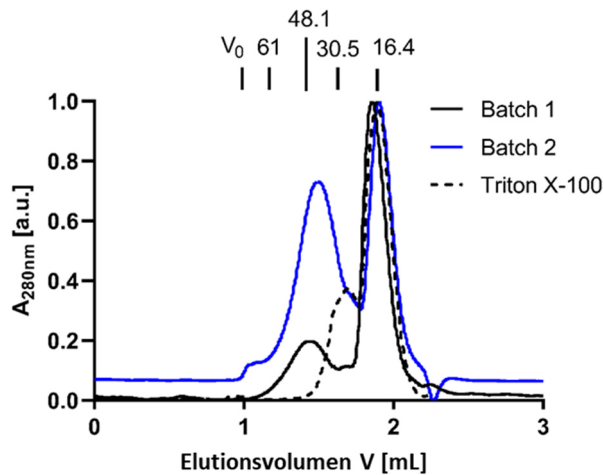
Auch wurde das SapA in Abhängigkeit der für den Ionisationsprozess genutzten Laserleistung näher untersucht. Im *soft mode* des IR-Lasers zeigten sich hierbei überraschenderweise deutliche Anhaftungen am SapA, die auf Grund einer Masse von ca. 720 Da aller Wahrscheinlichkeit nach auf Lipide zurückgeführt werden können. Dies legte die Vermutung nahe, dass sich im Zuge der SapA-Expression bzw. Isolierung bereits SapA-NPs mit *E. coli* Lipiden vorgeformt haben könnten.



**Abbildung 50: LILBID-MS Analyse von aus *E. coli* exprimiertem und aufgereinigtem SapA in Abhängigkeit der zur Ionisation genutzten Laserleistung.** Die Daten implizieren, dass SapA nicht nur als Monomer vorliegt, sondern Oligomere bis hin zum Pentamer ausbildet. Der Dimer stellt allerdings die dominanteste Spezies dar. Im *soft mode* des Lasers zeigen sich deutliche Anhaftungen am SapA, die auf Lipide zurückzuführen sind. Mit großer Wahrscheinlichkeit hat die Anwesenheit von Lipiden bereits eine Ausbildung von ND-artigen NPs, die bis zu fünf SapA-Moleküle umfassen, zur Folge.

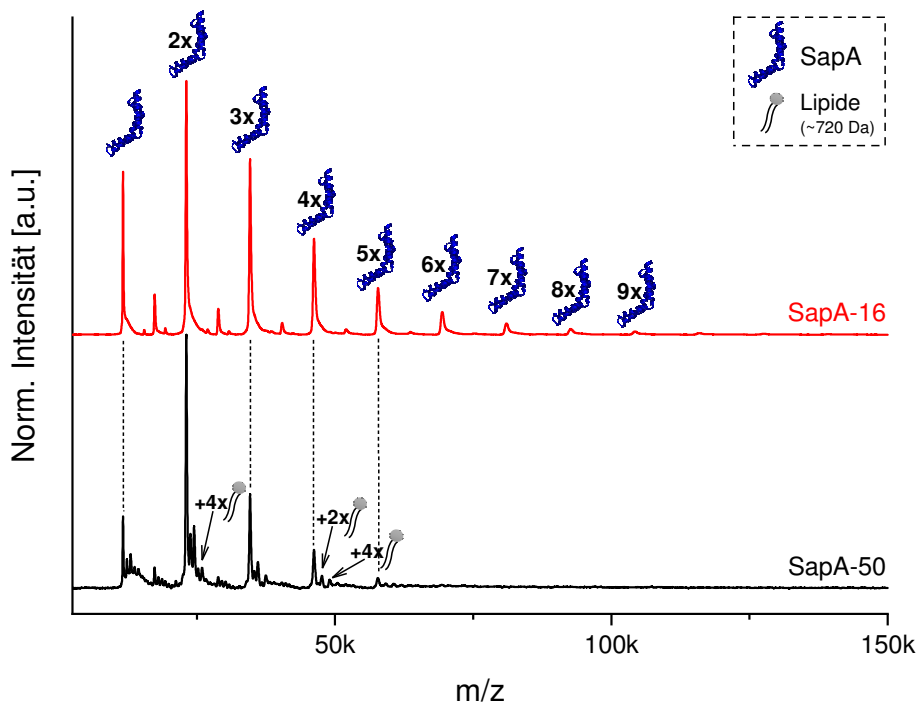
Auf Grund der beobachteten Lipid-Anhaftungen wurde das SapA aus *E. coli* zusätzlich via SEC aufgereinigt und analysiert. Hierbei konnten zwei Fraktionen erhalten werden, eine bei etwa 50 kDa (im Folgenden als SapA-50 bezeichnet) sowie eine bei ca. 16 kDa (SapA-16). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass sich im Zuge der SapA-Isolierung bereits NPs in Verbindung mit

*E. coli*-Lipiden vorgeformt haben könnten. Abbildung 51 zeigt die entsprechenden SEC-Profile zweier Batches (schwarz und blau) von mittels *E. coli* exprimiertem und isoliertem SapA. Zudem zeigte sich, dass durch den Einsatz von Triton X-100 während des Aufreinigungsprozesses die spontane Ausbildung von größeren Saliproartikeln unterdrückt werden konnte.



**Abbildung 51: Vergleich der SEC-Profile von in *E. coli* exprimiertem und isoliertem SapA.** Sowohl Batch 1 als auch Batch 2 lassen zwei unterschiedliche Fraktionen erkennen, die darauf schließen lassen, dass sich im Zuge der Expression und Isolierung des SapA teilweise bereits größere Saliproartikel vorformen. Eine Aufreinigung in Gegenwart von Triton X-100 verringert die spontane Ausbildung größerer Saliproartikel.

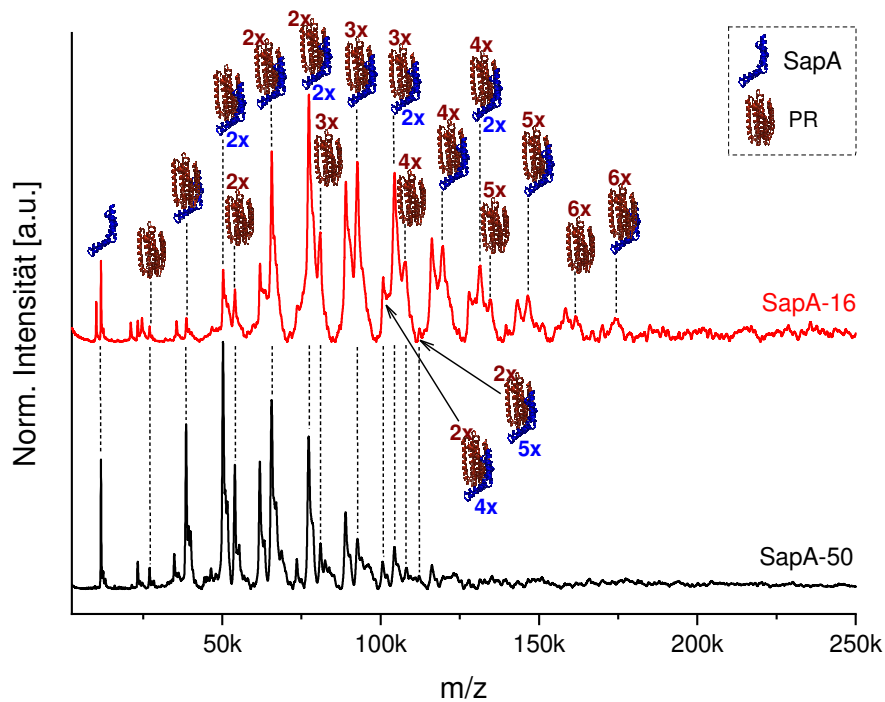
Eine LILBID-MS-Analyse der beiden via SEC erhaltenen SapA-Fraktionen zeigte, dass die Fraktion des SapA-16 Oligomere bis hin zum Nonamer aufweist und, entgegen den Erwartungen, in Lösung nicht rein als Monomer vorzuliegen scheint (siehe Abb. 52). Die SapA-50 Fraktion wiederum zeigt lediglich Oligomere bis hin zum Pentamer, analog den ersten Messungen. In beiden Spektren der SapA-Fraktionen zeigt sich zudem erneut ein prominenter Dimer und eine abklingende Verteilung der höheren Oligomere. Während in der SapA-16-Fraktion keine Lipid-Anhaftungen detektiert werden konnten, zeigten sich im Fall der Oligomeren SEC-Fraktion erneut die zuvor beobachteten Lipid-Anhaftungen an den jeweiligen Oligomerspezies des SapA. Dies unterstützt ebenfalls die Annahme, dass sich im Zuge der SapA Isolierung aus *E. coli* bereits teilweise SapA-NPs gebildet haben. Womöglich sind diese NPs zudem ebenfalls verhältnismäßig klein und umfassen nur wenige SapA-Moleküle. Dies würde wiederum erklären, weshalb lediglich Oligomere bis hin zum Pentamer im Fall des SapA-50 detektiert werden konnten.



**Abbildung 52: LILBID-MS Spektren der mittels SEC separierten SapA-Fractionen.** In beiden Spektren zeigt sich ein dominanter SapA Dimer und eine abklingende Verteilung höherer Oligomere. SapA-16 zeigt Oligomere bis hin zum Nonamer und ist frei von Lipid-Anhaftungen. SapA-50 hingegen scheint weniger Oligomere ausgebildet zu haben und weist nach wie vor Lipid-Anhaftungen auf, was auf vorgeformte SapA-NPs schließen lässt. Die gezeigten Spektren wurden im *soft mode* aufgenommen.

Um der Frage nachzugehen, ob die unterschiedlichen SapA-Fractionen einen Einfluss auf die Solubilisierung eines MPs bzw. die Ausbildung von MP/SapA-NPs besitzen und wenn ja, wie sich dies auswirkt, wurden weitere Experimente durchgeführt. Es wurden sowohl mit beiden Fractionen leere SapA-NPs vorgeformt und der CFPS zugegeben (Pre-Assemblierung) als auch SapA und Lipide (DOPG) in Form von Liposomen der CFPS separat zugeführt (Co-Assemblierung). Als zu solubilisierendes MP wurde PR synthetisiert.

In beiden CFPS-Modi zeigten sich unter Verwendung des SapA-50 keine PR-Oligomere, die über einen PR-Tetramer hinausgingen. Abbildung 53 zeigt beispielhaft ein Spektrum des in Gegenwart von SapA-50 CF im Co-Assemblierungsmodus synthetisierten bzw. solubilierten PR (schwarz). Bei PR Darstellung mittels SapA-16 konnten indes signifikante Signale von PR-Oligomeren bis hin zum Hexamer detektiert werden, was dem bekannten natürlichen Oligomierzustand des PR entspricht (siehe Abb. 53, rot).



**Abbildung 53: LILBID-MS Spektren von CF exprimiertem PR unter Verwendung der beiden mittels SEC isolierten SapA Fraktionen.** Die CFPS erfolgte im Co-Assemblierungsmodus unter Zugabe von DOPG-Liposomen (SapA/Liposom-Verhältnis 1:12). Bei Verwendung von SapA-16 können PR-Oligomere bis hin zum Hexamer detektiert werden. Vorgeformte SapA-NPs in der SapA-50 Fraktion sind in ihrer Größe limitiert, sodass keine höheren Oligomere des PR mehr solubilisiert werden können. Maximal ein PR-Tetramer kann bei Verwendung dieser Fraktion detektiert werden.

In den Spektren kann darüber hinaus eine Verteilung von PR Oligomeren mit mehreren gebundenen SapA-Partikeln erkannt werden. Für den PR-Dimer konnten beispielsweise Signale zugeordnet werden, die diesem mit bis zu fünf anhaftenden SapA-Molekülen entsprechen. Dies deutet darauf hin, dass bei der Ausbildung von PR-SapA-NPs bis zu fünf Saposine beteiligt sein könnten, bzw. fünf SapA-Moleküle benötigt werden, um eine ausreichend große Lipiddoppelschicht zur Solubilisierung von PR-Penta- und -Hexameren aufzuspannen. Für eine ausreichend hohe spektrale Auflösung war es allerdings nötig im *harsh mode* des IR-Lasers zu messen. Aufgrund der damit einhergehenden Dissoziation der PR-SapA-NPs war es letztlich nicht mehr möglich zu ermitteln, wie viele SapA-Moleküle tatsächlich bei der Solubilisierung eines PR-Hexamers involviert sind. Berücksichtigt man jedoch die Beobachtung, dass im Fall des SapA-50 maximal ein SapA-Pentamer detektiert werden konnte und unter Verwendung dieser Fraktion bei der PR Darstellung lediglich ein PR-Tetramer detektiert wurde, so muss man in Betracht ziehen, dass womöglich SapA-NPs, die mehr als fünf Saposine umfassen, bei der Solubilisierung eines PR-Hexamers involviert sein

könnten. Hieraus lässt sich wiederum folgern, dass für eine optimale Darstellung bzw. Solubilisierung von entsprechend großen MPs oder MP-Oligomeren ausreichend SapA zur Verfügung gestellt werden muss. Dies ist auch insofern schlüssig, da bekannt ist, dass Saposine-NPs sich der Größe des Zielproteins anpassen und sich je nach Zielprotein mehr oder weniger Saposine um dieses anordnen können.

Auch ist es denkbar, dass im Fall SapA-NPs mit *E. coli* Lipiden schlicht zu wenig Lipide vorhanden sind, bzw. ein ungünstiges Saposin/Lipid-Verhältnis vorherrscht, sodass sich nicht ausreichend große SapA-NPs ausbilden können, die es wiederum ermöglichen höhere PR-Oligomerspezies zu solubilisieren. Allerdings muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass die Assemblierung von Salipropartikeln lipidabhängig ist und auch dies für die beobachtbaren Unterschiede zwischen den beiden Fraktionen bzw. für deren Solubilisierungsverhalten eine Rolle spielen könnte.

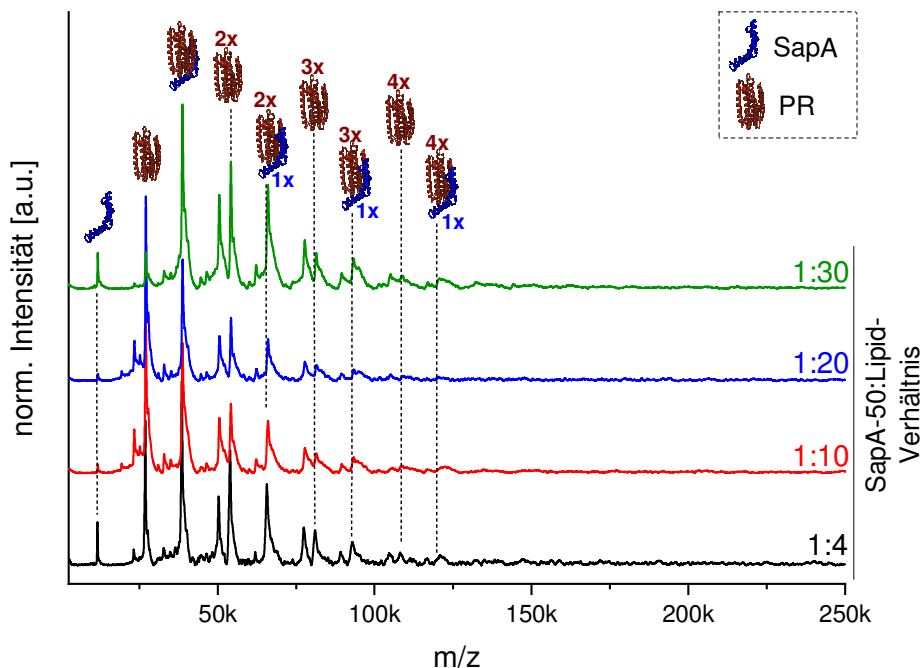
Als Ergebnis der LILBID-MS Analysen des SapA und der PR-SapA-NPs bleibt an dieser Stelle zunächst festzuhalten, dass für die Ausbildung von definierten Protein/Salipro-Partikeln nur die SapA-16 Fraktion genutzt werden sollte, da SapA-50 mit *E. coli*-Lipiden vorgeformte SapA-NPs auszubilden scheint. Diese besitzen vermutlich nicht die Größe und Flexibilität für eine optimale co-translationale Oligomerisierung. Durch Zugabe von lipidfreiem SapA-16 wiederum können sich bei Zugabe, bzw. durch zur Verfügung gestellte Liposome, ausreichend große NPs ausbilden, die es auch vermögen, größere Proteinkomplexe oder Oligomere, wie das Hexamer des PR, zu solubilisieren. Zudem bleibt festzuhalten, dass die aufgenommenen Spektren ein Beleg dafür sind, wie gut sich LILBID-MS eignet, um CFPS synthetisierte und mit SapA solubilierte MPs zu untersuchen. Eine Besonderheit, die ebenfalls erwähnt werden muss, stellt die Verwendung von DOPG-Lipiden bei der SapA-NP Darstellung dar. Unter Kapitel 3.5 wurde in Bezug auf NDs darauf eingegangen, dass auch bei LILBID-MS die Art der eingesetzten Lipide eine Rolle für die Spektrenqualität spielt und sich nicht alle Lipide gleichermaßen zur Darstellung von Proteinen in z.B. MSP-NDs eignen. Es wurde gezeigt, dass im Zuge des Ionisierungsprozesses grundsätzlich schlechter abzustreifende Lipide, zu denen auch DOPG zählt, trotz hoher Laserleistung zum Teil massive Lipid-Cluster-Anhaftung am MSP zur Folge haben, was zu Problemen bei der Analyse von Proteinen führen kann. Durch die Flexibilität der Saposine hinsichtlich der Größe der Lipiddoppelschicht, die ausgebildet wird, und da hierbei zudem weitaus weniger Lipide involviert sind im Vergleich zu NDs mit MSPs,

entfällt dieses Problem. Die vorliegenden Spektren zeigen auch bei Verwendung von DOPG-Lipiden keine unerwünschten Lipid-Cluster. Somit eignet sich das MM-System der SapA-NPs auch für eine LILBID-MS Analyse in Verbindung mit eigentlich unliebsameren Lipiden und stellt folglich eine hervorragende Alternative zu MSP-NDs dar.

### 6.2.2 Effekt des SapA/Lipid-Verhältnisses auf die Ausbildung von SapA-NPs

Für optimal vorgeformte leere NDs ist ein korrektes MSP/Lipid-Verhältnis ausschlaggebend.<sup>190</sup> Um zu untersuchen, ob dies womöglich auch im Falle der SapA-NPs eine Rolle spielt, wurde PR weiterhin mittels CF unter Verwendung von vorgeformten SapA-NPs synthetisiert und untersucht. Die Darstellung der vorgeformten SapA-NPs erfolgte hierbei sowohl unter Verwendung von SEC-aufgereinigtem bzw. isoliertem SapA-16 als auch unter Verwendung von SapA-50 und unter Variation des SapA/Lipid-Verhältnisses.

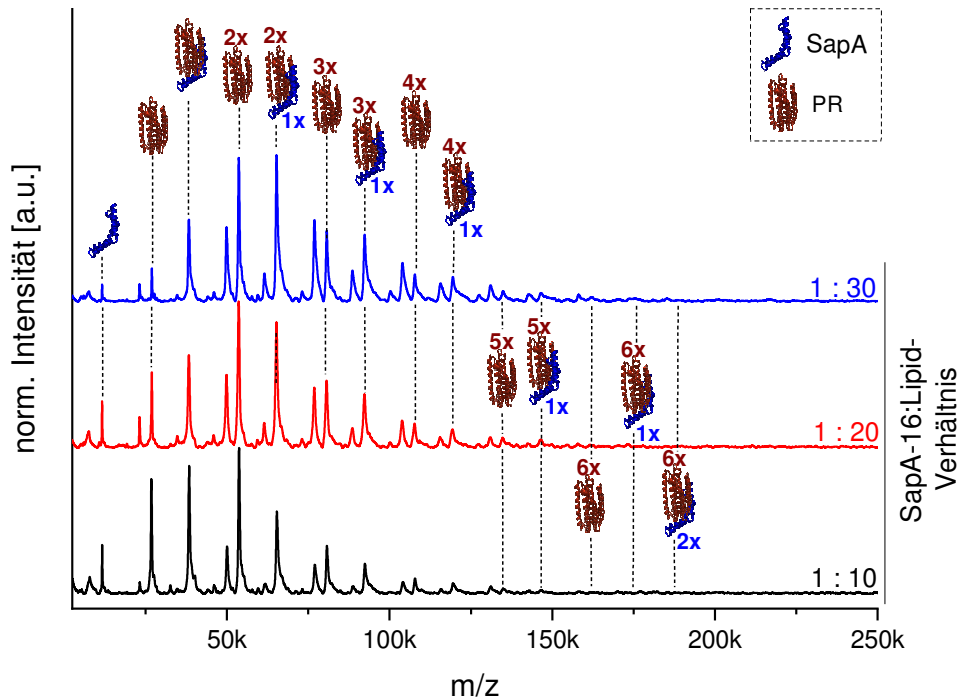
Mit vorgeformten SapA-NPs auf Basis von SapA-50 konnten bei steigender Lipid-Konzentration keine höheren PR-Oligomere in den LILBID-MS Spektren ermittelt werden. Analog zu den vorangegangenen Experimenten stellte der Tetramer des PRs die höchste detektierbare Oligomerspezies dar (siehe Abb. 54).



**Abbildung 54:** LILBID-MS Spektren von CF-synthetisiertem PR mit bei unterschiedlichen Lipid-Konzentrationen pre-assemblierten SapA-NPs auf Basis der SapA-50 SEC-Fraktion. Bei Verwendung von SapA-50 kann maximal ein PR-Tetramer detektiert werden. Ein signifikanter Einfluss der zur Pre-Assemblierung der NPs eingesetzten Lipid-Menge ist nicht zu beobachten.



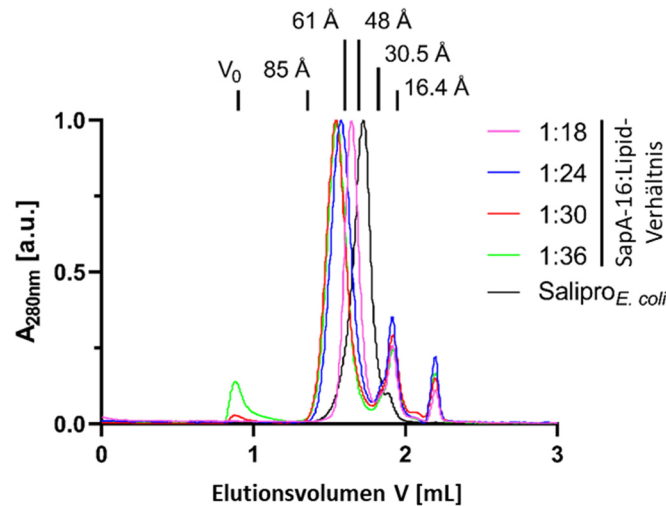
Eine Pre-Assemblierung von SapA-NPs mittels SapA-16 hingegen ermöglichte es auch PR Oligomere bis hin zum Hexamer zu solubilisieren und zu detektieren (siehe Abb. 55). Dabei scheint sich eine höhere Lipid-Konzentration letztlich etwas positiv auf die Solubilisierung auszuwirken. Allerdings sind auch hier die Signale höherer PR-Oligomere nicht signifikant vertreten.



**Abbildung 55: LILBID-MS Spektren von CF-synthetisiertem PR mit bei unterschiedlichen Lipid-Konzentrationen pre-assemblierten SapA-NPs auf Basis der SapA-16 SEC-Fraktion.** Bei Verwendung von SapA-16 können Signale eines PR-Hexamers detektiert werden. Eine Erhöhung der Lipid-Konzentration hat nur einen geringen Einfluss bzgl. der Solubilisierung höherer PR-Oligomere zur Folge. Mehr zur Verfügung gestellte Lipide scheinen sich jedoch positiv auszuwirken.

Es wäre denkbar, dass sich im Zuge der Pre-Assemblierung in Abwesenheit eines MPs auch im Fall des SapA-16 NPs vorformen, deren Größe limitiert ist, analog den NPs aus SapA-50.

Diese Vermutung bestätigten auch SEC-Analysen von SapA-16 vorgeformten NPs (siehe Abb. 56). Es zeigte sich, dass bei Pre-Assemblierung mit steigendem SapA-16/Lipid-Verhältnis die Größe der vorgeformten Partikel nur geringfügig zunimmt. Zudem unterscheiden sie sich in ihrer Größe auch nur geringfügig von NPs der SapA-50 Fraktion.



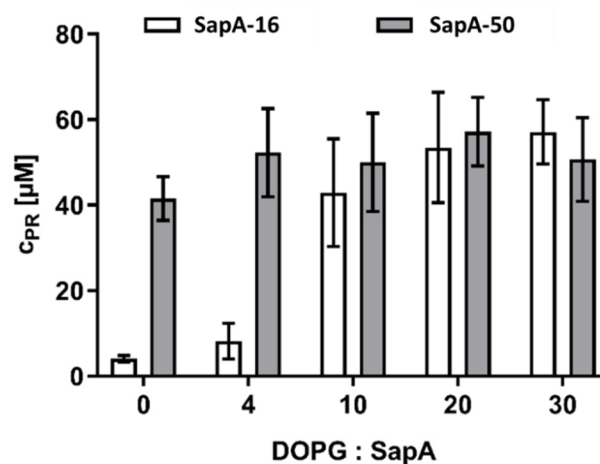
**Abbildung 56: Vergleich der SEC-Profile von SapA-50 NPs mit pre-assemblierten SapA-16 NPs unter Variation des SapA-16/Lipid-Verhältnisses.** Verglichen mit den SapA-50 NPs (=Salipro<sub>E. coli</sub>) nimmt die Größe der SapA-16 NPs bei mehr zur Pre-Assemblierung zur Verfügung gestelltem Lipid nur minimal zu.

Die Experimente legen nahe, dass bei einer erhöhten Lipid-Konzentration die Wahrscheinlichkeit höher ist, sodass sich auch größere SapA-NPs vorformen. Die etwas bessere Solubilisierung höherer PR-Oligomere im Fall des SapA-16 könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Mittel der Anteil an ausreichend großen, vorgeformten SapA-NPs höher ausfällt, als dies bei SapA-50 der Fall ist. Dies erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit, dass auch höhere PR-Oligomere solubilisiert werden können und erklärt die Unterschiede zwischen den Spektren bei Verwendung der jeweiligen SapA-Fraktion. Dass keine Auswirkung hinsichtlich einer erhöhten Lipid-Konzentration in Bezug auf SapA-50 mittels LILBID-MS detektiert werden konnte, legt zudem nahe, dass sich in bereits vorgeformte NPs keine weiteren Lipide nachträglich einbauen und sich der Größe eines MP-Komplexes folglich nicht mehr so gut anpassen können.

Die Daten legen weiterhin nahe, dass bei Pre-Assemblierung von SapA-NPs die MP-Insertion in einem ähnlich kooperativen Mechanismus wie bei Nanodiscs abzulaufen scheint.<sup>15</sup> Aufgrund der kleineren Partikelgröße sind jedoch multiple Insertionen und damit eine Oligomerisierung unwahrscheinlicher. Der grundsätzliche Vorteil der Flexibilität der SapA-NPs bezüglich der Größe der sich ausbildenden Lipid-Doppelschicht scheint in Abwesenheit von MPs bzw. im Pre-Assemblierungsmodus der CFPS folglich ein limitierender Faktor zu sein.

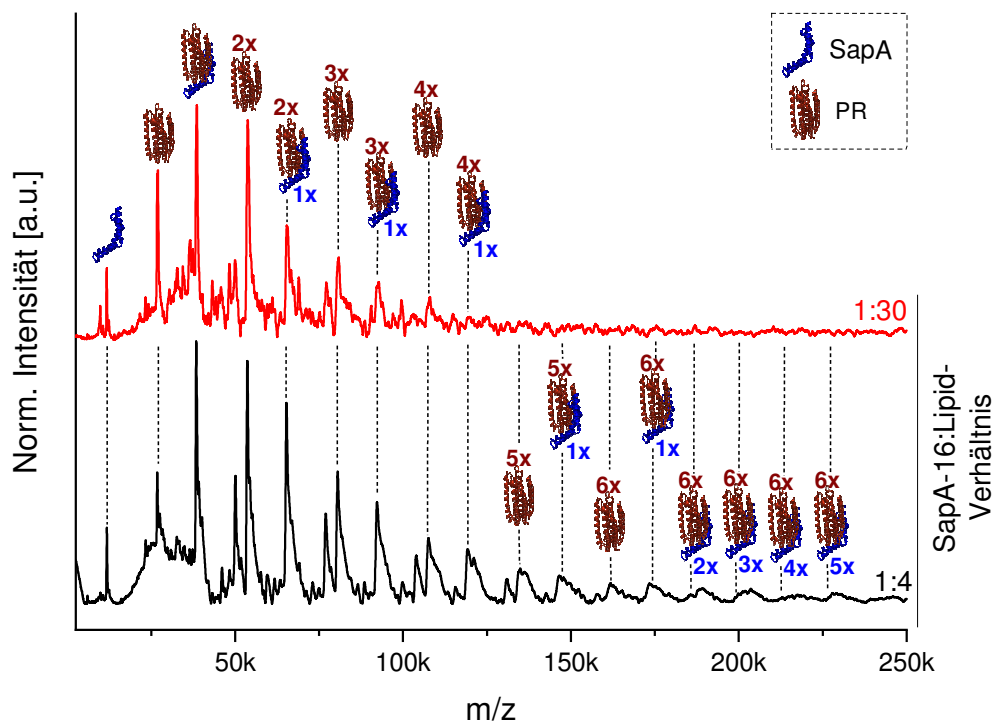
Im Weiteren wurde untersucht, ob und wie sich die Lipid-Konzentration im Co-Assemblierungsmodus auswirkt. Im Rahmen dessen wurden zunächst Solubilisierungsexperimente durchgeführt (siehe Abb. 57). Hierbei zeigte sich, dass PR unter Verwendung von SapA-50 bereits ohne weitere Zugabe von Lipiden solubilisiert wurde. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass SapA-50, wie vermutet, bereits vorgeformte SapA-NPs enthält. Die weitere Zugabe von Lipiden zu SapA-50 zeigte auch in diesem Fall keinen signifikanten Einfluss auf den Solubilisierungsgrad des PRs im Zuge der CFPS. Auch in LILBID-MS Spektren zeigte sich, analog den vorangegangenen Experimenten, im Co-Assemblierungsmodus kein Effekt bei Variation der Lipid-Konzentration unter Verwendung von SapA-50 (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu lag nahezu kein PR in Lösung vor, welches in Gegenwart von SapA-16 ohne zusätzliche Lipide synthetisiert wurde. Erst durch Zugabe von DOPG bis hin zu einem SapA:DOPG-Verhältnis von 1:30 konnte auch durch SapA-16 eine Solubilisierung auf Niveau des SapA-50 erreicht werden. Neben den LILBID-MS-Spektren unterstützt dies ebenfalls die Annahme, dass SapA-16 Lipid-frei in dieser Fraktion vorliegt und sich daher keine vorgeformten NPs ausgebildet haben bzw. ausbilden konnten und dies erst im Zuge der CFPS erfolgt.



**Abbildung 57: Solubilisierung von CF-synthetisiertem PR im Co-Assemblierungsmodus in Anwesenheit der jeweiligen SapA-Fraktion.** Während SapA-50 bereits ohne Zugabe von Lipiden PR in signifikantem Maße solubilisieren konnte, zeigt sich im Fall des SapA-16 ein mit zunehmender Lipid-Konzentration erhöhter Solubilisierungsgrad ( $C_{PR}$ ).

Festzuhalten bleibt auf Basis der Solubilisierungsexperimente, dass eine höhere Lipid-Konzentration die Solubilisierungseffizienz im Co-Assemblierungsmodus der CFPS steigert. In LILBID-MS Analysen zeigte sich bei Verwendung von SapA-16 im Gegensatz zu SapA-50 eine Tendenz hinsichtlich eines optimalen SapA/Lipid-Verhältnisses. Auf Basis der Solubilisierungsexperimente wurde erwartet, dass eine erhöhte Lipid-Konzentration analog womöglich auch eine effizientere Insertion von höheren PR-Oligomeren in SapA-NPs begünstigen könnte. Dem entgegen fällt die beobachtbare Tendenz allerdings gegenläufig aus. So zeigen Spektren bei hoher Lipid-Konzentration lediglich PR-Oligomere bis hin zum Tetramer (siehe Abb. 58). Eine geringe Lipid-Konzentration in der CFPS sorgte hingegen dafür, dass auch PR-Hexamere detektiert werden konnten. Zudem war es hierbei möglich Signale zu detektieren, die einem PR-Hexamer mit bis zu fünf gebundenen SapA entsprechen.



**Abbildung 58:** Vergleich unterschiedlicher SapA/Lipid-Verhältnisse auf die Oligomerisierung von co-translational solubiliertem PR. Die Daten deuten darauf hin, dass der Einsatz einer geringeren Lipidmenge eine Solubilisierung höherer PR-Oligomere begünstigt oder zumindest eine bessere spektrale Auflösung resultiert.

Betrachtet man den CFPS Co-Assemblierungsmodus, so sind drei Möglichkeiten denkbar wie sich die MP-SapA-NPs ausbilden könnten:

- 1.) Das MP inseriert ins bereitgestellte Liposom und oligomerisiert entweder co-translational oder nach der Expression der Monomere. Die Mono- und Oligomere werden dann nachträglich von den freien SapA-Molekülen aus der Liposom-Membran extrahiert und die fertigen Monomere sitzen dann in den Nanopartikeln.
- 2.) Das MP inseriert ins bereitgestellte Liposom und wird währenddessen von SapA solubilisiert.
- 3.) Die SapA-Moleküle assemblieren sehr schnell mit den Lipiden im CF-Reaktionsmix zu Nanopartikeln, in die anschließend die ribosomal gebildeten MPs inserieren.

Zwar kann anhand der Daten nicht postuliert werden nach welchem Mechanismus genau die MP-SapA-Partikelbildung erfolgt, allerdings legen die durchgeführten LILBID-MS Experimente nahe, dass es für den Co-Assemblierungsmodus sinnvoller ist, geringere Mengen Lipid einzusetzen. Dies wiederum führt zu der Annahme, dass weniger Lipid zu weniger NPs führt, wodurch wiederum mehr PR in weniger Partikel inseriert wird. Gleichzeitig stehen nur wenig Liposome zu Verfügung, in die das PR ausweichen könnte. Folglich resultieren höhere Oligomere des PRs in den SapA-NPs. Wird im Umkehrschluss zu viel Lipid eingesetzt, ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass sich PR-Hexamere in definierten Partikeln finden. Eine PR-Insertion in die Liposomen bei gleichzeitiger Solubilisierung durch SapA-NPs könnte allerdings auch an sich die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von undefinierten Partikeln fördern.

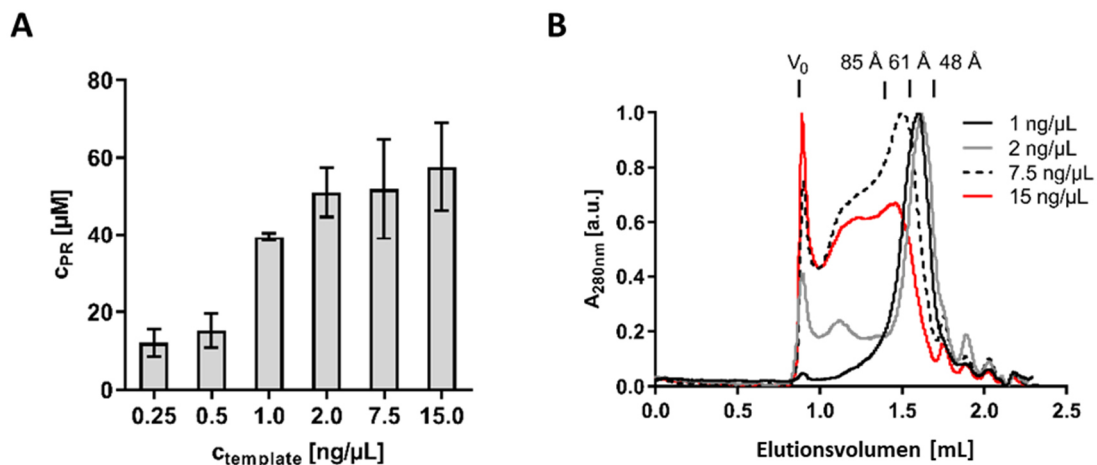
Denkbar wäre ebenfalls, dass in Folge höherer Lipidmengen eine schlechtere Auflösung der LILBID-MS-Spektren resultiert, was sich besonders im höheren Massenbereich abzeichnen würde. Allerdings ist dies beispielsweise bei Nanodiscs nicht der Fall, obgleich diese wesentlich mehr Lipide tragen. Folgedessen ist dies auch im Fall der SapA-NPs unwahrscheinlicher.

### 6.2.3 Einfluss der Template-Konzentration auf die Qualität von PR/SapA-NPs

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich der Co-Assemblierungsmodus unter Verwendung von SapA-16 am besten eignet, um PR-SapA-NPs zellfrei darzustellen und mittels LILBID-MS zu untersuchen. Auf Basis dessen wurde ebenfalls der Einfluss der Template-Konzentration hinsichtlich der Qualität der co-assemblierten PR-SapA-NPs näher untersucht. Hierzu wurde die PR-Expression in der CF-Reaktion durch

Erhöhung der PR-Template Konzentration (im Bereich von 0,25 ng/μL bis 15 ng/μL) bei einem festgelegten SapA/Lipid-Verhältnis modifiziert.

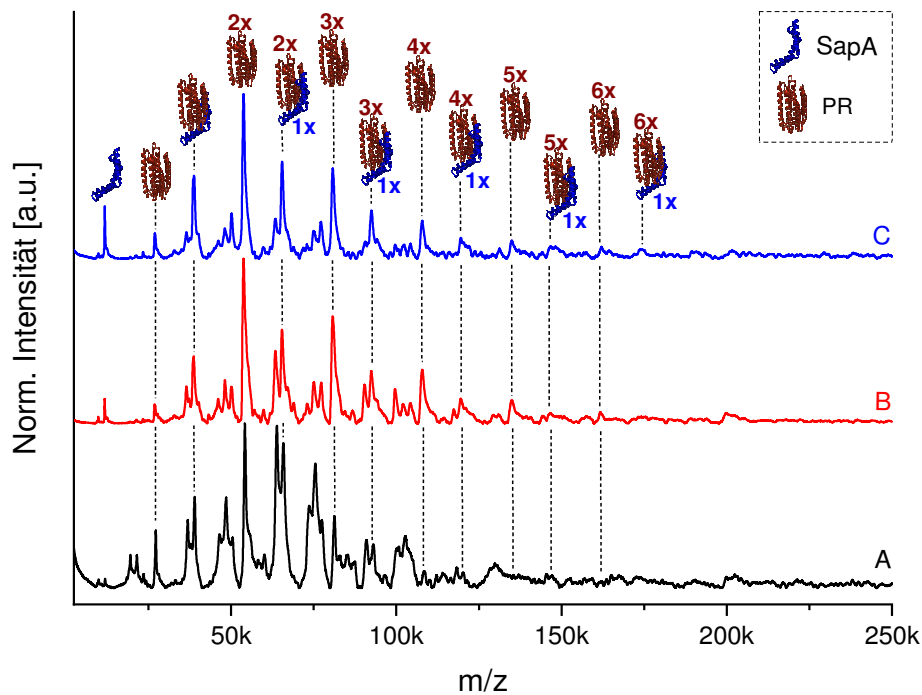
Eine Sättigung an solubilisiertem PR konnte bereits bei einer DNA-Template Konzentration von 2 ng/μL erreicht werden (siehe Abb. 59, A). Eine weitere Erhöhung der Template-Konzentration zeigte nur noch geringe Auswirkungen auf die PR-Solubilisierung. Eine Analyse der CF dargestellten und aufgereinigten PR/SapA-NPs mittels SEC zeigte einen deutlichen Unterschied hinsichtlich der Homogenität der Proben (siehe Abb. 59, B). Während PR/SapA-Partikel aus CF Reaktionen, die 1 ng/μL Template enthielten, homogen waren, resultierten aus einer höheren Template-Konzentration und folglich einer höheren PR-Syntheseeffizienz Partikel mit größerem Durchmesser und heterogener Verteilung.



**Abbildung 59: Modulation der Qualität von PR/SapA-NPs im CF Co-Assemblierungsmodus. (A)** PR-Solubilisierungsgrad ( $C_{\text{PR}}$ ) in Abhängigkeit von der PR-Template-Konzentration. **(B)** SEC-Analyse der unter Variation der Template-Konzentration CF-synthetisierten und aufgereinigten PR/SapA-NPs. Eine höhere Template-Konzentration führt zu größeren, heterogener verteilten NPs.

Entsprechend der Template-Konzentration dargestellte PR-SapA-NPs wurden ebenfalls mittels LILBID-MS untersucht. Abbildung 60 zeigt drei Spektren mit unterschiedlich hoher Template-Konzentration bei konstantem SapA/Lipid-Verhältnis. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Template-Konzentration höhere Oligomere bis hin zum PR Hexamer resultieren bzw. detektiert werden können.

Aus mehr Template resultiert mehr RNA, was wiederum bedeutet, dass mehr Protein gleichzeitig synthetisiert wird und in die NPs inseriert. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass ein kooperativer Oligomersierungsprozess abzulaufen scheint, wie es bereits von Peetz & Henrich *et al.*<sup>15</sup> für die Protein-Insertion in NDs beobachtet wurde.

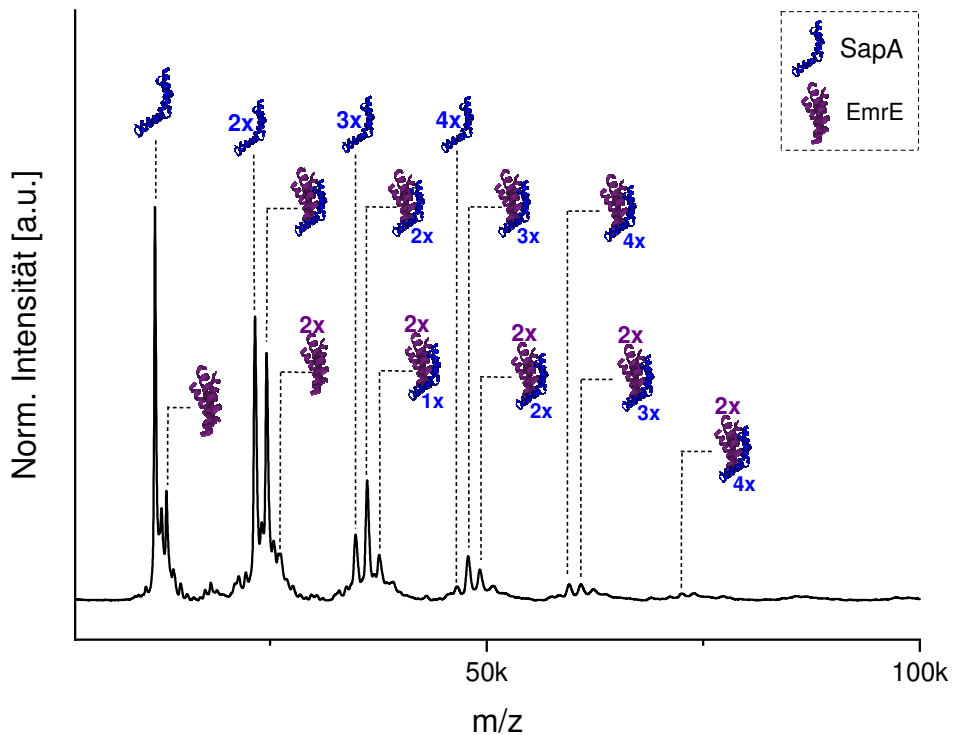


**Abbildung 60: LILBID-MS Analyse von exprimiertem PR bei unterschiedlichen PR-Template-Konzentrationen.** Template-Konzentrationen: Probe A: 1 ng/ $\mu$ L; Probe B: 7,5 ng/ $\mu$ L; Probe C: 15 ng/ $\mu$ L. Die Daten deuten darauf hin, dass eine höhere Template-Konzentration zu höheren beobachtbaren Oligomierzuständen des PR führt, was einen kooperativen Oligomerisierungsprozess nahelegt.

#### 6.2.4 Anwendung des optimierten Präparationsprotokolls auf das Protein EmrE

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass lediglich Lipid-freies SapA bei der Darstellung von MP-SapA-NPs verwendet werden sollte. Zudem wurde gezeigt, dass sich der Co-Assemblierungsmodus zur CF-Synthese und Analyse von MPs mittels LILBID-MS besser zu eignen scheint. Im Zuge dessen wurde ebenfalls dargelegt, welchen Einfluss das hierbei genutzte SapA/Lipid-Verhältnis auf die Ausbildung von MP-SapA-NP haben kann.

Um diese Erkenntnisse zu verifizieren, wurde, auf Basis der vorangegangenen Experimente, ebenfalls EmrE CF mittels SapA dargestellt und untersucht. Abbildung 61 zeigt ein entsprechendes Spektrum des EmrE.



**Abbildung 61: LILBID-MS Spektrum des EmrE in SapA-NPs, synthetisiert mittels CFPS im Co-Assemblierungsmodus.** EmrE konnte erfolgreich in seinem natürlichen Dimeren Oligomerzustand dargestellt und in SapA-NPs solubilisiert werden.

Das Spektrum zeigt sowohl Signale von freiem SapA bis hin zum Tetramer als auch Signale des EmrE bis hin zum Dimer, was dem bekannten natürlichen Oligomerzustand entspricht.<sup>191,192</sup> Dies belegt, dass die gewonnenen Erkenntnisse erfolgreich genutzt werden konnten, um auch dieses MP mittels CF zu synthetisieren, durch SapA-NPs zu solubilisieren und via LILBID-MS zu analysieren.

Darüber hinaus kann eine Verteilung von EmrE Monomer und Dimer mit bis zu 4 gebundenen SapA-Molekülen erkannt werden.



### 6.3 Untersuchungen der Histidinkinasen SpaK und NisK

Die ersten Berichte zu Lantibiotika mit Nisin als einem der bekanntesten Vertreter dieser Stoffgruppe reichen bis ins Jahr 1928 zurück.<sup>193</sup> Seitdem verging fast ein Jahrhundert, in dem an der Biosynthese, der Funktion und Wirkungsweise der Lantibiotika geforscht wurde. Dennoch sind die Mechanismen, mit denen Bakterienzellen es schaffen die Anwesenheit von Lantibiotika zu erkennen, noch weitestgehend ungeklärt. Bis heute konnten auch keine strukturellen Informationen für einzelne Lantibiotika-sensitive Histidinkinasen (Volllänge) gewonnen werden, da sich die Isolation eines (funktionalen) MPs üblicherweise immer wieder als schwierig und limitierender Faktor erwies.

Um dieses Problem zu lösen, galt es Konzepte zu erarbeiten, um die Histidinkinase SpaK unter Beibehaltung ihrer Funktion aufzureinigen und untersuchen zu können. LILBID-MS Analysen sollten hierbei der massenspektrometrischen Kontrolle, bzw. des massenspektrometrischen Nachweises der erfolgreichen Isolierung des SpaK als Zielprotein dienen. Zudem sollten Bindungsstudien mit Subtilin und weiteren Lantibiotika durchgeführt werden, um erstmals den massenspektrometrischen Nachweis einer spezifischen Interaktion des Subtilins mit SpaK zu liefern.

Ebenfalls sollte LILBID-MS dazu genutzt werden einen Nachweis der Interaktion von NisK mit seinem Lantibiotikum Nisin zu erbringen.

NisK und SpaK besitzen beide eine Dimerisierungsdomäne.<sup>20</sup> Auf Grund dessen ist davon auszugehen, dass diese einen Dimer ausbilden. Jedoch ist dies nicht gleichbedeutend damit, dass es sich dabei auch zwingend um den vorherrschenden, biologisch aktiven Oligomerezustand handeln muss. Von einem massenspektrometrischen Nachweis eines Dimers wurde zudem bislang ebenfalls nicht berichtet. Daher sollte LILBID-MS ebenfalls zur Analyse des Oligomerezustandes von NisK und SpaK herangezogen werden.

Wie unter Kapitel 4.3 erläutert, konnte ebenfalls bis heute noch kein direkter Bindungsnachweis des Immunitätsproteins Spal mit Subtilin erbracht werden. LILBID-MS sollte daher ebenfalls dazu genutzt werden, erstmals eine direkte Wechselwirkung von Spal und Subtilin aufzuzeigen.

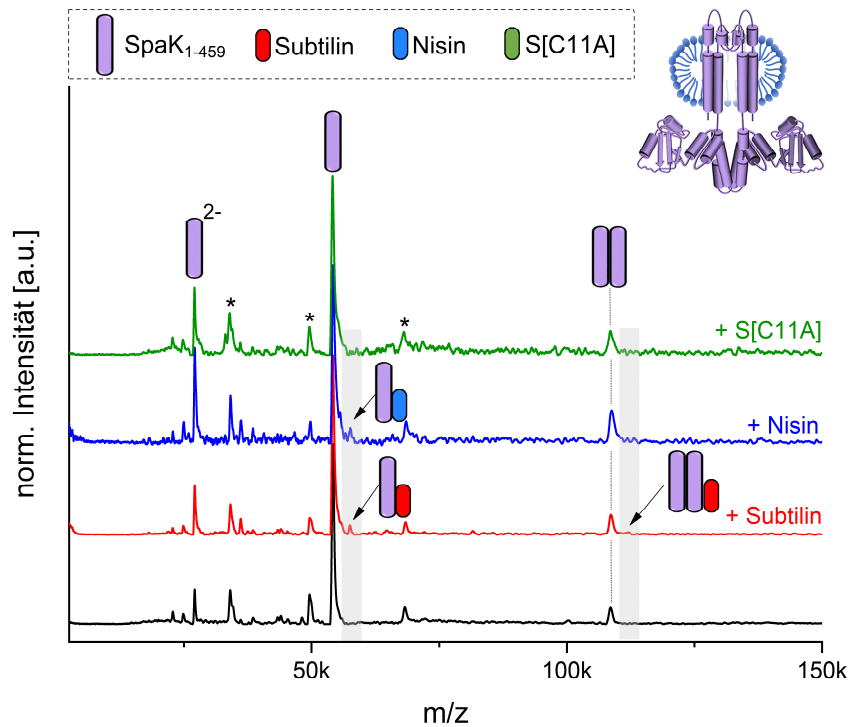
### 6.3.1 Analysen des mit Detergens solubilisierten SpaK

In ersten Experimenten wurde versucht SpaK als Vollängen-Protein (SpaK<sub>1-459</sub>) auf konventionellem Wege zu exprimieren und mit Hilfe eines Detergens (DDM) zu solubilisieren. Das so erhaltene SpaK wurde mit Hilfe eines Autophosphorylierungsassays auf dessen Aktivität hin untersucht sowie mit LILBID-MS analysiert.

Die Abbildung 62 zeigt exemplarisch ein LILBID-MS Spektrum des in Detergenz solubilisierten SpaK<sub>1-459</sub> (schwarz). Das Spektrum zeigt ein dominantes Signal, welches dem Monomer des SpaK<sub>1-459</sub> zugeordnet werden konnte und bestätigte somit eine erfolgreiche Isolierung und Solubilisierung mittels Detergens. Darüber hinaus zeigt das Spektrum ebenfalls ein Signal des SpaK<sub>1-459</sub>-Dimers und bestätigt somit ebenfalls die Annahme, dass die Histidinkinase einen Dimer ausbilden kann.

Um den Nachweis einer Bindung von Subtilin an SpaK zu erbringen, wurden weiterhin Lantibiotika-Inkubationsexperimente durchgeführt. Neben der Inkubation mit Subtilin wurde das SpaK<sub>1-459</sub> zusätzlich ebenfalls mit Nisin inkubiert. Nisin ist dem Subtilin in seiner Struktur sehr ähnlich, aktiviert jedoch spezifisch die Histidinkinase NisK aus *Lactococcus lactis* (siehe Kapitel 4.3). Bis dato durchgeführte Experimente legen nahe, dass Nisin zwar an SpaK binden, dieses jedoch nicht aktivieren kann.<sup>20,22</sup> Darüber hinaus wurde SpaK ebenfalls mit einer Subtilin Mutante (im Folgenden als S[C11A] bezeichnet) als Negativ-Kontrolle inkubiert.

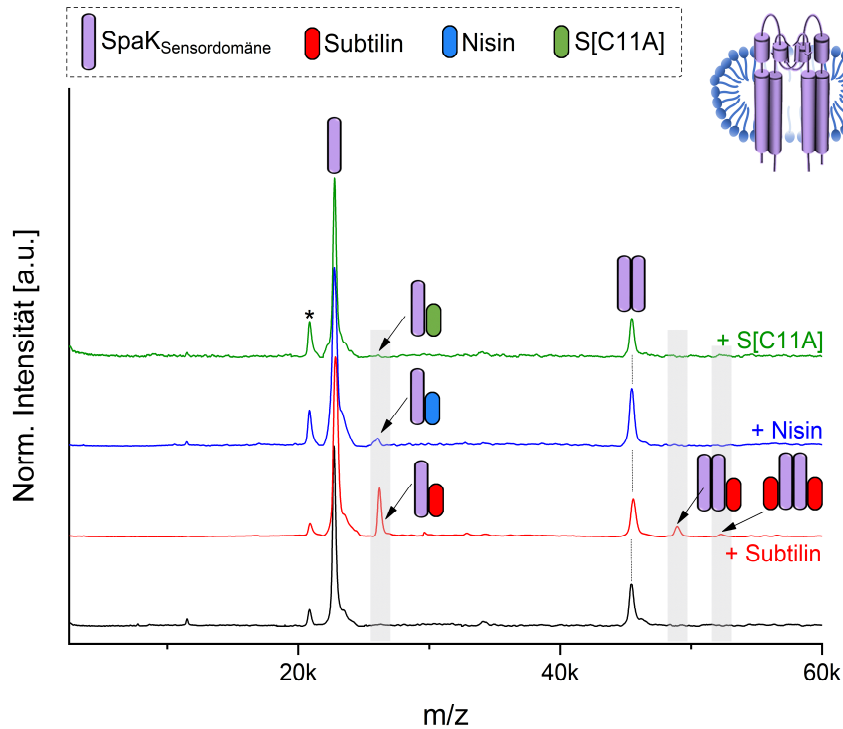
In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Subtilin Mutante S[C11A] keine nennenswerte Aktivität des SpaK induziert.<sup>20</sup> Man geht daher von keiner Bindung des S[C11A] an SpaK aus. Letzteres bestätigten auch die LILBID-MS Analysen. So führte eine Inkubation mit S[C11A] zu keiner detektierbaren Komplexbildung mit SpaK (siehe Abb. 62, grün). Hingegen zeigten sowohl die Spektren des mit Subtilin (Abb. 62, rot) als auch mit Nisin (Abb. 62, blau) inkubierten SpaK zwei (neue) Signale, die dem Monomer mit je einem gebundenen Subtilin bzw. Nisin zugeordnet werden konnten. Somit wurde erstmals der Nachweis einer direkten Bindung des SpaKs mit seinem Lantibiotikum erbracht. Weiterhin bestätigten die Experimente, dass auch Nisin grundsätzlich in der Lage ist an SpaK zu binden.



**Abbildung 62: LILBID-MS Spektren des SpaK<sub>1-459</sub> vor und nach Inkubation mit den Lantibiotika Subtilin, Nisin und der Subtilin Mutante S[C111A].** Sowohl nach Inkubation mit Subtilin (rot), als auch mit Nisin (blau) konnte ein schwaches Signal detektiert werden, welches eine SpaK-Lantibiotika-Komplexbildung bestätigt. Bei Inkubation mit S[C111A] (grün) konnte indes keine Komplex-Bildung detektiert werden. Alle Lantibiotika wurden in dreifachem Überschuss zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Die mit \* markierten Signale konnten nicht zugeordnet werden und lassen auf Verunreinigungen bzw. eine nicht perfekte Aufreinigung schließen.

Um einen detaillierteren Einblick in die Wechselwirkungsbeziehung des homodimeren SpaK sowie der SpaK/Subtilin-Interaktion zu erhalten und um die vorherigen Experimente und Erkenntnisse zu validieren, wurde neben der Vollängen Histidinkinase auch ein am C-Terminus verkürztes Konstrukt, das SpaK<sub>(1-176)</sub>, mittels LILBID-MS untersucht. Dieses Konstrukt umfasst rein die membranständige Domäne inklusive der Lantibiotikum-Sensordomäne. Zudem fehlt diesem Konstrukt die Dimerisierungsdomäne. Diese befindet sich in der abgeschnittenen cytoplasmatischen Domäne des SpaK.

Analog den Experimenten mit SpaK<sub>(1-459)</sub>, wurden auch für das SpaK<sub>(1-176)</sub> Inkubationsexperimente mit den drei Lantibiotika Subtilin, Nisin und S[C111A] durchgeführt. In Abbildung 63 sind die entsprechenden Spektren des SpaK<sub>(1-176)</sub> vor und nach Inkubation mit den Lantibiotika gezeigt.



**Abbildung 63: LILBID-MS Spektren der SpaK Sensordomäne (SpaK<sub>1-176</sub>) vor und nach Inkubation mit den Lantibiotika Subtilin, Nisin und der Subtilin Mutante S[C11A].** Sowohl nach Inkubation mit Subtilin (rot), als auch mit Nisin (blau) können Signale detektiert werden, welche eine SpaK-Lantibiotika-Komplexbildung bestätigen. Im Fall der Inkubation mit Nisin kann lediglich ein schwaches Signal eines SpaK-Monomers im Komplex mit dem Lantibiotikum erkannt werden. Bei Inkubation mit Subtilin fällt das Signal eines Komplexes aus SpaK Monomer mit einem Subtilin deutlich stärker aus. Zudem kann hierbei gar ein SpaK-Dimer mit zwei gebundenen Subtilin detektiert werden. Eine Inkubation mit S[C11A] (grün) hat indes keine Komplex-Bildung zur Folge. Alle Lantibiotika wurden in dreifachem Überschuss zugegeben. Die mit \* markierten Signale konnten nicht zugeordnet werden und lassen auf Verunreinigungen bzw. eine nicht perfekte Aufreinigung schließen.

Im Spektrum ohne Lantibiotika (Abb. 63, schwarz) zeigt sich, dass SpaK<sub>(1-176)</sub> auch ohne den cytoplasmatischen Teil, d.h. ohne die Dimerisierungsdomäne, einen Dimer ausbildet. Dies deutet darauf hin, dass die Dimerisierungsdomäne scheinbar nicht alleine für die Ausbildung des SpaK-Homodimers verantwortlich sein könnte, sondern ebenfalls die membranständige Domäne einen Anteil zur Dimerisierung beizutragen scheint.

Analog dem Volllängen-Protein konnte bei Inkubation mit S[C11A] (siehe Abb. 63, grün) kein Komplex detektiert werden, der auf eine Bindung schließen lässt. Bei Inkubation mit Nisin (Abb. 63, blau) konnte nur ein verhältnismäßig schwaches Signal detektiert werden, welches dem SpaK-Monomer mit einem gebundenen Nisin entspricht. Ein Komplex bestehend aus einem SpaK-Dimer mit einem gebundenen Nisin konnte nicht nachgewiesen werden.

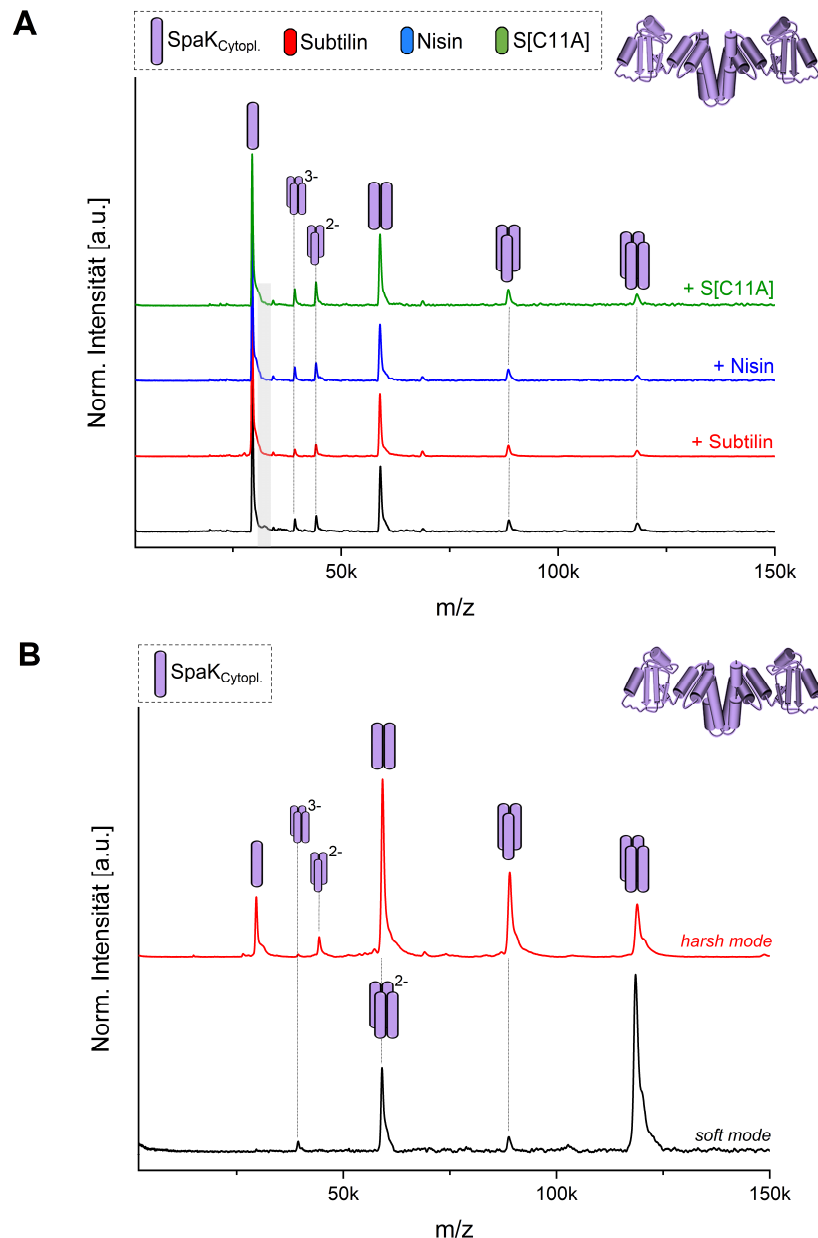
Die Inkubation mit Subtilin (Abb. 63, rot) hatte die signifikanteste Komplex-Bildung aller drei Lantibiotika zur Folge. Neben einem Komplex bestehend aus einem SpaK-Monomer an dem ein Subtilin bindet, konnte ebenfalls der SpaK-Dimer mit einem gebundenen Subtilin

detektiert werden. Interessanterweise konnte im Rahmen dieses Experiments auch ein schwaches Signal detektiert werden, welches einem Dimeren SpaK mit zwei gebundenen Subtilin zugeordnet werden konnte. Die Intensität dieses Signals fällt allerdings verhältnismäßig gering aus, was sterisch begründet sein könnte. So ist es denkbar, dass nach Binden eines Subtilin-Moleküls an einen Monomer des SpaK-Dimers die Bindestelle des zweiten Monomers abgeschirmt und weniger gut zugänglich ist. Daraus folgt wiederum eine deutlich schwächere Bindung eines zweiten Subtilins, welches im Zuge des Ionisierungsprozesses leichter vom stabileren SpaK-Dimer-Komplex mit einem Subtilin dissoziiert werden kann. Grundsätzlich scheint aber je Monomer des SpaK-Dimers ein Subtilin gebunden werden zu können. Dies und die Tatsache, dass kein SpaK-Monomer mit zwei gebundenen Subtilin-Molekülen detektiert werden konnte, könnte darauf hindeuten, dass für eine Subtilin-induzierte Aktivierung der Histidinkinase sehr wahrscheinlich das Binden eines Subtilin Moleküls ausreichend sein könnte. An welcher der beiden potentiellen Bindestellen im Homodimer Subtilin bindet, kann allerdings auf Grundlage dieses Experiments und der vorliegenden Daten nicht ermittelt werden. Möglich ist jedoch, dass beide Stellen gleichwertig sind und es keine Rolle für die Aktivität der Histidinkinase spielt, welche der Bindestellen (zuerst) besetzt wird.

Die geringere Signalintensität des SpaK-Nisin-Komplexes und die Tatsache, dass lediglich bei Inkubation mit dem Subtilin eine Bindung mit dem SpaK-Dimer detektiert werden konnte, legt die Vermutung nahe, dass die Bindungsaffinität des Nisins geringer zu sein scheint, als die des Subtilins. Dies steht folglich auch im Einklang mit den Experimenten, die zeigten, dass Nisin zwar grundsätzlich an SpaK binden kann, dies allerdings kaum eine Steigerung der SpaK-Aktivität zur Folge hat.

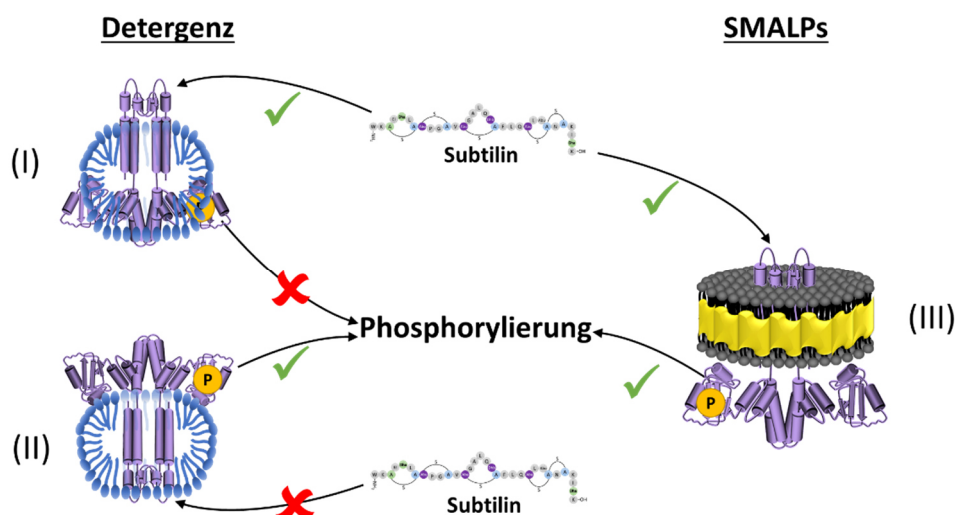
Zusätzlich zur Analyse des SpaK<sub>(1-176)</sub>, welches die Sensordomäne umfasst, wurde auch die cytoplasmatische Domäne, welche die Dimerisierungsdomäne enthält, näher untersucht. Als Negativ-Kontrolle wurde diese analog den vorherigen Experimenten ebenfalls mit den drei Lantibiotika Subtilin, Nisin und S[C11A] inkubiert. Auf Grund der fehlenden Sensordomäne konnte hierbei erwartungsgemäß mit keinem der drei Lantibiotika eine Bindung detektiert werden (siehe Abb. 64, A). Auffällig ist jedoch, dass die cytoplasmatische Domäne alleine nicht nur Dimere ausbildet, sondern gar Tetramere. Dass die cytoplasmatische Domäne des SpaK einen Tetramer ausbildet, konnte ebenfalls in weiteren Analysen unter Variation der IR-

Laserleistung bestätigt werden. So zeigt sich bei geringer Laserleistung ein dominantes Tetramer-Signal, der bei hoher Laserleistung erwartungsgemäß in Trimer, Dimer und Monomer dissoziiert werden konnte (Abb. 64, B). Dies unterstützt die Vermutung, dass sowohl die Transmembran- als auch die Sensordomäne zusammen für die Ausbildung eines homodimeren SpaK verantwortlich sind und die Dimerisierungsdomäne nicht alleine ursächlich für den dimeren Zustand des SpaK ist.



**Abbildung 64: LILBID-MS Spektren der cytoplasmatischen Domäne des SpaK. (A)** LILBID-MS Spektren des SpaK<sub>Cytopl.</sub> Domäne ohne und nach Inkubation mit den Lantibiotika Subtilin, Nisin und der Subtilin Mutante S[C11A]. Auf Grund der fehlenden Sensordomäne in diesem Konstrukt konnte erwartungsgemäß mit allen drei Lantibiotika keine Komplexbildung nachgewiesen werden. **(B)** LILBID-MS Spektren der cytoplasmatischen Domäne des SpaK in Abhängigkeit der zur Ionisierung genutzten IR-Laserleistung. Diese formt einen Tetramer. Bei geringer Laserleistung zeigt sich ein dominantes Tetramer-Signal, welches bei hoher Laserleistung erwartungsgemäß in Trimer, Dimer und Monomer dissoziiert werden kann.

Um Aufschluss über die Aktivität des isolierten SpaK in Detergens zu erhalten, wurde dieses mit Hilfe eines Autophosphorylierungsassays untersucht. Allerdings war es hierbei nicht möglich eine Kinaseaktivität zu beobachten. Das Protein konnte somit zwar erfolgreich isoliert werden, die Detergens-Solubilisierung hatte allerdings einen merklichen Einfluss auf die Aktivität der Kinase. Dies verdeutlicht nochmals die bereits thematisierte Problematik bei der Isolierung von funktionellen MPs mittels Detergens und zeigt ebenfalls, dass die das SpaK umgebenden Lipide scheinbar einen wichtigen Einfluss auf dessen Aktivität besitzen könnten. Als Ursache, warum bei Verwendung von Detergens keine Aktivität des SpaK nachgewiesen werden konnte, wurde nebst dem Einfluss von Lipiden ebenfalls vermutet, dass die Tendenz von Detergens zur Micellen-Bildung ein Problem darstellen könnte (siehe Abb. 65). So wäre es denkbar, dass durch das Detergens einerseits die Domäne, an der die Phosphorylierung stattfindet, teilweise abgeschirmt wird, andererseits kann bei entsprechender Orientierung des SpaK in einer Detergens-Micelle die Bindestelle des Subtilins unzugänglich sein. Somit wäre es zwar theoretisch möglich eine Phosphorylierung zu beobachten, allerdings könnte diese nicht durch Subtilin induziert werden. Da mittels LILBID-MS allerdings gezeigt wurde, dass eine Subtilin-Bindung grundsätzlich auch bei Solubilisierung in Detergens detektierbar ist, scheinen die Lipide hauptursächlich für eine vollumfängliche Aktivität des SpaK zu sein. Um SpaK in seiner natürlichen Lipid-Umgebung und funktional zu isolieren, wurde daher für weitere Analysen eine Solubilisierung mit SMALPs angestrebt.

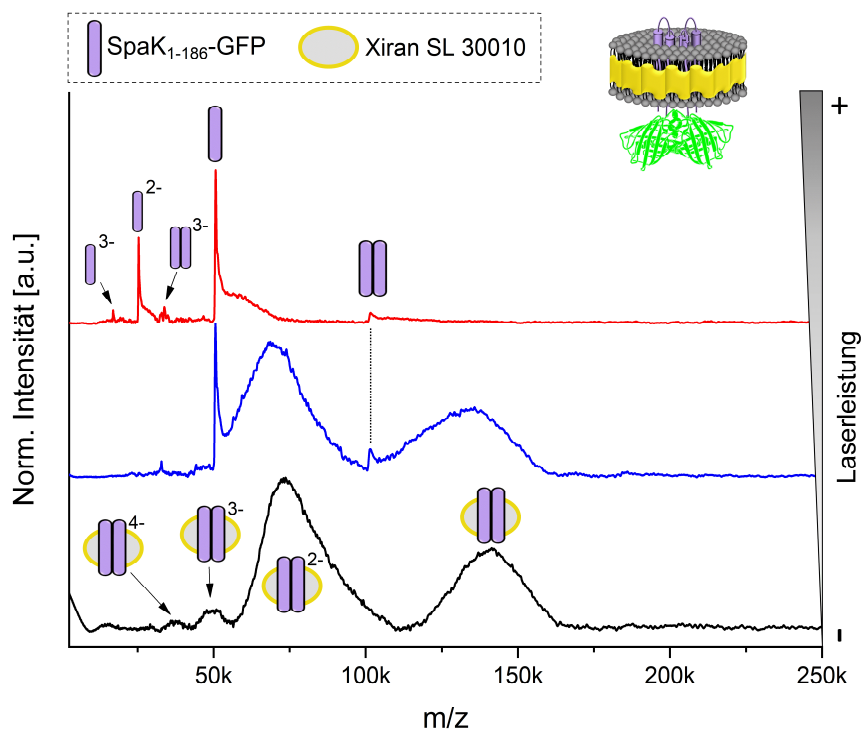


**Abbildung 65: Schematische Darstellung der möglichen Einflüsse auf die SpaK-Aktivität.** In Detergens solubiliertes SpaK könnte auf Grund von Micellenbildung sowohl die Sensordomäne (I) als auch die Domäne, an der die Phosphorylierung stattfindet (II), teilweise abgeschirmt sein, was einen negativen Einfluss auf dessen Aktivität erklären könnte. Auch die das SpaK umgebenden natürlichen Lipide könnten einen Einfluss auf die Konformation und folglich auf dessen Aktivität haben. SMALPs (III) sollten es ermöglichen sowohl SpaK samt seiner natürlichen Lipidumgebung zu isolieren als auch beide Domänen gleichermaßen zugänglich zu erhalten.

## 6.3.2 SpaK aus SMALPs

Mittels LILBID-MS-Experimenten konnte die Darstellung des SpaK in Detergens bestätigt und ebenfalls die Bindung von Subtilin an SpaK nachgewiesen werden. Eine (Lantibiotikum induzierte) Aktivität der Kinase konnte allerdings nicht beobachtet werden. Es wurde angenommen, dass dies möglicherweise auf (spezifisch bindende) Lipide zurückzuführen ist, die mitverantwortlich für die vollumfängliche Aktivität des SpaK sind. Um diese Theorie zu untersuchen und ein vollends aktives Protein in seiner natürlichen Lipid-Umgebung zu erhalten, wurde SpaK daher mit Hilfe von SMALPs direkt aus *B. subtilis* isoliert.

Im Zuge einer präparativ leichter zu handhabenden Aufreinigung wurde zunächst ein GFP tragendes SpaK<sub>1-186</sub> mittels Xiran SL30010 SMALPs exprimiert und isoliert. Abbildung 66 zeigt ein LILBID-MS Spektrum des SpaK<sub>1-186</sub>-GFP in Abhängigkeit der im Zuge der Ionisation variierten Laserleistung.



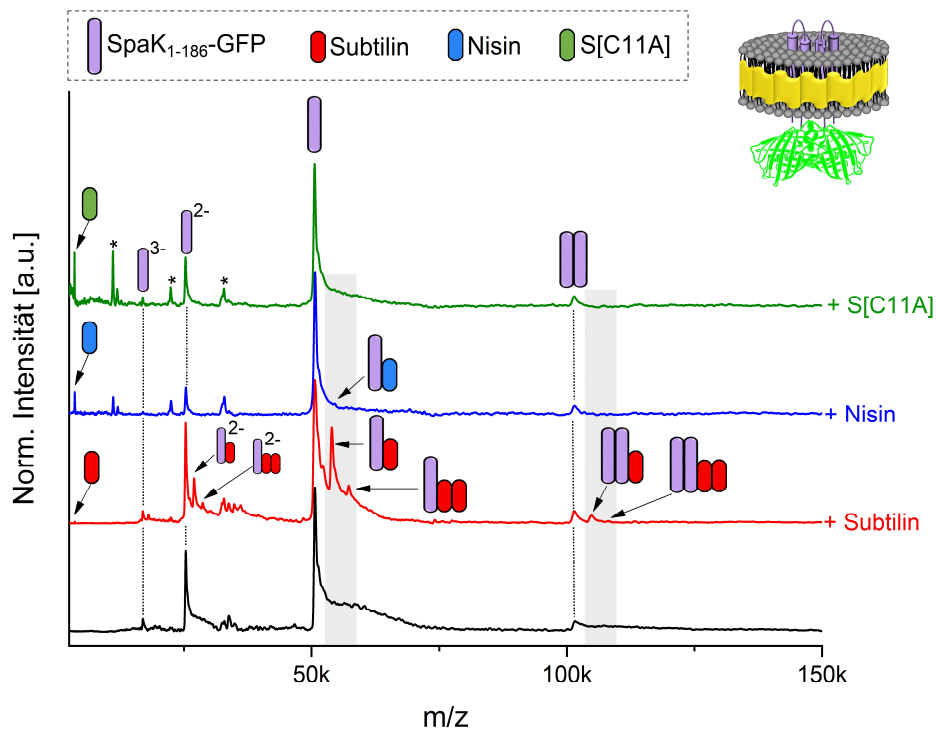
**Abbildung 66:** LILBID-MS Spektren des SpaK<sub>1-186</sub>-GFP Konstrukts aus SMALPs in Abhängigkeit der Laserleistung. In Abhängigkeit der zur Ionisation genutzten Laserleistung kann der intakte SpaK-SMALP-Komplex inklusive Lipiden und SMA-Copolymeren, bis hin zum freien Protein detektiert werden.



Bei geringer Laserleistung zeigt sich eine Verteilung des ein- bis vierfach negativ geladenen Gesamtkomplexes aus einem SpaK<sub>1-186</sub>-GFP Dimer, der in den SMALPs samt Lipiden eingebettet ist (siehe Abb. 66, schwarzes Spektrum). Es zeigen sich insgesamt sehr breite Signale. Dies lässt sich durch die Heterogenität der SMAs und der entsprechend variierenden Lipid-Menge innerhalb der SMALPs erklären. Durch Erhöhung der Laserleistung können sukzessive mehr und mehr SMAs und Lipide vom Protein abgestreift werden, was sich daran zeigt, dass sich die Breite der Signale zunehmend verringert und die Signale zudem zu niedrigeren Massen verschieben (Abb. 66, blaues Spektrum). Bei ausreichend hoher Laserleistung kann schließlich ein Signal des freien Proteins detektiert werden, ohne Anhaftungen von Lipiden und SMAs (Abb. 66, rotes Spektrum). Dies steht im Einklang mit ersten Studien von Hellwig & Peetz *et al.*<sup>11</sup> bezüglich der Analyse von SMALPs mittels LILBID-MS, die selbigen Trend in Abhängigkeit der Laserleistung beobachteten. Erstmals konnte hier allerdings auch nachgewiesen werden, dass der SMALP-freie native Oligomierzustand bei der MP Analyse mittels LILBID-MS erhalten bleiben und detektiert werden kann. So zeigt sich analog den Experimenten des SpaK in Detergens, dass mittels SMALPs solubilisiertes SpaK<sub>1-186</sub> als Homo-Dimer vorliegt. Anzumerken ist jedoch, dass die zur Ionenfreisetzung genutzte Laserleistung sorgfältig eingestellt werden muss, da andernfalls bei zu hoher Laserleistung nicht nur Lipide und SMAs abgestreift werden, sondern auch die nicht-kovalent gebundenen Oligomere weiter dissoziiert werden könnten.

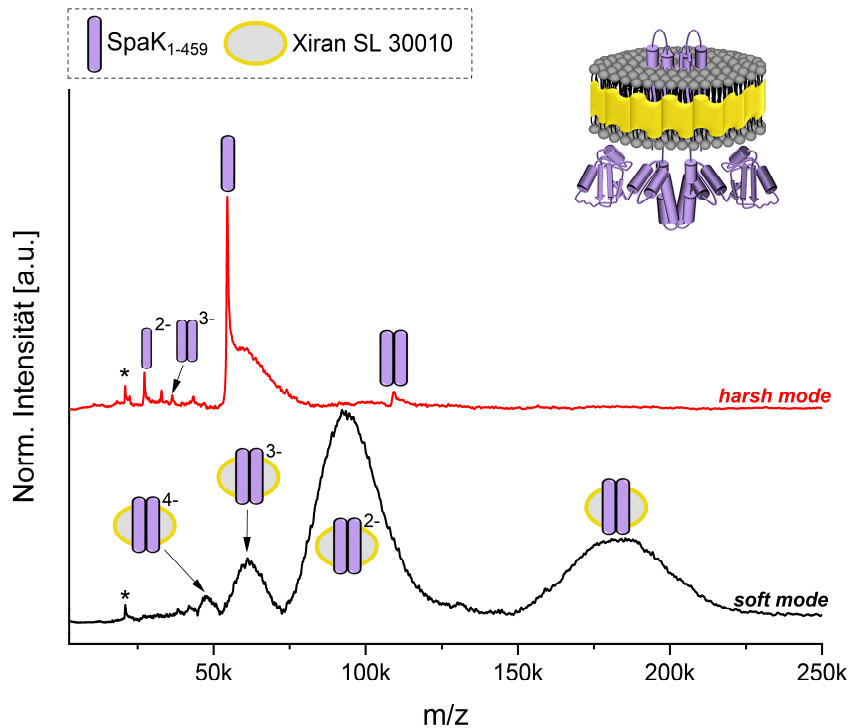
Das SpaK<sub>1-186</sub>-GFP Konstrukt, welches die Bindestelle des Subtilins beinhaltet, wurde, analog vorherigen Experimenten, ebenfalls mit Subtilin, Nisin und S[C11A] inkubiert, um eine Bindung nachzuweisen. In Abbildung 67 sind entsprechende LILBID-MS Spektren dargestellt, die zeigen, dass eine Bindung von Subtilin auch aus SMALPs heraus nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls kann ein schwaches Signal eines monomeren SpaK<sub>1-186</sub>-GFP mit Nisin detektiert werden, wohingegen bei S[C11A] keine Komplexbildung nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich somit mit den Erwartungen und Beobachtungen aus den vorangegangenen Experimenten bei Detergens-Solubilisierung des SpaK.

Es sei angemerkt, dass sowohl die Isolierung des SpaK mit Hilfe von SMALPs ein Novum darstellt als auch der Nachweis einer Interaktion bzw. das Binden eines Liganden an ein via SMALPs isoliertes Protein mittels nativer MS.



**Abbildung 67:** LILBID-MS Spektren des SpaK<sub>1-186</sub>-GFP Konstrukts aus SMALPs vor und nach Inkubation mit den Lantibiotika Subtilin, Nisin und S[C11A]. Lediglich für Subtilin kann als einziges der drei Lantibiotika eine Komplexbildung mit SpaK<sub>1-176</sub>-GFP nachgewiesen werden.

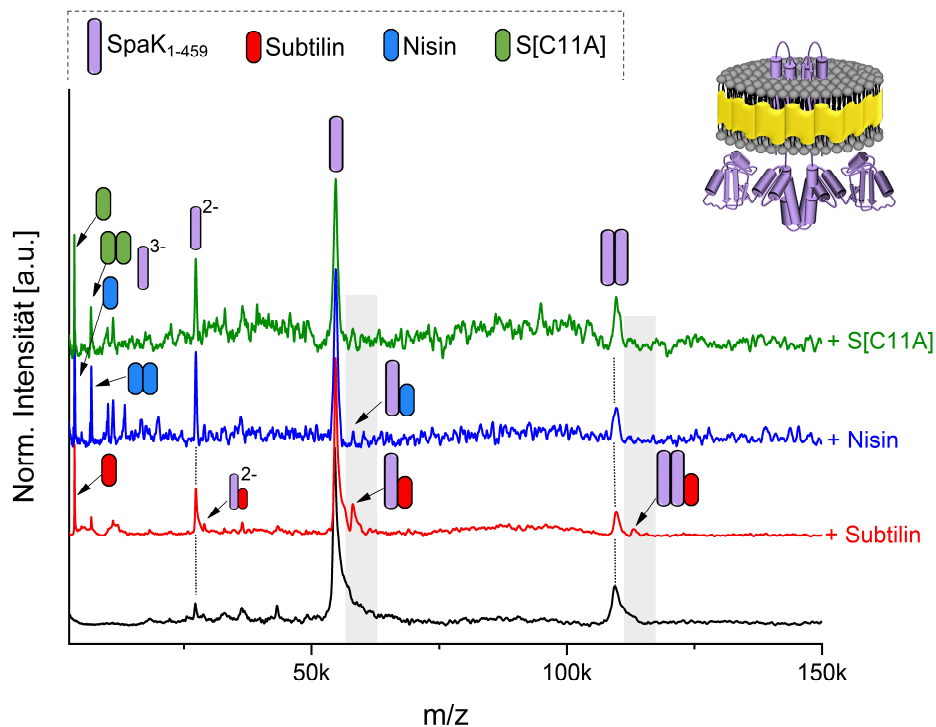
Auch das Vollängen-SpaK (SpaK 1-459) konnte erstmalig erfolgreich mittels SMALPs isoliert werden. Abbildung 68 zeigt entsprechende LILBID-MS-Spektren unter Variation der Laserleistung. Analog des SpaK<sub>1-186</sub>-GFP Konstrukts zeigt sich im Fall der geringen Laserleistung eine Verteilung des ein- bis vierfach negativ geladenen Gesamtkomplexes aus einem SpaK<sub>1-459</sub> Dimer, der in den SMALPs samt Lipiden eingebettet ist (Abb. 68, schwarzes Spektrum). Eine Erhöhung der Laserleistung führt ebenfalls dazu, dass zunehmend mehr und mehr SMAs und Lipide abgestreift werden, sodass letztlich ein Signal des freien Monomers und Dimers detektiert werden kann.



**Abbildung 68: LILBID-MS Spektren des SpaK<sub>1-459</sub> Konstrukts aus SMALPs in Abhängigkeit der Laserleistung.** In Abhängigkeit der zur Ionisation genutzten Laserleistung kann der intakte SpaK-SMALP-Komplex inklusive Lipiden oder freies Protein detektiert werden.

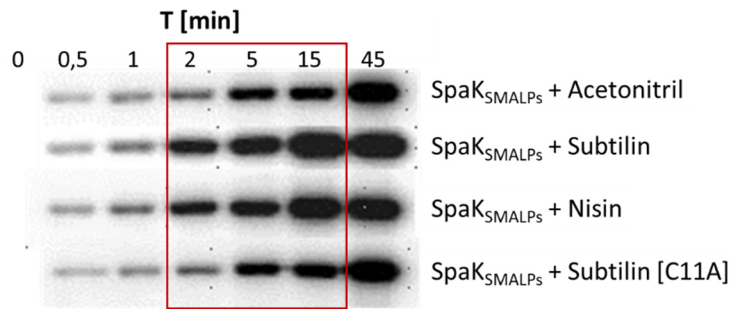
In LILBID-MS Analysen des SpaK<sub>1-459</sub>, welches mit Subtilin, Nisin und S[C11A] inkubiert wurde, konnte auch im Fall des Volllängen SpaK aus SMALPs eine Bindung von Subtilin und Nisin nachgewiesen werden. Signale im Spektrum, die auf eine Bindung von S[C11A] schließen lassen, waren indes nicht detektierbar (siehe Abb. 69).

Insgesamt fällt die Signalintensität des Komplexes aus einem SpaK mit einem Subtilin im Vergleich zu den Messungen des Volllängen SpaK aus Detergens und verglichen mit den Messungen des SpaK-GFP-Konstrukts noch einmal geringer aus. Auch konnte kein Komplex eines SpaK-Dimers oder Monomers mit ein oder zwei gebundenen Subtilin detektiert werden. Zurückzuführen lässt sich dies zum einen darauf, dass sehr harsche Bedingungen, d.h. eine hohe Laserleistung, von Nöten waren das SpaK frei von SMAs und Lipiden detektieren zu können. Andererseits muss auch in Betracht gezogen werden, dass eventuell das GFP-SpaK ohne die Domäne, an der die Phosphorylierung stattfindet, womöglich konformationell in der Membran nicht exakt genauso ausgerichtet ist wie das SpaK als Volllängen-Protein. Dies könnte wiederum zur Folge haben, dass die Bindestelle im GFP-SpaK eventuell leichter für ein weiteres Subtilin zugänglich war.



**Abbildung 69:** LILBID-MS Spektren des SpaK<sub>1-459</sub> in SMALPs vor und nach Inkubation mit den Lantibiotika Subtilin, Nisin und der Subtilin Mutante S[C111A]. Sowohl nach Inkubation mit Subtilin (rot) als auch mit Nisin (blau) kann ein Signal eines SpaK-Lantibiotika-Komplexes detektiert werden, wobei dieses im Fall des Subtilin am signifikantesten ausfällt. Bei Inkubation mit S[C111A] (grün) zeigt sich kein Signal das auf eine Komplex-Bildung schließen lässt.

Neben den LILBID-MS Analysen zum Nachweis der Subtilin-Bindung wurde ebenfalls mittels Autophosphorylierungsassay erneut die Aktivität des SpaK untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das SpaK per se nicht nur erstmals erfolgreich mittels SMALPs isoliert werden konnte, sondern darüber hinaus mittels SMALPs in seiner Funktion voll aktiv war (siehe Abb. 70). Auch zeigt dies, dass die natürlichen Lipide, welche das SpaK umgeben, tatsächlich einen signifikanten Einfluss auf dessen Aktivität zu haben scheinen.

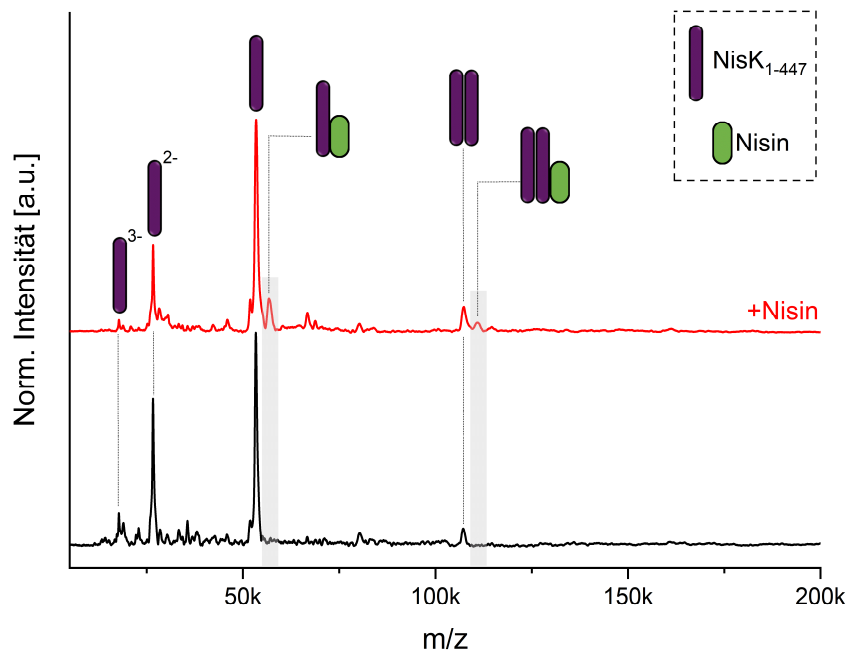


**Abbildung 70: Autophosphorylierungsassay des Volllängen SpaK aus SMALPs.** SpaK wurde in Anwesenheit der Lantibiotika Subtilin, Nisin und S[C11A] mit 2,5-fachem Überschuss an radioaktiv-markiertem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP inkubiert, auf ein SDS-Gel geladen und einer Gel-Elektrophorese unterzogen. Die Visualisierung der Phosphorylierung erfolgte anschließend mittels GE Healthcare/Amersham Typhoon 9400 Phosphor-Imager. Als Kontrolle diente eine Messung von SpaK mit Acetonitril (Lösungsmittel der Lantibiotika). In allen Fällen kann eine basale Aktivität der Histidinkinase beobachtet werden. Sowohl bei Inkubation mit S[C11A] als auch im Kontrollexperiment kann keine gesteigerte Aktivität beobachtet werden. Eine Inkubation mit Subtilin hat indes eine deutliche Zunahme der Kinaseaktivität zur Folge. Besonders deutlich zeigt sich dies in einer intensiveren Schwarzfärbung nach 2, 5 bzw. 15 min Lantibiotika-Inkubation (roter Kasten). Interessanterweise kann auch bei Nisin-Zugabe eine etwas gesteigerte Aktivität beobachtet werden.

### 6.3.3 Nachweis der Interaktion von Nisin mit der Histidinkinase NisK

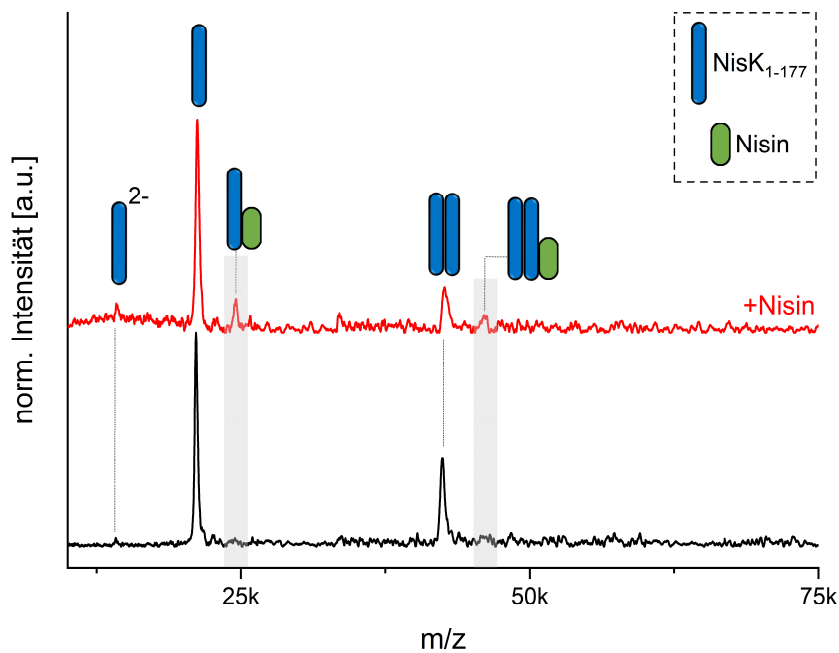
Um die erfolgreiche Expressierung und Isolierung des NisK<sub>1-447</sub> (Volllänge) zu bestätigen sowie dessen oligomeren Zustand zu ermitteln, wurde dieses, analog dem SpaK, zunächst in Detergens (DDM) isoliert und einer LILBID-MS Analyse unterzogen (siehe Abb. 71, schwarzes Spektrum). Neben einem dominanten Signal bei 53.6 kDa, dies entspricht dem NisK-Monomer, konnte auch ein geringer Dimer-Anteil detektiert werden und bestätigte folglich die Annahme, dass die Histidinkinase NisK als Dimer vorliegt.

Zum Nachweis einer direkten Interaktion von NisK mit dem Lantibiotikum Nisin und um eine Aussage bzgl. des vorliegenden Assoziationsgrades an Nisin treffen zu können, wurden weiterhin Messungen durchgeführt, bei denen NisK zuvor mit einem dreifachen Überschuss des Lantibiotikums inkubiert wurde (Abb. 71, rotes Spektrum). Nach Inkubation mit Nisin war es möglich zusätzliche Signale zu detektieren. Bei den dominantesten der neu hinzugekommenen Signale handelte es sich hierbei sowohl um den Monomer als auch den Dimer der Histidinkinase mit je einem gebundenen Nisin-Molekül.



**Abbildung 71: LILBID-MS Spektren des Volllängen NisK<sub>(1-447)</sub> vor und nach Inkubation mit seinem spezifischen Lantibiotikum Nisin.** Nach Inkubation mit Nisin können zwei neue Komplexe detektiert werden. Hierbei handelt es sich sowohl um den NisK-Monomer als auch den NisK-Dimer mit je einem gebundenen Nisin.

Um einen weiteren Einblick in die Wechselwirkungsbeziehung zwischen NisK/NisK sowie NisK/Nisin zu erhalten, wurde neben der Volllängen Histidinkinase auch eine am C-Terminus verkürzte Variante, das NisK<sub>(1-177)</sub>, mittels LILBID-MS untersucht. Dieses Konstrukt umfasst nur noch die beiden Transmembrandomänen mit der Nisin-Bindestelle, jedoch keine Dimerisierungs-Domäne mehr. Auch dieses Konstrukt wurde sowohl in Ab- als auch Anwesenheit des Lantibiotikums Nisin analysiert. Trotz fehlender Dimerisierungsdomäne konnte ein NisK<sub>(1-177)</sub>-Dimer detektiert werden (siehe Abb. 72, schwarzes Spektrum). Dies wurde bereits im Fall des Homolog SpaK beobachtet und legt die Vermutung nahe, dass die Ausbildung eines NisK-Dimers nicht nur alleine über die Dimerisierungsdomäne erfolgen könnte, sondern partiell ebenfalls über die Transmembrandomäne vermittelt wird.



**Abbildung 72: LILBID-MS Spektren des am C-Terminus auf die Transmembrandomäne verkürzten Konstrukts NisK<sub>(1-177)</sub>.** Analog der Transmembrandomäne des SpaK liegt auch NisK<sub>(1-177)</sub> als Dimer vor. Nach Inkubation mit Nisin können zwei weitere Signale detektiert werden, die einem NisK<sub>(1-177)</sub>-Monomer und -Dimer mit je einem gebundenen Nisin entsprechen.

Durch Zugabe von Nisin konnte auch beim gekürzten Konstrukt NisK<sub>(1-177)</sub> eine Bindung von Nisin nachgewiesen werden, was zusätzliche Signale innerhalb des Spektrums belegen (siehe Abb. 72, rotes Spektrum). Sowohl am Dimer als auch am Monomer konnte, analog zu den Messungen des Volllängenkonstrukts, jeweils nur ein weiteres Signal detektiert werden, welches je einem Komplex mit jeweils einem gebundenen Nisin-Molekül entspricht. Somit legt auch dieses Experiment nahe, dass obgleich zwei potentielle Bindestellen im Homo-Dimer-Komplex dieser Histidinkinase für Nisin vorhanden sind, für die eigentliche Bindung des Liganden der monomere Zustand grundsätzlich ausreichend zu sein scheint, um die autoinduktive Lantibiotika-Synthese in Gang zu setzen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der Experimente am NisK-Homolog SpaK.

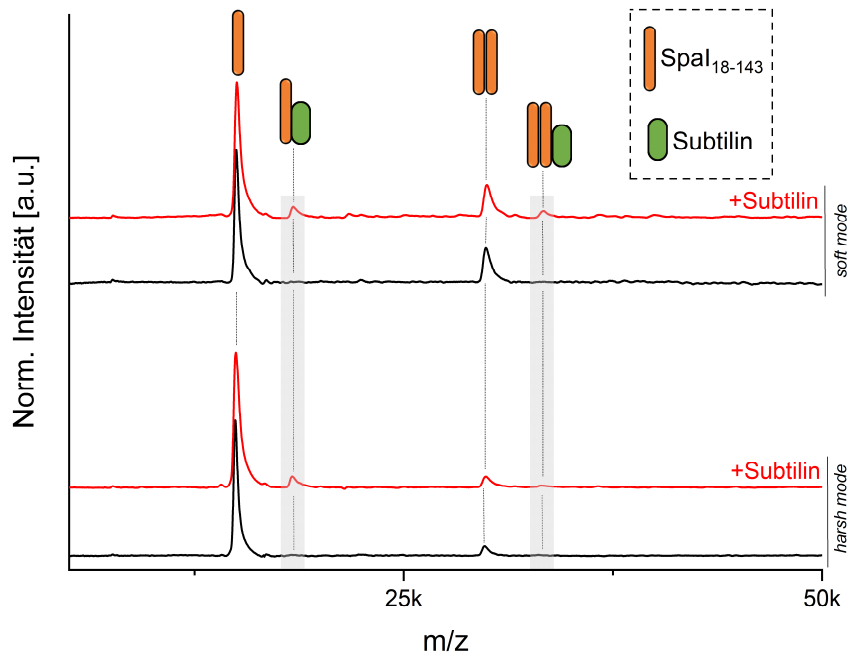
#### 6.3.4 Nachweis der Interaktion des Immunitätsproteins Spal mit Subtilin

Um sich vor der Toxizität des eigens produzierten Lantibiotikum zu schützen, besitzen Bakterien eine Art Immunitätssystem. *L. lactis* und *B. subtilis* exprimieren unter anderem spezifische membran-assoziierte Immunitätsproteine, welche allgemein hin als LanI bezeichnet werden (siehe auch Kapitel 4.3).<sup>164</sup> Der genaue Wirkmechanismus der Immunitätsproteine NisI (*L. lactis*) und Spal (*B. subtilis*) ist jedoch noch nicht bekannt. Hacker *et al.*<sup>170</sup> konnten sowohl die Struktur des NisI lösen als auch mittels NMR zeigen, dass Nisin an die C-terminale Domäne von NisI bindet. Vergleichbare Interaktionsnachweise von Subtilin mit Spal konnten bislang allerdings nicht erbracht werden.<sup>169</sup>

Um erstmals einen spektrometrischen Nachweis der Interaktion des Immunitätsproteins Spal mit seinem Lantibiotikum zu erbringen, wurde ein N-terminal geschnittenes Spal (Spal<sub>(18-143)</sub>) mit Subtilin inkubiert und mittels LILBID-MS untersucht. Für dieses Konstrukt wurde bereits in früheren Analysen mittels NMR die 3D-Struktur aufgeklärt.<sup>169</sup> Im Zuge dieser Analysen zeigte sich, dass die N-terminalen Aminosäuren des Spal<sub>Wildtyp</sub> sehr flexibel sind und daher ein Target für proteolytischen Abbau darstellen. Dies zeigte sich auch in ersten LILBID-MS-Messungen des Spal<sub>Wildtyps</sub>, in denen Abbauprodukte detektiert werden konnten (siehe Kapitel 10. Anhang, Abb. A1).

Um den direkten Nachweis der Spa/Subtilin-Wechselwirkung zu erbringen, wurde das geschnittene Spal<sub>18-143</sub> mit einem dreifachen Überschuss an Subtilin inkubiert und untersucht. Die Abbildung 73 zeigt entsprechende LILBID-MS Spektren unter Variation der zur Ionenfreisetzung genutzten IR-Laserleistung.





**Abbildung 73: LILBID-MS Spektren des Spal in An- und Abwesenheit des Lantibiotikums Subtilin unter Variation der IR-Laserleistung.** Im *harsh* wie auch *soft mode* kann sowohl ein Spal-Monomer, ebenso wie ein Spal-Dimer detektiert werden. Nach Inkubation mit dem Lantibiotikum kann ein Komplex aus Spal und Subtilin detektiert werden und stellt somit erstmals einen direkten Nachweis der Interaktion des Immunitätsproteins Spal mit dem Lantibiotikum Subtilin dar.

Im Fall des Spal<sub>(18-143)</sub> ohne Subtilin können sowohl im *harsh* als auch *soft mode* des IR-Lasers zwei Signale detektiert werden, die dem Monomer (15 kDa), sowie dem Dimer (30 kDa) des Spal zugeordnet werden konnten. Spal liegt somit ebenfalls als Homo-Dimer vor.

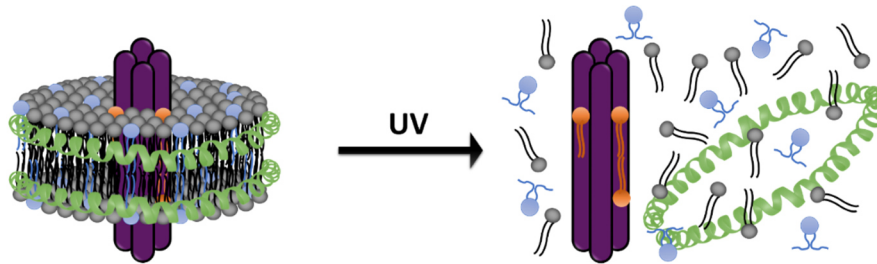
Bei Zugabe von Subtilin zeigten sich weitere Signale im Spektrum, die einen Komplex aus Spal<sub>(18-143)</sub>-Monomer mit einem Subtilin entsprechen sowie einem Komplex eines Spal<sub>(18-143)</sub> – Dimers mit einem Subtilin. Letzterer Komplex konnte im *harsh mode* des IR-Lasers dissoziiert werden, wohingegen der Komplex aus monomerem Spal und einem Subtilin stabil blieb. Dies legt nahe, dass trotz seines dimeren Oligomerzustandes lediglich ein Spal-Monomer mit einem Subtilin im Zuge der Immunitätsantwort interagiert.

#### 6.4 UV-schaltbare Lipide in Nanodiscs

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist bekannt, dass für manche Proteine, insbesondere MPs, Lipide hinsichtlich deren Konformation und Funktion von Bedeutung sind oder auch im Zuge der Oligomerisierung eine Rolle spielen. Um Membranproteine und ihre Funktionen zu verstehen, ist es daher unter anderem von besonderem Interesse spezifisch mit MP interagierende Lipide zu identifizieren. Unterschiedliche Studien mittels nativer MS haben gezeigt, dass an MPs bei Überführung in die Gasphase einige Lipide fest gebunden bleiben und es daher möglich ist Protein-Lipid-Komplexe zu detektieren.<sup>194</sup> Das Problem hierbei ist jedoch, dass neben spezifisch gebundenen Lipiden auch unspezifische Lipide am MP gebunden bleiben und es schwer ist zwischen beiden zu unterscheiden.

Wie unter Kapitel 3.5 bereits dargelegt, zeigten umfangreiche Studien von Henrich & Peetz *et al.*<sup>13</sup> hinsichtlich der Analyse von MPs in NDs mittels LILBID-MS zudem, dass sich nicht jedes Lipid gleichermaßen gut zur Darstellung von MPs in NDs eignet. Auch in Bezug auf die Ionenfreisetzung bei der LILBID-MS eignet sich nicht jedes Lipid gleichermaßen. So können manche in Verbindung mit NDs genutzten Lipide bei der Ionisierung vom MSP und den zu untersuchenden Proteinen nicht oder nur unzureichend abgestreift werden, was sich in den Spektren als Lipid-Cluster Anhaftungen widerspiegelt. Dies kann einerseits die Auswertung der Spektren erschweren, andererseits im schlimmsten Fall gar zur Folge haben, dass manche Signale nicht mehr ausreichend genug aufgelöst werden können, was wiederum zu einem Informationsverlust führen kann.

Um diese Lipid-Anhaftungen an mittels NDs solubilisierten Proteinen zu reduzieren, mögliche spezifisch bindende Lipide zu identifizieren und um auch Lipide nutzen zu können, die beim Ionisierungsprozess in LILBID-MS weniger gut von Proteinen abgestreift werden können, wurde die Idee entwickelt MPs in NDs zu solubilisieren, in denen die NDs zusätzlich zu „normalen“ Lipiden mit UV-schaltbaren Lipiden dargestellt werden. Die Idee hierbei besteht darin, durch UV-Bestrahlung das Schalten der UV-Lipide und eine damit einhergehende Konformationsänderung der UV-schaltbaren Lipide zu induzieren, dadurch mehr an Proteinen anhaftende unspezifische Lipide abzustreifen und gleichzeitig wiederum auch am Protein gebundene spezifische Lipide identifizieren zu können (siehe Abb. 74).



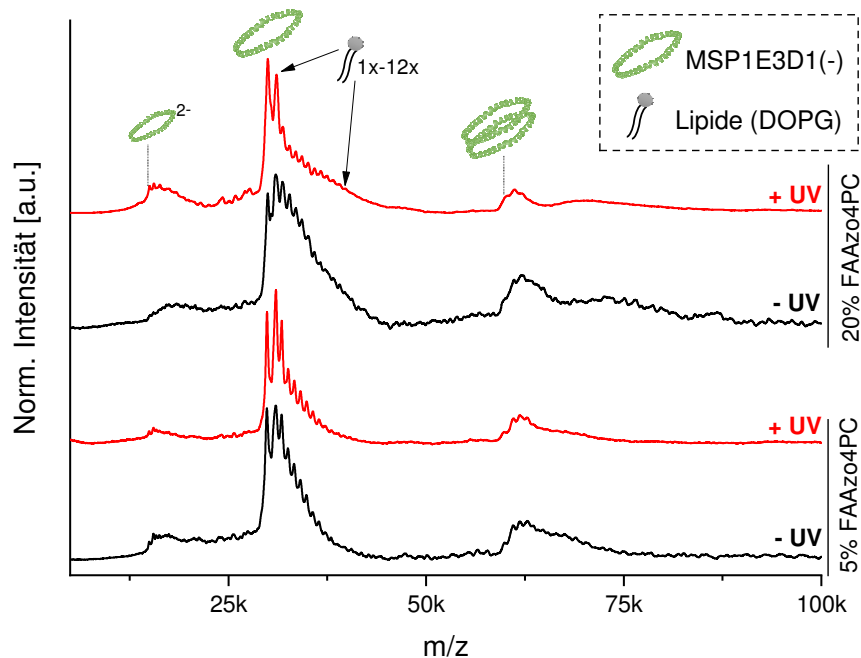
**Abbildung 74: Prinzip der Idee zur Identifikation von spezifisch an MPs gebundenen Lipiden durch den Einsatz von UV-schaltbaren Lipiden.** Durch UV-Bestrahlung kommt es zu einer Konformationsänderung der UV-schaltbaren Lipide (blau), die in NDs zusammen mit „normalen“ *bulk* Lipiden (grau) eingebracht wurden. Diese Konformationsänderung hat zur Folge, dass unspezifische Lipide besser vom MP abgestreift werden und spezifisch gebundene Lipide (orange) identifiziert werden können.

Um zu untersuchen, ob der Einsatz von zusätzlich in NDs eingebrachten UV-schaltbaren Lipiden im LILBID-Ionisierungsprozess eine Reduzierung von Lipid-Clustern bewirken kann, wurden zunächst leere NDs mit den drei Lipiden DMPG, DOPG und DMPC jeweils in Kombination mit dem photoschaltbaren Lipid FAAzo4PC präpariert und untersucht. Das UV-schaltbare Lipid trägt zwei Azobenzol-Photoschalter, die durch UV-Bestrahlung von der *trans*- in die *cis*-Konformation überführt werden können (siehe Kapitel 5.1). Für DOPG und DMPC ist bekannt, dass diese sich im LILBID-Ionisierungsprozess schlecht aus NDs entfernen bzw. vom MSP abstreifen lassen, DOPC darüber hinaus schlechter als DOPG (siehe Kapitel 3.5). DMPG hingegen zeigt die geringsten Lipid-Cluster bzw. kann nahezu ganz vom MSP abgestreift werden und sollte daher als Referenz dienen, um auszuschließen, dass vom FAAzo4PC seinerseits wiederum Lipid-Cluster ausgebildet oder begünstigt werden. Um zu untersuchen, ob und wie sich der Anteil an eingesetzten UV-schaltbaren Lipiden in NDs auf die erhaltenen Spektren auswirkt, wurden NDs dargestellt mit einem 5%, 10% und 20% Anteil an FAAzo4PC.

Abbildung 75 zeigt Spektren von NDs bestehend aus DOPG und FAAzo4PC vor UV-Bestrahlung (schwarze Spektren) und nach UV-Bestrahlung (rote Spektren) für NDs mit einem 5%igen und einem 20%igen Anteil an UV-schaltbarem Lipid. Die UV-Bestrahlung erfolgte innerhalb der Analyt-Tröpfchen direkt vor IR-Bestrahlung mit Hilfe eines zusätzlich eingekoppelten UV-Lasers (siehe Kapitel 5.4.2).

Die Spektren ohne zusätzliche UV-Bestrahlung zeigen in beiden DOPG/FAAzo4PC-Verhältnissen, wie erwartet, ein Signal des MSP Monomers und Dimers mit einer Vielzahl an anhaftenden Lipiden, deren Intensität in den Spektren auf Niveau des freien MSP liegen und

verdeutlicht die bestehende Problematik. So ist auf Grund der massiven Lipidanhaftungen das Signal des MSP Dimers stark verbreitert und schlecht aufgelöst.



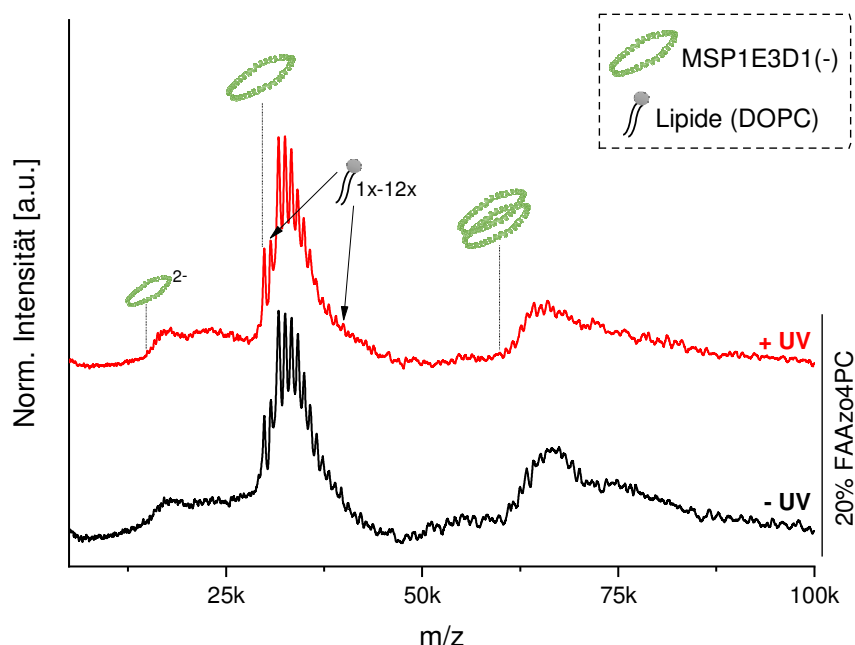
**Abbildung 75: Einfluss von UV-schaltbaren Lipiden auf die LILBID-MS Spektren von DOPG-NDs.** Eine zusätzliche UV-Bestrahlung von NDs mit einem 5% Anteil an FAAzo4PC zeigt keinen Effekt hinsichtlich einer Reduzierung der Lipid-Anhaftungen. Bei einem Anteil von 20% UV-schaltbarem Lipid scheint ein Teil der DOPG-Lipide auf Grund der UV-induzierten Konformationsänderung des FAAzo4PC zusätzlich vom MSP Monomer entfernt werden zu können. Der Effekt ist allerdings nicht stark ausgeprägt.

Eine zusätzliche UV-Bestrahlung der NDs mit einem Anteil von 5% FAAzo4PC hatte keinen Effekt zur Folge (Abb. 75, rot). In Spektren der NDs mit 20% FAAzo4PC hingegen wirken die Lipid-Cluster am Monomer des MSP zumindest leicht reduziert, was auf einen positiven Effekt der UV-schaltbaren Lipide schließen lässt. Allem Anschein nach kann somit eine Konformationsänderung des FAAzo4PC induziert werden, was zur Folge hat, dass mehr DOPG-Lipide abgestreift werden können. Ein deutlicher Effekt auf den MSP-Dimer kann jedoch auch in diesem Fall nicht beobachtet werden. So konnte weder die Breite des Signals noch dessen Auflösung signifikant erhöht werden. Zudem haften auch hier noch derart viele Lipide am MSP, dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass hiermit eine Identifizierung von spezifisch gebundenen Lipiden erreicht werden könnte.

Der Abstand zwischen den Lipiden ist äquidistant und beträgt ca. 790 Da, was in etwa der theoretischen Masse des DOPG (797 Da) entspricht. Am MSP anhaftendes FAAzo4PC (869 Da)

konnte nicht identifiziert werden. Dies legt nahe, dass die UV-schaltbaren Lipide zwar abgestreift werden konnten, dies aber alles in allem nicht oder nur in geringem Maße dazu führt, dass auch ein Großteil des DOPGs aus der ND entfernt wird.

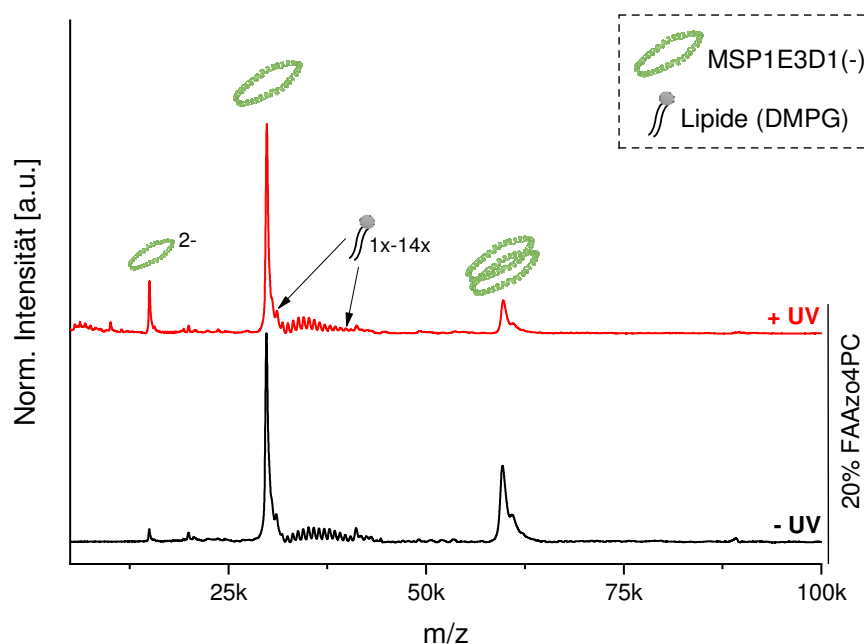
Im Fall einer ND mit DOPC-Lipiden und UV-schaltbarem Lipid zeigt sich ein ähnliches Bild (siehe Abb. 75). Auch hier können deutliche Lipid-Cluster am MSP Mono- und Dimer erkannt werden. Entgegen dem minimalen beobachteten Effekt durch zusätzliche UV-Laser-Bestrahlung im Fall eines 20%igen Anteils an FAAzo4PC in Kombination mit DOPG zeigt sich auch bei einer ND mit DOPC und 20% UV-schaltbarem Lipid kein Effekt in den Spektren, die auf ein vermehrtes Entfernen von Lipiden während des Ionisierungsprozesses schließen lässt (rotes Spektrum). Auch hier entsprechen die äquidistanten Abstände zwischen den Lipiden am MSP ca. 790 Da, was in etwa der theoretischen Masse des DOPC (786 Da) entspricht. Am MSP anhaftendes FAAzo4PC (869 Da) konnte hierbei ebenfalls nicht identifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass das UV-schaltbare Lipid auch hier gut aus der ND entfernt werden kann. Das DOPC scheint aber derart stark am MSP anzuhafte, und womöglich stärker als DOPG, sodass in diesem Fall kein DOPC durch das Schalten des FAAzo4PC zusätzlich abgestreift werden kann.



**Abbildung 76: Einfluss von UV-schaltbaren Lipiden auf die LILBID-MS Spektren von DOPC-NDs.** Eine zusätzliche UV-Bestrahlung von NDs mit einem 20% Anteil an FAAzo4PC zeigt keinen Effekt hinsichtlich einer Reduzierung der Lipid-Anhaftungen.

Bei NDs mit DMPG-Lipiden konnte ebenfalls kein Effekt durch das zusätzliche Einbringen von UV-schaltbarem Lipid beobachtet werden. Wie erwartet, fallen allerdings hier die Lipid-Cluster bereits deutlich weniger ausgeprägt aus. Die Abbildung 77 zeigt Spektren von DMPG-NDs mit einem 20%igen Anteil an FAAzo4PC vor und nach UV-Bestrahlung.

In den zwar von der Intensität her im Vergleich zu DOPC und DOPG deutlich schwächer ausfallenden, aber dennoch vorhandenen Lipid-Clustern, zeigt sich, dass die detektierten Lipid-Signale auch hier ebenfalls nicht der Masse des Faazo4PC entsprechen, sondern auf das DMPG (ca. 690 Da) zurückzuführen sind.

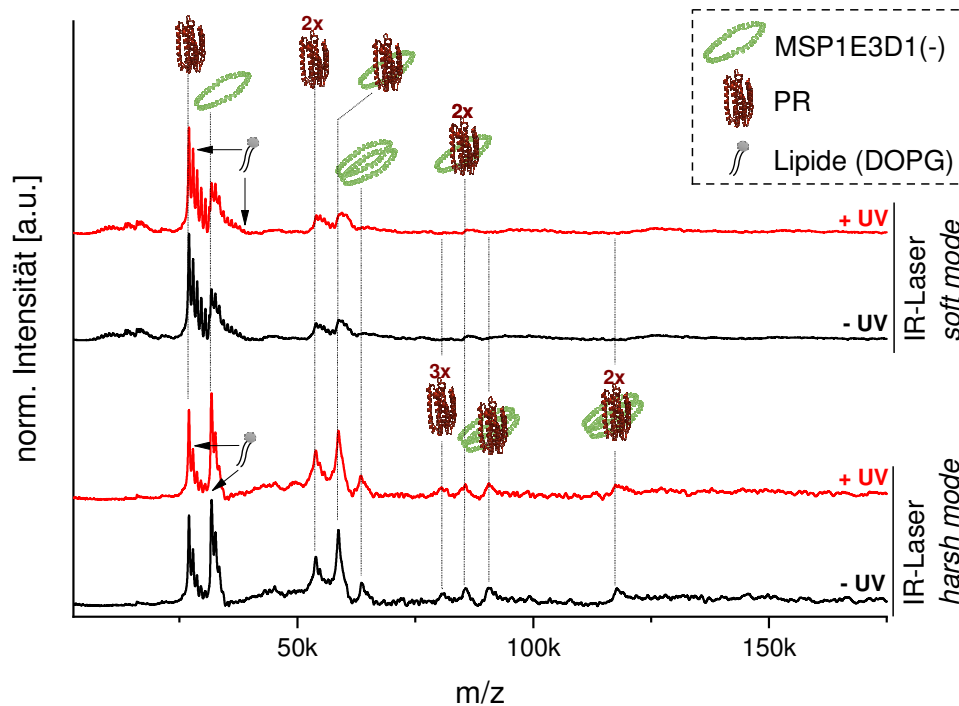


**Abbildung 77: Einfluss von UV-schaltbaren Lipiden auf die LILBID-MS Spektren von DMPG-NDs.** Eine zusätzliche UV-Bestrahlung der NDs mit einem 20% Anteil an FAAzo4PC zeigt keinen Effekt hinsichtlich einer Reduzierung der Lipid-Anhaftungen. Erwartungsgemäß können die DMPG-Lipide bereits durch reine IR-Laserbestrahlung sehr gut aus der ND dissoziiert bzw. vom MSP abgestreift werden.

Um zu untersuchen, wie sich das UV-schaltbare Lipid auf Spektren auswirkt, in denen Proteine in NDs inseriert sind, wurden ebenfalls Spektren aufgenommen, in denen mittels CFPS dargestelltes PR durch NDs mit UV-schaltbarem Lipid solubilisiert wurde. Zwar tragen mittels CFPS dargestellte Proteine keine spezifisch bindenden Lipide. Dennoch sollte es hierdurch möglich sein einen Eindruck zu gewinnen, ob eine Solubilisierung von MPs in NDs mit UV-schaltbarem Lipid für LILBID-MS eine Möglichkeit darstellt, vermehrt im Prozess der Ionenfreisetzung unspezifische Lipide von den zu untersuchenden Zielproteinen abzustreifen und so spezifisch bindende Lipide identifizieren zu können.

Da zuvor lediglich im Fall des DOPG ein merklicher Effekt beobachtet werden konnte, wurde dieses Lipid in Kombination mit FAAzo4PC zur Pre-Assemblierung der NDs verwendet und analysiert. Da zudem die ersten Experimente mit leeren Discs zeigten, dass eine erhöhte Konzentration an FAAzo4PC zu einem stärkeren Effekt zu führen scheint, wurde das Verhältnis von DOPG/FAAzo4PC zudem zusätzlich auf 50/50 angehoben.

Im Rahmen dieser Experimente wurde zudem untersucht, wie sich die genutzte IR-Laserleistung auf die Auflösung bzw. auf die beobachtbaren Lipid-Anhaftungen am MSP und PR auswirkt. Die nachfolgende Abbildung 78 zeigt beispielhaft je zwei Spektren von PR in NDs mit (rot) und ohne (schwarz) zusätzliche UV-Bestrahlung bei geringer IR-Laserleistung, sowie bei hoher IR-Laserleistung im Fall eines DOPG/FAAzo4PC Verhältnisses von 50/50.



**Abbildung 78:** Einfluss von UV-schaltbaren Lipiden auf die LILBID-MS Spektren von DOPG-NDs mit PR in Abhängigkeit der zur Ionisierung genutzten IR-Laserleistung. Eine zusätzliche UV-Bestrahlung von NDs mit einem 50% Anteil an FAAzo4PC zeigt keinen Effekt hinsichtlich einer Reduzierung der Lipid-Anhaftungen am PR oder MSP. Allerdings zeigt sich, dass bereits die genutzte IR-Laserleistung an sich einen merklichen Effekt zur Folge hat. Bei hoher IR-Laserleistung können mehr Lipide abgestreift und folglich eine bessere Auflösung erhalten werden, sodass auch höhere PR-Oligomere detektierbar sind.

Bei geringer IR-Laserleistung zeigen die Spektren sowohl mit als auch ohne zusätzliche UV-Bestrahlung Signale des MSP und PR Monomers und Dimers sowie Signale, die einem Komplex aus MSP Monomer mit bis zu zwei PR Proteinen zugeordnet werden können. Ein Unterschied

durch UV-induzierte Konformationsänderung des FAAzo4PC und einer damit einhergehenden Reduzierung der Lipid-Anhaftungen kann nicht beobachtet werden. Sowohl am PR als auch am MSP Monomer sind die Lipide gleichermaßen signifikant anhaftend und gut aufgelöst. Die Dimer-Signale des PR und MSP sind hingegen, in Folge der vielen Lipide, bereits stark verbreitert und schlecht aufgelöst. Höhere Oligomere sind nicht detektierbar.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei hoher IR-Laserleistung. Auch hier kann kein Effekt durch das UV-schaltbare Lipid beobachtet werden. Allerdings zeigen die Spektren, dass eine deutliche Reduzierung der Lipid-Anhaftungen durch eine höhere IR-Laserleistung erzielt werden konnte. Während die Lipid-Cluster bei geringer IR-Laserleistung dafür sorgten, dass einige Proteinspezies gar nicht erst detektiert werden konnten, zeigen die Spektren im *harsh mode* des IR-Lasers mehr Signale. So war es hierbei sogar möglich den Trimer des PR zu detektieren. Auch das Signal des PR-Dimers und des MSP/PR-Monomer-Komplexes konnte signifikant besser aufgelöst werden.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob und wie sich die UV-Laserleistung auf die Spektren auswirkt. Hierbei konnte allerdings kein Effekt verifiziert werden. Selbiges gilt für Ergebnisse von Experimenten in denen untersucht wurde, ob die UV-Bestrahlungsdauer einen Einfluss auf die Effizienz der Abspaltung von DOPG-Lipiden durch FAAzo4PC hat. So ist es denkbar, dass erst durch längere UV-Bestrahlung quantitativ mehr UV-schaltbare Lipide von *trans* nach *cis* überführt werden können, was womöglich wiederum einen größeren Effekt hinsichtlich der Abspaltung der DOPG-Lipide zur Folge haben könnte.

Um dies zu untersuchen, wurden Proben von PR in NDs mit 50% FAAzo4PC im *soft mode* des IR-Lasers mit der über der Glaskapillare implementierten UV-LED (siehe Kapitel 5.4.2) für eine Minute bestrahlt, anschließend in die Ionenkammer überführt und die Ionen durch den IR-Laser freigesetzt. Abbildung 79 zeigt entsprechende Spektren, in denen die Probe für eine Minute vor deren Überführung in die Ionenkammer mit UV-Licht bestrahlt wurde (rotes Spektrum) sowie ebenfalls nach weiterer zusätzlicher UV-Bestrahlung der einzelnen Tröpfchen, analog den vorigen Experimenten (blaues Spektrum). Hierbei zeigt sich allerdings ebenfalls kein Effekt. Es können lediglich Signale bis zu einem MSP und PR Dimer mit starken Lipid-Anhaftungen detektiert werden. Die Bestrahlungsdauer sorgte somit nicht für eine effektivere Lipid-Cluster-Minimierung.





## 6.5 Detektion UV-induzierter Komplexbildung

Licht hat sich als ein hervorragendes Werkzeug in der Analytik etabliert, welches es erlaubt biologische Prozesse örtlich, zeitlich und darüber hinaus sehr selektiv zu kontrollieren. Unter Kapitel 2.2 wurde z.B. erläutert, wie photoschaltbare Lipide genutzt werden können, um Informationen über den Aufbau und die Vorgänge in und an der Biomembran zu untersuchen oder gezielt die Aktivität von Proteinen zu induzieren. Das gezielte Triggern einer Reaktion oder einer Protein-Protein-Interaktion kann ebenfalls durch sog. *photo-cleaving* induziert und durch den Einsatz von photolabilen Schutzgruppen ermöglicht werden.

Bisweilen bietet die native MS kaum Möglichkeiten schnelle Reaktionen zu analysieren und kinetische Informationen zu gewinnen. In Aggregationsstudien zum Protein A $\beta$ <sub>42</sub> wurde zwar gezeigt, dass mit LILBID-MS grundsätzlich zeitliche Informationen über biologische Vorgänge gewonnen werden können, allerdings bewegte man sich hierbei auf sehr langsamen Zeitskalen im Bereich von Minuten bis Stunden.<sup>136</sup> Viele biologische Prozesse laufen allerdings um ein vielfaches schneller ab (<ms).<sup>195</sup> Daher beschäftigt sich ein weiterer Teil dieser Dissertation damit zu untersuchen, ob und wie sich lichtgesteuerte Reaktionen mittels LILBID-MS induzieren und ggf. zeitlich analysieren lassen können.

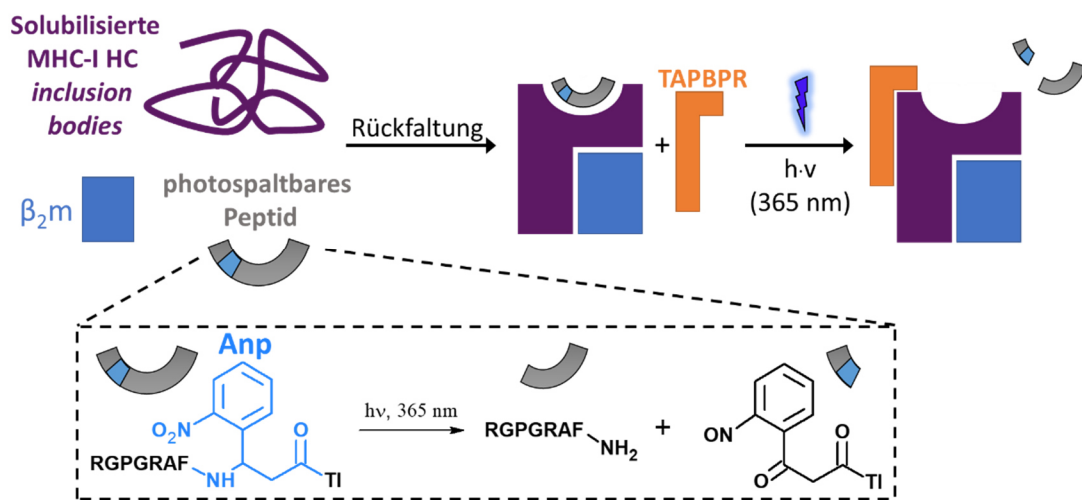
### 6.5.1 MHC-I PLC als Modellsystem

Um zu untersuchen, ob es möglich ist mittels LILBID-MS eine UV-induzierte Komplexbildung zu beobachten sowie ggf. zeitliche Informationen hierüber zu gewinnen, wurde auf ein System zurückgegriffen mit dem Thomas & Tampe<sup>175</sup> bereits erfolgreich den heterodimeren MHC-I/TAPBPR- Komplex isolieren und charakterisieren konnten.

Bei MHC-I handelt sich um einen Heterodimer bestehend aus einer sog. *heavy chain* (hc) und  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) (siehe Kapitel 4.4). Er besitzt darüber hinaus eine Bindetasche, an dem ein spezifisches Chaperon binden kann. Die Bindetasche kann wiederum durch ein photospaltbares Peptid (PP) geblockt werden. Durch UV-Bestrahlung kann die Spaltung des PP induziert werden, was zur Freigabe der Bindestelle führt und es erlaubt, eine Licht-getriggerte Komplexbildung des MHC-I mit seinen Chaperonen zu beobachten.<sup>175</sup>

TAPBPR formt stabile Komplexe nur mit Peptid-freiem MHC-I und interagiert transient mit MHC-I-Peptid-Komplexen. Peptid-freie MHC-I-Moleküle sind allerdings intrinsisch instabil.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde die MHC-I hc in Anwesenheit von aufgereinigtem  $\beta_2m$  und einem für die Bindetasche des MHC-I hoch-affinen, photospaltbaren Peptids photo-P18-110 ([RGPGRAF(Anp)TI], Anp = 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)propansäure) rückgefaltet. Die anschließende Peptidspaltung durch UV-Bestrahlung erfolgte in Anwesenheit von aufgereinigtem TAPBPR (siehe dazu Abb. 80). Auf diese Weise war es möglich licht-getriggert die Bildung eines heterodimeren TAPBPR-MHC-I Komplexes, bestehend aus menschlichem TAPBPR und  $\beta_2m$  sowie dem hc Allomorph H2-D<sup>b</sup> aus Mäusen zu induzieren, zu isolieren und zu kristallisieren.<sup>175</sup>

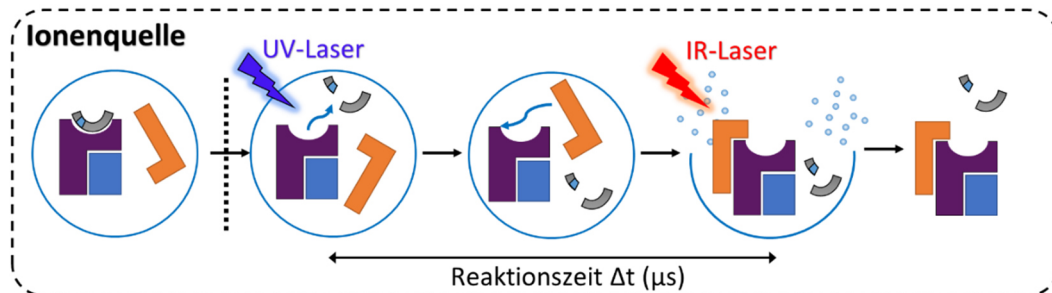


**Abbildung 80: Schema der MHC-I Darstellung und der UV-induzierten Komplex-Bildung mit TAPBPR unter Verwendung eines photospaltbaren Peptids.** Solubilisierte MHC-I heavy chain inclusion bodies werden in Anwesenheit von  $\beta_2m$  und eines PP rückgefaltet. Das PP blockiert die Bindestelle des TAPBPR am MHC-I. Durch UV-Bestrahlung kann das PP in zwei Teile gespalten werden, wodurch die Bindestelle frei wird. An dieser kann nun das TAPBPR, welches mit dem MHC-I/PP Komplex zusammen in Lösung vorgelegt wird, binden.

### 6.5.2 UV-induzierte Peptid-Spaltung

Um zu verifizieren, dass durch eine zusätzliche UV-Bestrahlung der Analyt-Tröpfchen es ermöglicht wird mittels LILBID-MS eine UV-induzierte Komplex-Bildung zu induzieren und zu detektieren, wurde jenes System bestehend aus einem MHC-I mit einem PP als Modellsystem aufgegriffen und einer LILBID-MS-Analyse unterzogen. Abbildung 81 zeigt das Prinzip der erwünschten zu beobachtenden MHC-I/TAPBPR-Komplexbildung durch zusätzliche UV-Bestrahlung des Analyt-Tröpfchens. Die UV-Bestrahlung erfolgte zunächst mit Hilfe des neu implementierten UV-Lasers direkt nach Überführung des Analyt-Tröpfchens in die Ionenquelle.

Die zusätzliche UV-Bestrahlung kann dabei zeitlich auf einer  $\mu\text{s}$ -Zeitskala variiert werden und somit vor, gleichzeitig oder nach IR-Bestrahlung erfolgen (siehe dazu auch Kapitel 5.4.2).

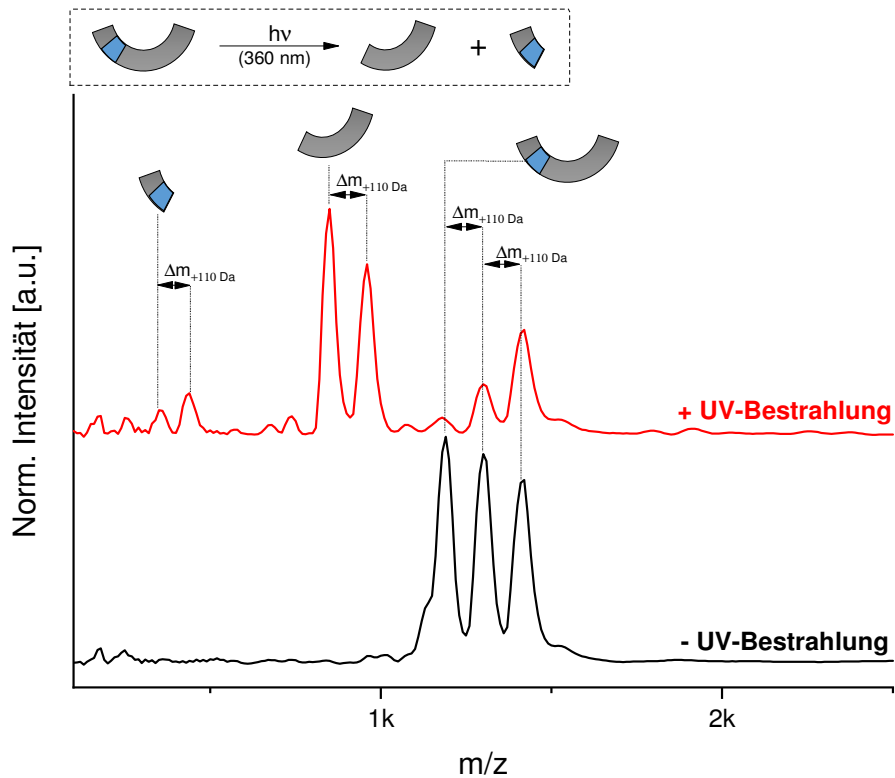


**Abbildung 81: Prinzip der MHC-I/TAPBPR-Komplexbildung innerhalb der Analyt-Tröpfchen durch zusätzliche UV-Bestrahlung.** Durch UV-Bestrahlung des Analyt-Tropfens, der die Reaktionskomponenten enthält, wird eine Reaktion in Gang gesetzt. Die Zeit zwischen UV-Bestrahlung und Freisetzung der Ionen definiert die Reaktionszeit ( $\Delta t$ ) und kann auf einer  $\mu\text{s}$ -Zeitskala variiert werden.

Zunächst wurde untersucht, ob grundsätzlich eine Spaltung des PP innerhalb der Analyt-Tröpfchen vor der Ionenfreisetzung induziert und detektiert werden kann. Hierzu wurden sowohl Spektren des PP ohne als auch nach zusätzlicher UV-Laserbestrahlung aufgenommen. Abbildung 82 zeigt beispielhaft entsprechende LILBID-MS-Spektren.

Das Spektrum ohne zusätzliche UV-Bestrahlung zeigt ein dominantes Signal des intakten PP sowie zwei weitere Signale in äquidistantem Abstand von ca. 110 Da zum Signal des intakten PP bzw. zueinander (siehe Abb. 82, schwarzes Spektrum). Dies lässt auf nicht näher definierbare Anhaftungen am PP schließen. Worum es sich bei den Anhaftungen handeln könnte, kann nur gemutmaßt werden. Das PP lag lyophilisiert vor und wurde lediglich in Wasser gelöst. Möglicherweise handelt es sich um Anhaftungen von Puffermolekülen, die im Zuge der Aufreinigung des PP nicht vollständig entfernt wurden.

Durch zusätzliche UV-Beleuchtung des Tröpfchens vor Ionenfreisetzung durch den IR-Laser konnten weitere Signale detektiert werden, die den Spaltprodukten des PP zugeordnet werden konnten (Abb. 82, rotes Spektrum). Das Spaltprodukt der längeren Fragment-Peptidsequenz dominiert das Spektrum nach UV-Bestrahlung und deutet auf eine effiziente Peptid-Spaltung hin. An den Spaltprodukten zeigen sich ebenfalls die weiter nicht näher definierbaren Anhaftungen. Diese scheinen sich auf die Spaltung des PP jedoch nicht auszuwirken.



**Abbildung 82: LILBID-MS Spektren des photospaltbaren Peptids ohne und nach zusätzlicher UV-Bestrahlung der Analyt-Tröpfchen.** Unabhängig von der UV- und IR-Laserleistung kann eine erfolgreiche UV-induzierte Peptidspaltung in Form der einzelnen PP-Fragmente detektiert werden.  $\Delta m$  entspricht vermutlich am PP anhaftenden Puffermolekülen.

Um weiterhin zu testen, ob es möglich ist eine zeitliche Information bzgl. der Peptid-Spaltung zu erhalten, wurde das Timing zwischen UV- und IR-Laser, d.h. zwischen Peptid-Spaltung durch den UV-Laser und der Ionenfreisetzung, variiert. Unter der Voraussetzung, dass die Spaltung des PP innerhalb von wenigen  $\mu\text{s}$  erfolgt, sollte es auf diese Weise möglich sein eine zeitliche Information darüber zu gewinnen, wie schnell die Peptid-Spaltung abläuft. Interessanterweise zeigte sich hierbei allerdings kein Effekt. Die Peptidspaltung war in einem Bereich von 25  $\mu\text{s}$  bis 0  $\mu\text{s}$  Bestrahlungsverzögerung zwischen UV- und IR-Laser detektierbar. 0  $\mu\text{s}$  entsprechen dabei einer gleichzeitigen Bestrahlung durch UV- und IR Laser. Auch bzgl. der Spaltungseffizienz, d.h. wie hoch der Anteil an noch intaktem PP in Relation zu den Spaltprodukten ist, war kein Unterschied zu erkennen. Im Zuge dieser Experimente wurden ebenfalls Kontroll-Messungen durchgeführt, in denen die Analyt-Tropfen nur mittels UV-Laser bestrahlt wurden. Eine Detektion von Analyt-Signalen war auf diese Weise nicht möglich (siehe Kapitel 10. Anhang, Abb. A2). Eine UV-Bestrahlung von bereits durch den IR-Laser zerrissenen Analyt-Tropfen hatte zur Folge, dass ausschließlich intaktes PP und keine Peptid-Spaltung mehr beobachtet werden konnte.

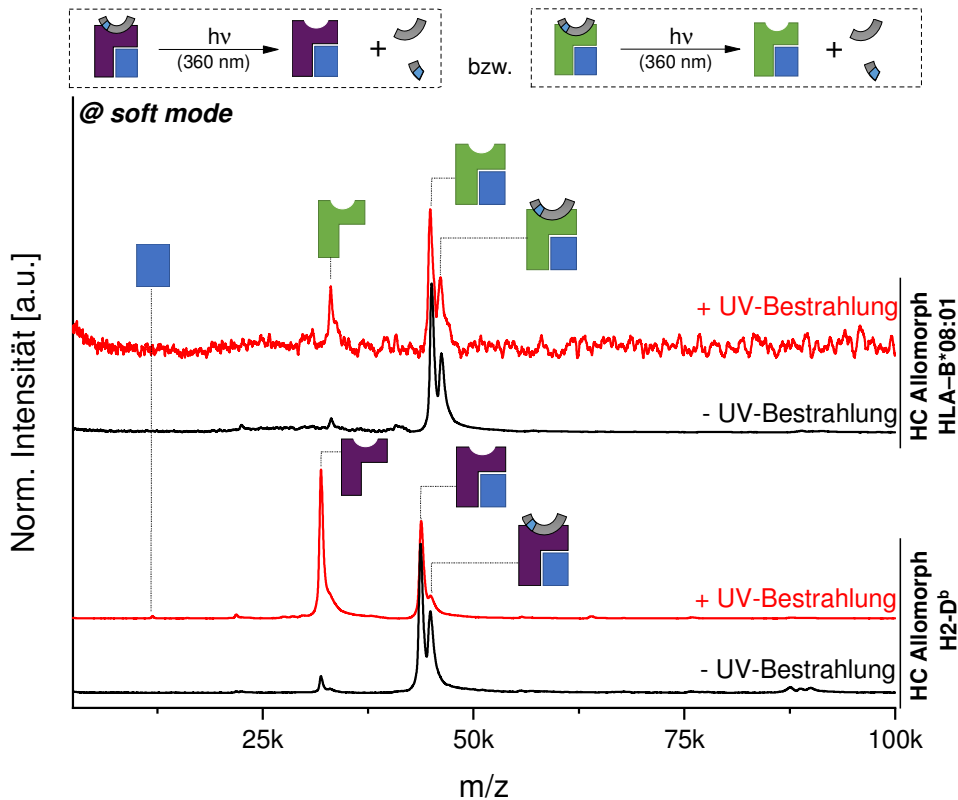
Dass selbst bei gleichzeitiger Bestrahlung mit IR- und UV-Laser eine Spaltung beobachtet werden konnte und somit keine zeitliche Information bzgl. der Spaltungsgeschwindigkeit ermittelt werden konnte, lässt vermuten, dass die Reaktion entweder sehr schnell ist und/oder andere Effekte, wie die Laserleistung des UV-Lasers, für die beobachtbare Spaltung des Peptids eine Rolle spielen könnten.

Um den Effekt der UV-Laserleistung weiter zu analysieren, wurden daher analoge Messungen unter Variation der UV-Laserleistung durchgeführt. Hierbei konnten allerdings keine Unterschiede zwischen *harsh* und *soft mode* des UV-Lasers festgestellt werden. Dies legt nahe, dass entweder die Energie des eingestrahlten UV-Lichts nur eine untergeordnete Rolle für die Spaltungs-Effizienz spielt oder schlichtweg selbst die geringste einstellbare Leistung des UV-Lasers ausreichend Energie liefert, um eine schnelle und effiziente Spaltung des PP zu induzieren. Auch wurden Experimente unter Variation der IR-Laserleistung durchgeführt. Hier zeigt sich erwartungsgemäß allerdings kein Effekt bzgl. einer detektierbaren Spaltung des PP, da im LILBID-Ionisationsprozess keine kovalenten Bindungen gebrochen werden. Lediglich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis fiel im Fall des IR-Lasers im *soft mode* etwas schlechter aus.

### 6.5.3 UV-induzierte Freisetzung der MHC-I Bindestelle

Da es durch zusätzliche UV-Bestrahlung möglich war erfolgreich eine Spaltung des PP innerhalb des Analyt-Tropfens zu demonstrieren, wurde weiterhin die Spaltung des PPs gebunden an MHC-I und die damit einhergehende Freisetzung der Bindestelle näher untersucht. Hierzu wurde nebst dem PP-tragenden hc Allomorph H2-D<sup>b</sup> aus Mäusen auch ein weiteres humanes hc Allomorph, das HLA-B\*08:01, unter Variation der IR- und UV-Laserleistung analysiert.

Während es im Fall des PP zu einer UV-induzierten Spaltung von kovalenten Bindungen kommt, wechselt das PP über nicht-kovalente Bindungen mit dem MHC-I. Folglich könnte es bei hoher IR-Laserleistung auch zu einer Dissoziation des PP/MHC-I-Komplexes im Zuge des LILBID-Ionisierungsprozesses kommen. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der Freisetzung der MHC-I-Bindestelle bei Verwendung des IR-Lasers im *soft mode*. Auf diese Weise sollte es möglich sein, rein auf die UV-Bestrahlung zurückzuführende Effekte zu registrieren. Abbildung 83 zeigt die entsprechenden LILBID-Spektren der beiden untersuchten Allomorphe hinsichtlich einer UV-induzierten Freisetzung der MHC-I-Bindestelle.



**Abbildung 83: LILBID-MS Spektren der UV-induzierten Freisetzung der MHC-I Chaperon-Bindestelle.** Im *soft mode* des IR-Lasers zeigen sich Signale des PP-tragenden MHC-I, als auch bereits freies MHC-I. Durch zusätzliche UV-Bestrahlung kann im Fall des H2-D<sup>b</sup> eine zusätzliche UV-induzierte Freisetzung der Bindestelle detektiert werden. Im Fall des Allomorphs HLA-B\*08:01 zeigt sich indes kein signifikanter Effekt bzgl. einer UV-induzierten Freisetzung der Bindestelle.

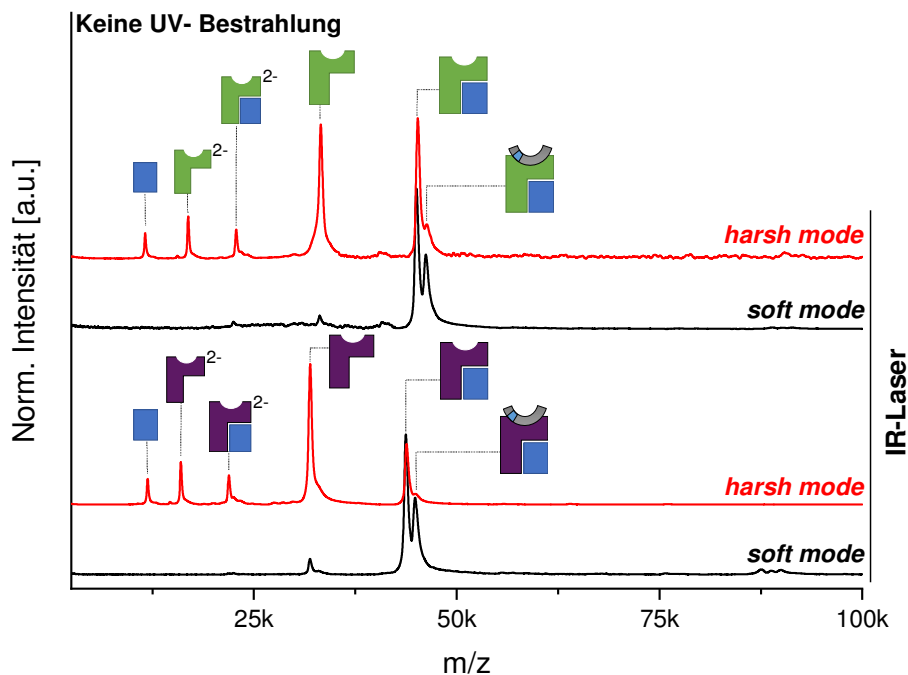
Die Spektren ohne zusätzliche UV-Bestrahlung zeigen in beiden Fällen unter Verwendung des IR-Lasers im *soft mode* je ein Signal, welches dem MHC-I mit gebundenem PP zugeordnet werden kann (siehe Abb 83, schwarz). Das im Spektrum dominanteste Signal entspricht allerdings für beide Allomorphe dem PP-freien MHC-I, was darauf schließen lässt, dass möglicherweise bereits vor der Analyse nicht an jedes MHC-I in Lösung ein PP gebunden gewesen sein könnte. Auch wäre es denkbar, dass das PP trotz *soft mode* bereits durch den IR-Laser im Zuge des Ionisierungsprozesses zum Teil als Ganzes aus der Bindetasche dissoziiert wird und daher die Signalintensität des MHC-I-PP-Komplexes geringer ausfällt als die des PP-freien MHC-I.

Bei Bestrahlung der Analyt-Tröpfchen mit dem UV-Laser (Abb.83, rote Spektren) zeigen die beiden Allomorphe ein voneinander abweichendes Ergebnis. Unabhängig der genutzten UV-Laserleistung kann im Fall des H2-D<sup>b</sup> nur noch ein deutlich schwächeres Signal des intakten MHC-I-PP-Komplexes detektiert werden, was auf eine erfolgreiche, UV-getriggerte Freisetzung der MHC-Bindestelle schließen lässt. Das Allomorph HLA-B\*08:01 hingegen zeigt

sich von einer zusätzlichen UV-Bestrahlung unbeeindruckt und gleicht dem Spektrum ohne UV-Bestrahlung. Eine Freisetzung der Bindestelle auf Grund von UV-Bestrahlung scheint somit in diesem Fall nicht zu erfolgen. Es ist denkbar, dass womöglich eine PP-Spaltung erfolgte, jedoch die einzelnen Fragmente des PP dennoch nicht aus der MHC-I Bindetasche dissoziieren. Ursächlich hierfür könnte wiederum sein, dass die nicht kovalente Wechselwirkung zwischen dem PP und HLA-B\*08:01 stärker ausfällt, als die im Fall des H2-D<sup>b</sup> und seinem PP. Hieraus folgt wiederum, dass mittels LILBID-MS zwischen MHC-I Allomorphen und deren Affinität ein PP zu binden oder freizusetzen differenziert werden kann.

Interessanterweise zeigt sich auch in den Spektren nach UV-Bestrahlung ein deutlich signifikanteres Signal der MHC-I HC, insbesondere beim Allomorph H2-D<sup>b</sup>. Es kann also nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass auch der UV-Laser selbst bei geringer Laserleistung an sich ebenfalls eine gewisse in den Spektren beobachtbare Dissoziation des MHC-I Komplexes begünstigt.

Dass ebenfalls die Leistung des IR-Lasers eine wichtige Rolle hinsichtlich der zu beobachtbaren Freisetzung der MHC-I Bindestelle spielt, bestätigen Messungen im *harsh mode* des IR-Lasers ohne zusätzliche UV-Bestrahlung. Die entsprechenden LILBID-MS Spektren sind in nachfolgender Abbildung 84 dargestellt.



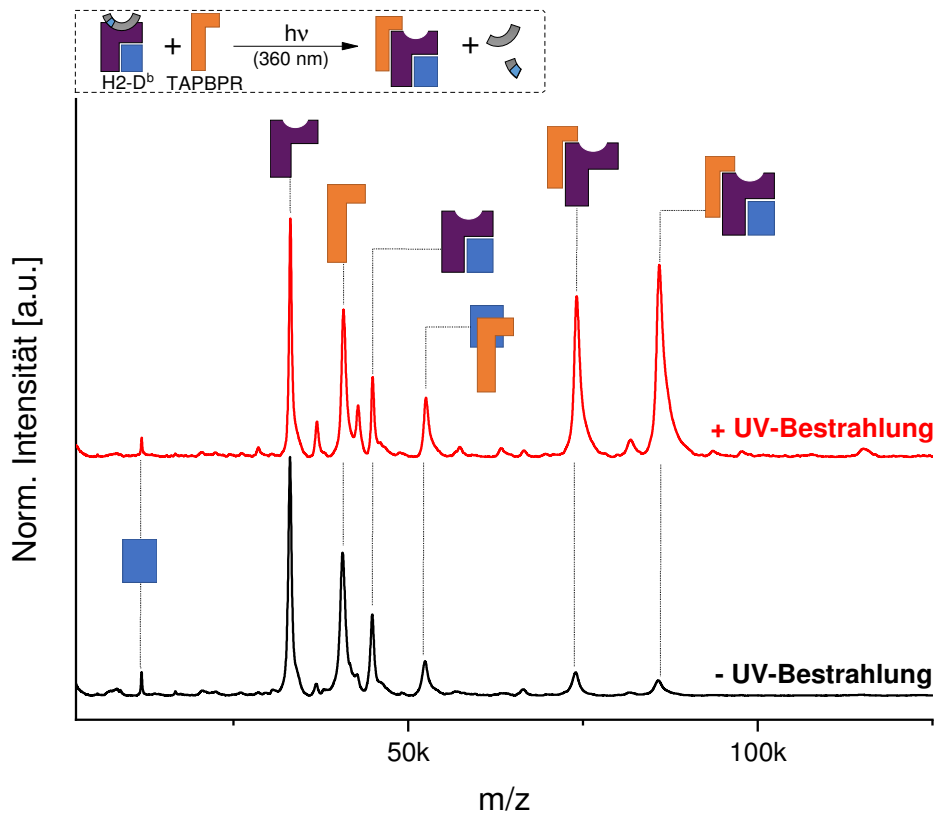
**Abbildung 84:** LILBID-MS Spektren der MHC-I-PP Komplexdissoziation in Abhängigkeit der IR-Laserleistung. Während bei beiden Allomorphen im *soft mode* des IR-Lasers nebst bereits PP-freiem MHC-I auch ein Signal des MHC-I-PP detektiert werden kann zeigt sich im *harsh mode* des IR-Lasers nahezu ausschließlich PP-freies MHC-I. Darüber hinaus sind hierbei Signale des in seine einzelnen Bestandteile dissoziierten MHC-I erkennbar.



Für beide Allomorphe konnte im *harsh mode* des IR-Lasers nur noch ein sehr schwaches Signal eines MHC-I-PP Komplexes detektiert werden. Zudem zeigt sich in den Spektren eine deutliche Dissoziation des MHC-I. So können im *harsh mode* ebenfalls signifikante Signale detektiert werden, die die einzelnen MHC-I Untereinheiten, d.h. die hc und das  $\beta_2m$  alleine, repräsentieren. Da mit zunehmender IR-Laserleistung im LILBID-Ionisationsprozess nicht-kovalente Bindungen mehr und mehr gebrochen werden, ist diese Beobachtung nicht verwunderlich. Folglich muss bei der Analyse und im Zuge einer beobachtbaren Freisetzung der MHC-I Bindestelle bedacht werden, dass zwischen einer UV-induzierten PP-Spaltung und Freisetzung aus der Bindetasche und einer teilweisen IR-induzierten Dissoziation des PP vom MHC-I zu unterscheiden ist.

### 6.5.4 UV-induzierte Komplex-Bildung

In den vorangegangenen Experimenten konnte erfolgreich gezeigt werden, dass sowohl die Spaltung eines PP innerhalb der Analyt-Tröpfchen kurz vor der Ionenfreisetzung durch UV-Bestrahlung induziert als auch eine Freisetzung der MHC-I Bindestelle beobachtet werden kann. Es wurde daher weiterhin untersucht, ob ebenfalls eine UV-induzierte Komplexbildung innerhalb der Analyt-Tröpfchen induziert und detektiert werden kann. Hierzu wurden zunächst die beiden Interaktionspartner MHC-I inklusive des UV-PP und das TAPBPR zusammen in Lösung vorgelegt und ohne zusätzliche UV-Bestrahlung untersucht. Hierbei zeigten die Spektren überwiegend Signale der Einzelkomponenten (siehe Abb. 85, schwarzes Spektrum). Allerdings war es auch möglich bereits schwache Signale eines Komplexes aus MHC-I/TAPBPR zu detektieren. Ursächlich hierfür könnte, die von Thomas & Tampe<sup>175</sup> bereits beobachtete, transiente Wechselwirkung zwischen TAPBPR mit dem MHC-I-Peptid-Komplex sein. Ebenfalls wäre denkbar, dass bereits ein Teil des MHC-I PP-frei vorlag.



**Abbildung 85: LILBID-MS Spektren der UV-induzierten MHC-I Komplex-Bildung mit TAPBPR.** Bereits nicht UV-bestrahlte Proben zeigen einen geringen Anteil an MHC-I/TAPBPR-Komplex. Nach zusätzlicher UV-Bestrahlung kann allerdings eine signifikante Zunahme der Komplex-Bildung beobachtet werden und bestätigt eine erfolgreich induzierte Komplexbildung innerhalb der Analyt-Tröpfchen. Die gezeigten Spektren wurden im *soft mode* des IR-Lasers aufgenommen.

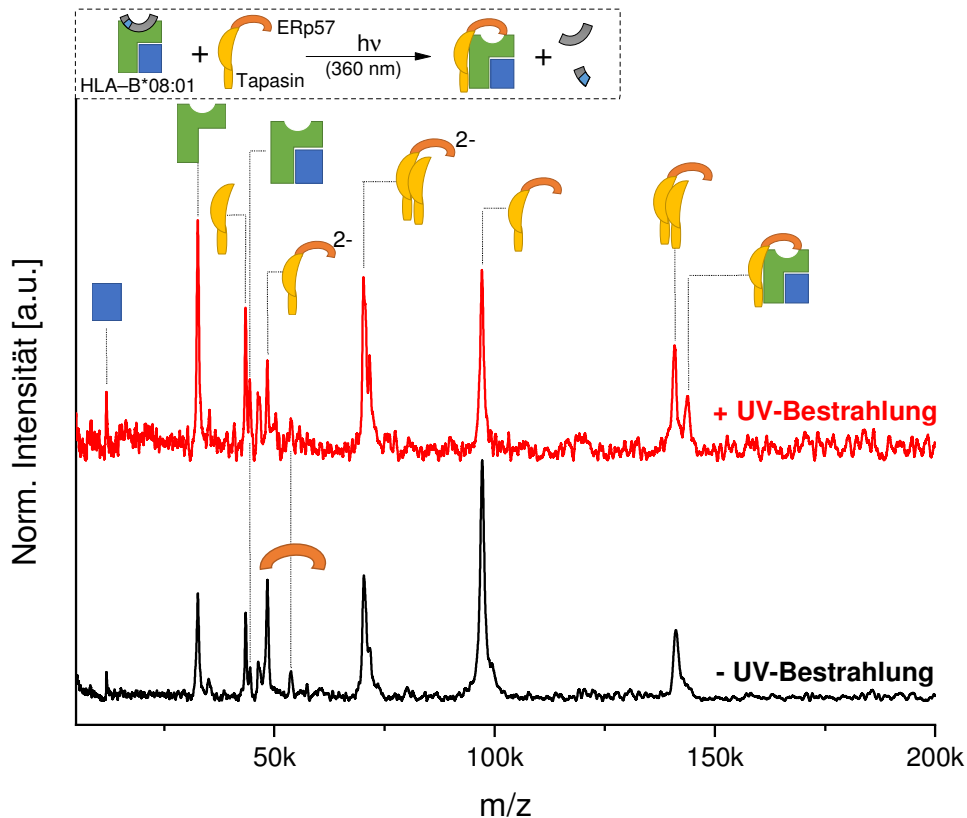
Durch anschließende UV-Bestrahlung der Analyt-Tröpfchen war es möglich die Signale des MHC-I-TAPBPR deutlich zu erhöhen, was auf eine erfolgreich via UV-Bestrahlung induzierte Komplexbildung hinweist (siehe Abb. 85, rotes Spektrum).

Thomas & Tampe zeigten in ihren Studien zur TAPBPR-MHC-I-Komplexbildung, dass nicht nur eine Interaktion zwischen TAPBPR über die hc des MHC-I erfolgt, sondern ebenfalls eine Wechselwirkung über  $\beta_2m$  stattfindet.<sup>175</sup> Auch dies konnte durch ein entsprechendes Signal des  $\beta_2m$ -TAPBPR-Komplexes in den erhaltenen Massenspektren bestätigt werden. Ein deutliches Signal des  $\beta_2m$ -TAPBPR-Komplexes konnte sowohl in Spektren mit als auch ohne UV-Bestrahlung detektiert werden, eine ausgeprägte Komplexbildung des MHC-I-TAPBPR jedoch erst nach UV-Bestrahlung. Dies legt die Vermutung nahe, dass das  $\beta_2m$  womöglich als eine Art Vermittler bei der Interaktion von TAPBPR und MHC-I dienen könnte. Interessant ist ebenfalls das Fragmentierungsmuster des Spektrums nach erfolgter Komplex-Bildung. Hierbei zeigt sich, dass neben einem dominanten Signal des MHC-I-TAPBPR-Komplexes auch ein

signifikantes Signal eines TAPBPR mit der hc des MHC-I detektierbar ist. Das  $\beta_2m$  scheint demnach leicht vom Komplex zu dissoziieren, wohingegen der TAPBPR-HC-Komplex stabiler zu sein scheint. Dies unterstützt die Annahme, dass der Hauptanteil der Interaktion zwischen MHC-I und TAPBPR über die hc vermittelt wird und  $\beta_2m$  womöglich eher nur als Vermittler im Zuge einer ersten transienten Wechselwirkung dient.

Um die beobachtete Komplexbildung zu verifizieren, wurden ebenfalls Experimente unter Verwendung des MHC-I Allomorphs HLA-B\*08:01 durchgeführt. Man geht davon aus, dass dieses mit dem Heterodimer-Komplex Tapasin/ERp57 interagiert. Daher wurden, analog den Experimenten zur TAPBPR-MHC-I-Komplexbildung, das PP-MHC-I zusammen mit Tapasin/ERp57 in Lösung vorgelegt und zunächst ohne zusätzliche UV-Bestrahlung untersucht. Hierbei zeigten die Spektren, analog den vorigen Experimenten, überwiegend Signale der einzelnen Komponenten (siehe Abb. 86, schwarzes Spektrum). Nach zusätzlicher UV-Laserbestrahlung war es möglich ein weiteres, neues Signal zu detektieren, welches einem Komplex aus Tapasin/ERp57 und MHC-I zugeordnet werden konnte (siehe Abb. 86, rotes Spektrum). Die beobachtbare Komplexbildung fällt im Vergleich zu den TAPBPR-Experimenten allerdings deutlich geringer aus. Dies steht wiederum im Einklang mit den Ergebnissen der Analyse bzgl. der UV-induzierten Freisetzung der MHC-I Bindestelle, die zeigten, dass das PP deutlich stärker an der Bindestelle gebunden zu sein scheint.

Geht man davon aus, dass die Interaktion zwischen MHC-I und Tapasin/ERp57 deutlich schwächer ausfällt als im Fall des MHC-I-TAPBPR-Komplexes, so wäre es ebenfalls denkbar, dass auch eine höhere Komplex-Dissoziation bei geringer IR-Laserleistung ursächlich für das lediglich schwach ausgeprägte Signal des Komplexes ist.



**Abbildung 86: LILBID-MS Spektren der UV-induzierten MHC-I Komplex-Bildung mit Tapasin/ERp57.** Vor UV-Bestrahlung können lediglich Signale der einzelnen vorgelegten Proteine detektiert werden (schwarzes Spektrum). Nach UV-Bestrahlung (rotes Spektrum) ist ein weiteres Signal zu erkennen, welches einem sich ausgebildeten MHC-I-Tapasin/ERp57-Komplex entspricht. Die gezeigten Spektren wurden im *soft mode* des IR-Lasers aufgenommen.

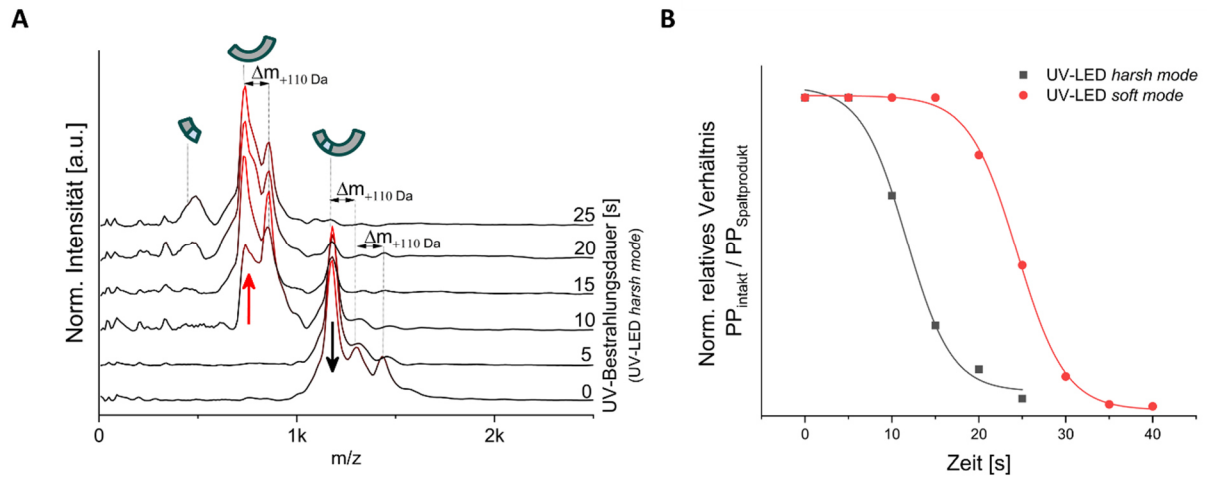
Um zu untersuchen, ob die UV-Laserleistung auf die beobachtbare Komplexbildung einen Einfluss hat, wurden zusätzlich ebenfalls Experimente unter Variation der UV-Laserleistung durchgeführt. Hierbei zeigte sich allerdings kein Unterschied hinsichtlich der zu beobachtbaren Komplexbildung. Ebenfalls wurde das Timing des UV-Bestrahlungsereignisses, analog den Experimenten zur Peptid-Spaltung, variiert. Ein Effekt der Rückschlüsse auf eine zeitliche Information bzgl. Komplexbildung hätte liefern können, war jedoch hierbei ebenfalls nicht feststellbar.

### 6.5.5 Einfluss der UV-Laserleistung auf die Spaltung des photospaltbaren Peptids

In den vorangegangenen Experimenten wurde untersucht, ob es möglich ist eine kinetische Information bzgl. der Peptid-Spaltung zu erhalten. Hierzu wurde das Timing zwischen UV- und IR-Laser, d.h. zwischen Peptid-Spaltung durch den UV-Laser und der Ionenfreisetzung, variiert. Jedoch konnte hierdurch keine zeitliche Information gewonnen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Reaktion entweder sehr schnell ist ( $< \mu\text{s}$ ) und/oder andere Effekte wie die Laserleistung des UV-Lasers für die beobachtbare Spaltung des Peptids eine Rolle spielen könnten. Allerdings war auch im *soft mode* des UV-Lasers kein Unterschied zu erkennen, was wiederum darauf hindeutet, dass entweder die Energie des eingestrahlten UV-Lichts nur eine untergeordnete Rolle für die Spaltungs-Effizienz spielt oder die geringste einstellbare Leistung des UV-Lasers schlicht ausreichend Energie liefern könnte, um eine schnelle und effiziente Spaltung des PP zu induzieren und so die Möglichkeit einen zeitlichen Informationsgewinn zu erhalten zunichtemacht.

Um den Einfluss der UV-Laserleistung auf die Peptid-Spaltung weiter zu untersuchen, wurde diese daher zusätzlich unter Verwendung der implementierten UV-LED zur Bestrahlung der Glaskapillare des Tröpfchenwerfers analysiert (siehe dazu Kapitel 5.4.2). Die Leistung der LED ist deutlich geringer als die des UV-Lasers und kann zudem ebenfalls variiert werden.

Im Rahmen dieser Experimente wurde gelöstes PP in der Kapillare des Tröpfchenwerfers, welche als Reservoir der Probe vor deren Überführung in die Ionenkammer dient, vorgelegt und in Intervallen für je 5 s lang mit UV-Licht (360 nm) bestrahlt. Zwischen den einzelnen Bestrahlungsereignissen wurde die Probe in die Ionenkammer überführt, mittels IR-Laser ionisiert und Spektren aufgenommen. Abbildung 87, A zeigt beispielhaft entsprechend aufgenommene Spektren bei einer hohen UV-LED-Leistung. Zu Beginn des Experiments, d.h. noch vor der ersten UV-Bestrahlung, kann lediglich das intakte PP detektiert werden. Selbiges gilt nach einer Bestrahlungsdauer von 5 s. Ab diesem Punkt zeigen die weiteren aufgenommenen Spektren mit zunehmender Anzahl an Bestrahlungsereignissen nebst einem nach wie vor detektierbaren intakten PP auch erste Signale von gespaltenem PP. Mit weiter fortschreitender Bestrahlungsdauer zeigt sich ein immer schwächer werdendes Signal des intakten PP bis dieses letztlich nicht mehr detektiert werden kann. Das Signal der Spaltprodukte steigt indes zunehmend an, bis letztlich nur noch das Spaltprodukt detektiert werden kann.



**Abbildung 87: Zeitlicher Verlauf der Spaltung des PP in Abhängigkeit der zur Bestrahlung der Kapillare genutzten UV-LED-Leistung. (A)** Spaltung des PP bei hoher UV-LED-Leistung. Mit zunehmender Anzahl an fünfsekündigen Bestrahlungsereignissen verschiebt sich das Verhältnis der Signale von intaktem zu gespaltenem PP. Eine vollständige Spaltung kann nach 25 Sekunden Gesamtbestrahlungsdauer beobachtet werden. **(B)** Vergleich der Spaltungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der UV-LED-Leistung. Bei geringer LED-Leistung dauert eine vollständige Spaltung des Peptids deutlich länger als bei hoher LED-Leistung.

Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen, dass tatsächlich die UV-Leistung eine entscheidende Rolle hinsichtlich der beobachtbaren Spaltung des PP spielt. Dies geht ebenfalls mit der Möglichkeit eine zeitliche Information zu gewinnen einher. Während eine komplette Spaltung im Falle einer hohen LED-Leistung binnen einer Bestrahlungsdauer von insgesamt 25 s erzielt werden konnte, zeigten analoge Messungen bei geringer LED-Leistung eine komplette Spaltung erst nach 35 s (siehe Abb. 87, B). Zudem konnten hierbei erste Spaltprodukte nach einer insgesamt 20 s langen UV-Bestrahlung detektiert werden. Dies untermauert, dass die genutzte UV-Laserleistung, bzw. die auf die Probe übertragene Energie, eine maßgebliche Rolle spielt und berücksichtigt werden muss, um kinetische Informationen gewinnen zu können. Auf Basis der durchgeführten Experimente bleibt allerdings festzuhalten, dass es grundlegend möglich sein sollte mittels LILBID-MS auch kinetische Informationen von UV-induzierten Reaktionen untersuchen zu können.

## 7. Zusammenfassung, Diskussion & Ausblick

### 7.1 Mechanismus der Membraninsertion & Assemblierung des $\Phi$ X174-E

Toxine, wie das Lyse-Protein  $\Phi$ X174-E, sind für eine rekombinante Produktion über klassische zellbasierte Systeme auf Grund ihres hydrophoben Charakters und ihrer bakteriolytischen Aktivität sehr problematisch. Einen Lösungsansatz diese dennoch zu synthetisieren stellt die CFPS dar. So gelang es im Rahmen dieser Arbeit mittels CFPS das Lyse-Protein  $\Phi$ X174-E sowie Derivate von diesem zum ersten Mal in größerem Umfang herzustellen und zu analysieren. Mittels LILBID-MS war es so möglich, erstmals einen näheren Einblick bzgl. der Rolle des Chaperons SlyD für den Lyse-Mechanismus des  $\Phi$ X174-E zu gewinnen. Bei SlyD handelt es sich um ein bi-funktionales Protein, welches eine peptidyl-prolyl-*cis-trans*-Isomerase-Domäne (P-Domäne) und eine IF-Domäne mit grundsätzlicher Chaperon-Aktivität besitzt.<sup>152</sup>

Um den Mechanismus der Membraninsertion und Assemblierung des  $\Phi$ X174-E, sowie die Rolle des SlyD hierbei zu untersuchen, wurden neben dem Vollängen- $\Phi$ X174-E insgesamt vier weitere  $\Phi$ X174-E Konstrukte untersucht. Hierbei handelte es sich zum einen um eine auf die Transmembrandomäne verkürzte  $\Phi$ X174-E-Variante ( $\Phi$ X174-Epep), zum anderen um ein Konstrukt, welches die lösliche Domäne umfasste und an den C-Terminus von GFP fusioniert wurde (GFP-Esol). In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Aminosäure P21 essenziell für die Lyse-Aktivität des  $\Phi$ X174-E ist.<sup>147</sup> Um den Einfluss dieser Aminosäure auf die Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-E näher zu untersuchen, wurden daher ebenfalls mit einer Mutation versehene Konstrukte des  $\Phi$ X174-E und des  $\Phi$ X174-Epep für eine Analyse herangezogen ( $\Phi$ X174-E-P21A bzw.  $\Phi$ X174-Epep-P21A).

Um die Interaktion zwischen  $\Phi$ X174-E und SlyD näher zu charakterisieren, wurde in ersten Experimenten  $\Phi$ X174-E sowie das Konstrukt  $\Phi$ X174-Epep zunächst in An- und Abwesenheit von SlyD mittels CF co-translational synthetisiert und der Einfluss des SlyD hinsichtlich der Solubilisierung von  $\Phi$ X174-E bzw.  $\Phi$ X174-Epep untersucht. Während sich im Falle des  $\Phi$ X174-Epep kein positiver Effekt bzgl. der Solubilisierung zeigte, steigerte die Anwesenheit von SlyD die Löslichkeit des  $\Phi$ X174-E deutlich. Dies legte bereits die Vermutung nahe, dass eine direkte Interaktion zwischen SlyD und  $\Phi$ X174-E stattfinden muss. Dass sich im Fall des  $\Phi$ X174-Epep kein Einfluss auf die Solubilisierung durch SlyD zeigte, ließ wiederum vermuten, dass die

lösliche Domäne des  $\Phi$ X174-E einen entscheidenden Beitrag zur intermolekularen Wechselwirkung zwischen SlyD und  $\Phi$ X174-E leisten muss. Mittels LILBID-MS gelang es schließlich erstmals eine direkte Interaktion bzw. Bindung zwischen SlyD und  $\Phi$ X174-E massenspektrometrisch nachzuweisen.

In weiteren Experimenten unter Verwendung des GFP-Esol-Konstruktes konnte schließlich ebenfalls auch bestätigt werden, dass eine direkte Wechselwirkung von SlyD mit der löslichen Domäne des  $\Phi$ X174-E existiert. In beiden Fällen konnten Komplexe im Verhältnis 1:1 des SlyD mit  $\Phi$ X174-E bzw. GFP-Esol nachgewiesen werden.

Die durchgeführten Solubilisierungsexperimente deuteten darauf hin, dass womöglich eine Insertion von mehreren  $\Phi$ X174-E in eine ND erfolgen könnte. Es blieb jedoch unklar, ob mehrfach insertierte Monomere zu einem Oligomeren-Komplex assemblieren. Diese Frage konnte ebenfalls mittels LILBID-MS in Kombination mit NDs als MM-System geklärt und eine Assemblierung nachgewiesen werden. Die beobachtete Ausbildung von  $\Phi$ X174-E Oligomeren in der Membran stellte hierbei ein Novum dar. Weiterhin konnte unter Verwendung von NDs als MM-System gezeigt werden, dass die Insertion und Assemblierung von  $\Phi$ X174-E in eine Membran nur in Anwesenheit von SlyD zu höheren Oligomeren (bis Hexamer) führt.

Im Zuge dieser Experimente wurde ebenfalls die Rolle der Aminosäure P21 näher untersucht (siehe dazu Tabelle 4).

Spektren des aufgereinigten  $\Phi$ X174-E-P21A/ND Komplexes zeigten dabei sowohl mit als auch ohne SlyD lediglich monomeres  $\Phi$ X174-E-P21A. Selbiges galt für eine CF-Expression in Detergens. Im Gegensatz hierzu zeigte die Punktmutation im Falle des  $\Phi$ X174-Eep-P21A keinen Effekt hinsichtlich der Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-Eep. Bereits in Abwesenheit von SlyD konnte in NDs eine ausgeprägte Oligomer-Verteilung des  $\Phi$ X174-Eep-P21A bis hin zum Decamer beobachtet werden. Die Zugabe von SlyD hatte zudem keinen weiteren Effekt bzgl. des Oligomerisierungsgrades. Dies lässt vermuten, dass eine Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-Eep und der entsprechenden Mutante  $\Phi$ X174-Eep-P21A unabhängig von SlyD ist. Im Fall des Volllängen-Proteins  $\Phi$ X174-E spielt die Aminosäure jedoch für die Oligomerisierung in der ND eine entscheidende Rolle.



Die Oligomerisierung von  $\Phi$ X174-E erfolgt über die Transmembran-Domäne, welche somit das Interface der Assemblierung repräsentiert. Die genaue Rolle der Aminosäure P21 konnte nach wie vor nicht gänzlich geklärt werden und bedarf weiterer Analysen. Die beobachtete Oligomerisierung von  $\Phi$ X174-Epep sowie der entsprechenden Mutante  $\Phi$ X174-Epep-P21A deutet allerdings darauf hin, dass diese Aminosäure für die Assemblierung der isolierten Transmembrandomäne nicht essentiell ist. Dennoch zeigt das Unvermögen der  $\Phi$ X174-E-P21A Mutante zur Oligomerisierung, dass die lösliche Domäne durchaus einen Einfluss auf die Assemblierung des Volllängen-Toxins hat. Eine sterische Behinderung durch  $\Phi$ X174-Esol verhindert womöglich die Ausbildung von Oligomeren von  $\Phi$ X174-E-P21A in der Membran. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies möglicherweise auch durch eine direkte Interaktion mit der Membran resultiert. So sagen Sekundärstrukturanalysen eine helikale Struktur innerhalb des  $\Phi$ X174-Esol voraus, mit einer positiv geladenen Helix-Seite, die möglicherweise an die negativgeladene Membran koordiniert.<sup>126</sup>

**Tabelle 4:** Übersicht der in Ab- oder Anwesenheit von SlyD mittels LILBID-MS detektierten Oligomerspezies des  $\Phi$ X174-E und der untersuchten  $\Phi$ X174-E Konstrukte in NDs.

	<u>Oligomerisierungsgrad</u>			
	$\Phi$ X174-E	$\Phi$ X174-E-[P21A]	$\Phi$ X174-Epep	$\Phi$ X174-Epep-[P21A]
- SlyD	Monomer	Monomer	Hexamer	Decamer
+ SlyD	Hexamer	Monomer	Hexamer	Decamer
<b>Folgerung:</b>	Oligomerisierung durch SlyD	Keine Oligomerisierung durch SlyD	Oligomerisiert unabhängig von SlyD	Oligomerisiert unabhängig von SlyD

Durch ein Liposom-Lyse-Assay war es weiterhin möglich die These zu bekräftigen, dass die Oligomerisierung des  $\Phi$ X174-E zu einer Porenbildung führt. Eine messbar erhöhte Fluoreszenz im Liposom-Lyse-Assay im Fall des  $\Phi$ X174-E verglichen mit  $\Phi$ X174-Epep könnte auf Unterschiede in der Struktur zwischen beiden Konstrukten deuten. Die  $\Phi$ X174-E Assemblierung führt offensichtlich zur Ausbildung von Porenstrukturen, welche nicht oder kaum mit  $\Phi$ X174-Epep oder der entsprechenden Mutante  $\Phi$ X174-Epep-P21A beobachtet werden konnte. Die  $\Phi$ X174-Esol Domäne kann daher womöglich auch strukturell in den  $\Phi$ X174-E/Membran-Komplex eingebunden sein oder alternativ Einfluss auf die Konformation der Transmembrandomäne im Volllängen- $\Phi$ X174-E haben.

Die mittels LILBID-MS nachgewiesene Oligomerisierung innerhalb der membranimitierenden Lipid-Doppelschicht von NDs stellt, wie erwähnt, ein Novum und ein neues Detail bezüglich des  $\Phi$ X174-E Lyse-Mechanismus dar. Man kann davon ausgehen, dass die detektierten hexameren  $\Phi$ X174-E-Oligomere ebenfalls in natürlichen Membranen existieren, da an unterschiedlichen MPs bereits gezeigt werden konnte, dass die ND-Membranen keine künstliche Komplex-Bildung induzieren.<sup>15</sup> Nichtsdestotrotz entsprechen die genutzten ND-Membranen keiner natürlichen Lipid-Zusammensetzung. Auch die physikalischen Charakteristika von NDs, wie z.B. bzgl. Krümmung oder Lipid-Mobilität, unterscheiden sich deutlich von natürlichen Zellmembranen. Folglich können potentielle Effekte dieser Parameter auf das Verhalten von  $\Phi$ X174-E in natürlichen Membranen auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Da MSPs die Größe einer ND grundsätzlich begrenzen, ist es ebenfalls denkbar, dass die Porenbildung in natürlichen weit weniger begrenzten Membranen auch weit mehr Oligomere umfassen könnte. Um diesen Umstand zu klären, würden sich daher Analysen unter Verwendung von größeren NDs anbieten. Allerdings sei an dieser Stelle auch angemerkt, dass das im Vergleich zu  $\Phi$ X174-E weitaus größere PR mit seinen sieben Transmembranhelices ebenfalls als Hexamer in den MSP1E3D1 Platz findet.<sup>13</sup> Folglich sollten die genutzten NDs grundsätzlich genug Platz für mehr als die beobachteten  $\Phi$ X174-E-Hexamere bieten. Dass keine höheren Oligomere als Hexamere detektiert werden konnten, könnte ebenfalls damit zusammenhängen, dass für ausreichend gut aufgelöste Spektren mit verhältnismäßig harschen Laserintensitäten gearbeitet werden musste. Dies könnte wiederum dazu geführt haben, dass höhere Oligomere im Zuge der Ionenfreisetzung dissoziierten und folglich nicht mehr detektierbar waren. Dennoch sind alle analysierten Konstrukte gleichbehandelt worden. Auch wenn evtl. keine Aussage über die maximale Größe der  $\Phi$ X174-E Komplexe getroffen werden kann, so sind die vergleichenden Aussagen und Schlussfolgerungen folglich dennoch definitiv gültig.

## 7.2 Analyse & Optimierung der MP-Solubilisierung durch SapA-Nanopartikel

In den letzten Jahrzehnten haben sich diverse MMs, wie die Nanodisc- und Salipro-Technologie, als Standardmethoden etabliert, um MPs zu solubilisieren. Insbesondere LILBID-MS in Verbindung mit der CFPS und MM-Systemen hat sich als ein mächtiges Werkzeug zur Analyse von MPs erwiesen.<sup>11,13</sup> So konnte auch im Rahmen dieser Arbeit das MM-System der NDs in Kombination mit LILBID-MS erfolgreich genutzt werden, um die SlyD-modulierte Assemblierung des bakteriophagen Lyse-Proteins  $\Phi$ X174-E zu untersuchen.

Eine Analyse von MPs mittels LILBID-MS unter Verwendung von Salipro-Nanopartikeln wurde allerdings bisweilen noch nicht durchgeführt. Aus diesem Grund bestand eines der Ziele dieser Dissertation darin, erstmals zu untersuchen, ob und wie gut sich LILBID-MS eignet, um MPs unter Verwendung von SapA-NPs zu analysieren. Als Modellprotein diente hierbei das bereits vielfach untersuchte PR. Von diesem ist bekannt, dass es in seiner natürlichen Umgebung bevorzugt als Penta- oder Hexameren vorliegt.<sup>157</sup>

Um darüber hinaus die Assemblierungsmodi im CFPS-Systems besser verstehen zu können und die präparativen Bedingungen hinsichtlich der Darstellung eines MPs in SapA-NPs zu optimieren, wurde zudem untersucht, ob und wie welche Parameter der CFPS (wie z.B. die in der CFPS eingesetzte Lipidmenge) einen Einfluss auf die MP-Insertion bzw. deren Solubilisierung in SapA-NPs haben.

In den Experimenten wurde zunächst SapA aus *E. coli* alleine exprimiert und untersucht. Hierbei zeigte sich, dass an SapA aus *E. coli* bereits Lipide anhafteten. Eine weitere Aufreinigung mittels SEC lieferte zwei SapA-Fraktionen. Eine Fraktion enthielt hierbei SapA, an dem nach wie vor Lipide anhafteten (SapA-50) sowie eine Lipid-freie Fraktion (SapA-16).

Um der Frage nachzugehen, ob die verschiedenen SapA-Fraktionen Unterschiede bzgl. der Solubilisierung des PR bzw. der Ausbildung von PR/SapA-NPs aufweisen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Es wurden sowohl mit beiden Fraktionen leere SapA-NPs vorgeformt und der CFPS zugegeben (Pre-Assemblierung) als auch SapA und Lipide in Form von Liposomen der CFPS separat zugeführt (Co-Assemblierung) und hinsichtlich der PR-Solubilisierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Verwendung von SapA-50 in beiden CFPS-Modi nicht möglich ist, höhere PR-Oligomere zu solubilisieren (maximal Tetramer detektierbar). Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Anwesenheit von

*E. coli*-Lipiden bereits zu vorgeformten leeren SapA-NPs führt. Diese sind wiederum zu klein, um höhere PR-Oligomere zu solubilisieren. Bei PR-Darstellung und -Solubilisierung mittels SapA-16 konnten indes auch PR-Oligomere bis hin zum Hexamer detektiert werden.

Auch wurde in Experimenten untersucht, wie sich das SapA/Lipid-Verhältnis auf die Solubilisierung bzw. auf die mittels LILBID-MS detektierbaren Oligomerspezies auswirkt. Bei Verwendung von SapA-50 konnte weder im Co-Assemblierungsmodus noch im Pre-Assemblierungsmodus ein Einfluss bzgl. der Lipid-Konzentration beobachtet werden. Erklären lässt sich dies dadurch, dass in bereits vorgeformte NPs scheinbar keine weiteren Lipide nachträglich eingebaut werden und sich der Größe eines MP-Komplexes folglich nicht mehr so gut anpassen können.

Indes zeigte sich bei Pre-Assemblierung mittels SapA-16 bei steigender Lipidkonzentration, dass einerseits überhaupt erst eine Solubilisierung von PR durch Zugabe von Lipiden erfolgt und andererseits, dass mehr zur Verfügung gestellte Lipide sich positiv auswirken hinsichtlich der Detektion von höheren PR-Oligomeren, die dessen bevorzugtem natürlichen, penta- oder hexameren Oligomerzustand entsprechen. Allerdings waren auch hier die Signale von höheren PR-Oligomeren nicht signifikant vertreten. Es konnte gezeigt werden, dass die mittels SapA-16 vorgeformten NPs sich nur geringfügig in ihrer Größe von NPs des SapA-50 unterscheiden und eine Erhöhung der Lipid-Konzentration nur einen geringen Einfluss auf die Größe der vorgeformten SapA-16-NPs hat. Die sich im Zuge der Pre-Assemblierung in Abwesenheit eines MPs im Fall des SapA-16 vorformenden NPs sind somit hinsichtlich deren Größe ebenfalls limitiert, ähnlich den NPs des SapA-50. Die etwas bessere Solubilisierung höherer PR-Oligomere im Fall des SapA-16 lässt sich damit erklären, dass im Mittel der Anteil an ausreichend großen vorgeformten SapA-16-NPs etwas höher ausfällt als dies bei SapA-50 der Fall ist. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass auch höhere PR-Oligomere bis hin zum Hexamer solubilisiert bzw. detektiert werden können.

Im Fall des Co-Assemblierungsmodus unter Verwendung von SapA-16 zeigte sich im Vergleich zum Pre-Assemblierungsmodus ein gegenläufiger Trend. So konnten bei deutlichem Überschuss an Lipiden (SapA:Lipid-Verhältnis 1:30) mittels LILBID-MS kaum höhere PR-Oligomere detektieren lassen (maximal Tetramer). Dies ist sehr wahrscheinlich auf die verringerte spektrale Auflösung der LILBID-MS Spektren, resultierend aus der Anwesenheit

von (zu) vielen Lipiden, zurückzuführen. Der Einsatz von weniger Lipiden ermöglichte es indes PR-Oligomere bis hin zum Hexamer zu detektieren.

Die im Zuge dieser Experimente erhaltenen Daten legen zudem nahe, dass bei Pre-Assemblierung von SapA-NPs die MP Insertion in einem ähnlich kooperativen Mechanismus wie bei Nanodiscs abzulaufen scheint.<sup>15</sup> Multiple Insertionen sind im Falle von sich geformten kleinen SapA-NPs jedoch unwahrscheinlicher. Folglich können höhere Oligomerspezies nur schlecht oder gar nicht mehr via LILBID-MS detektiert werden.

Ebenfalls wurde untersucht, wie sich die Template-Konzentration hinsichtlich der Qualität von co-assemblierten PR-SapA-NPs auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Template-Konzentration höhere PR Oligomere besser detektiert werden konnten. Dies deutet ebenfalls auf einen kooperativen Insertionsprozess hin. Auch zeigen diese Ergebnisse, dass für eine optimale Darstellung von MPs in SapA-NPs eine starke Expression von Vorteil sein kann.

Die ermittelten Bedingungen für eine optimale CFPS und Solubilisierung von MPs mittels SapA-NPs konnten abschließend erfolgreich auf ein weiteres MP, den *multi-drug*-Transporter EmrE, übertragen werden. So konnte auch dieses MP in seinem natürlichen Oligomerzustand durch SapA solubilisiert und mittels LILBID-MS analysiert werden. Dies unterstreicht das große Potential von LILBID-MS und dem MM-System der Saposine im Hinblick auf die Analyse von MPs.

Als Ergebnis dieser LILBID-MS Analysen des SapA und der PR-SapA-NPs bleibt zudem festzuhalten, dass LILBID-MS eine sehr leistungsfähige Methode ist, um mittels CFPS-System synthetisierte und mit SapA solubilisierte MPs zu untersuchen. Eine Besonderheit, die an dieser Stelle nochmals erwähnt werden soll, stellt die Verwendung von DOPG-Lipiden zur MP-Solubilisierung mittels SapA-NPs dar. DOPG zählt zu einer Gruppe von Lipiden, die im Zuge der LILBID-Ionenfreisetzung grundsätzlich schlechter von MPs in NDs abgestreift werden können und daher in Spektren teils für massive und unerwünschte Lipid-Cluster-Anhaftung an Protein-Signalen sorgen. Dies wiederum erschwert nicht nur die Auswertung, sondern kann im schlimmsten Fall zu einem Informationsverlust führen, da Signale nicht ausreichend aufgelöst werden können. Die Analysen unter Verwendung von SapA-NPs mit DOPG-Lipiden zeigten keine unerwünschten Lipid-Cluster in den LILBID-MS Spektren. Folglich eignet sich das MM-

System der SapA-NPs auch für LILBID-MS Analysen in Verbindung mit eigentlich herausfordernden Lipiden. Es stellt somit aus Sicht der massenspektrometrischen Analyse eine leistungsstarke Alternative zu MSP-NDs dar, um MPs zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wäre es sicher auch von Interesse zu untersuchen, ob und wie sich der Anwendungsbereich von LILBID, in Kombination von Salipros mit anderen für den LILBID-Ionisierungsprozess bislang ungeeigneten Lipiden, erweitern lässt.

### 7.3 Histidinkinasen SpaK & NisK

Auf Grund der immer öfter auftretenden Antibiotikaresistenz werden Bacteriocine, wie z.B. Lantibiotika, intensiv als Alternativen für Antibiotika erforscht. Bei Bacteriocinen handelt es sich um kleine toxische Peptide aus Bakterien, die das Wachstum artgleicher oder nahe verwandter Bakterien-Stämme hemmen oder diese abtöten.<sup>18</sup> Die meisten Lantibiotika agieren als Autoinduktoren und aktivieren ihre eigene Biosynthese in Bakterien.<sup>20,22</sup>

Trotz intensiver Forschung sind bis dato die Mechanismen, mit denen Bakterienzellen es schaffen die Anwesenheit von Lantibiotika zu erkennen, noch weitestgehend ungeklärt, da sich die Isolation eines (funktionalen) MPs üblicherweise immer wieder als schwierig und limitierenden Faktor erweist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Konzepte erarbeitet, um unter anderem die Histidinkinase SpaK aus *B. subtilis*, die eine wichtige Rolle bei der autoinduktiven Biosynthese des Lantibiotikums Subtilin spielt, funktional zu isolieren.

SpaK wurde auf zwei Wegen isoliert bzw. solubilisiert, um es für eine Analyse zugänglich zu erhalten, zum einen mittels Detergens, zum anderen unter Verwendung von SMALPs. Bei SMALPs handelt es sich um ein MM-System, welches es ermöglicht Membranproteine samt ihrer natürlichen Lipidumgebung zu isolieren und zu untersuchen. Lipide können eine bedeutende Rolle für die Aktivität eines Membranproteins spielen.<sup>7</sup> Dies zeigte sich ebenfalls bei Untersuchungen der Aktivität des SpaK. Mittels Autophosphorylierungsassay wurde dieses sowohl solubilisiert mittels Detergens als auch solubilisiert mittels SMALPs auf seine Funktionalität hin untersucht. Hierbei zeigte das Detergens-solubilierte SpaK keine Aktivität, das SpaK in SMALPs hingegen war vollständig aktiv. Dies lässt den Rückschluss zu, dass einerseits die Extraktion mittels Detergens zu harsch sein könnte oder aber andererseits (spezifische) Lipide für SpaK und dessen Aktivität eine wesentliche Rolle spielen könnten. Wie

genau der Einfluss der Lipide auf SpaK aussieht, kann an dieser Stelle jedoch nur gemutmaßt werden. Möglicherweise haben die Lipide Einfluss auf die Konformation des SpaK und/oder aber sie spielen eine Rolle als Vermittler im Zuge der Interaktion mit dem Lantibiotikum. Dies bedarf weiterer Analysen.

Hellwig & Peetz *et al.*<sup>11</sup> berichteten davon, dass LILBID-MS im Gegensatz zu anderen MS-Methoden, wie ESI, grundsätzlich sehr gut geeignet ist Proteine aus SMALPs zu untersuchen. Allerdings gelang es bis dato auch mittels LILBID-MS nicht, hierbei den natürlichen Oligomerzustand eines MPs ohne die es umgebenden SMALPs und Lipide zu erhalten bzw. massenspektrometrisch zu erfassen.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es jedoch für die Histidinkinase SpaK aufzuzeigen, dass es mittels LILBID-MS auch möglich ist via SMALPs solubilierte MPs hinsichtlich ihres natürlichen Oligomerzustandes und frei von SMALPs zu detektieren. So war es nicht nur möglich für Detergens-solubiliertes SpaK den vermuteten dimeren Oligomerzustand zu detektieren und nachzuweisen, sondern auch für SpaK aus SMALPs.

Weiterhin wurde erstmals für ein Protein aus SMALPs massenspektrometrisch eine Liganden-Interaktion nachgewiesen. So konnte in Lantibiotika-Inkubationsexperimenten der Nachweis einer Interaktion des SpaK mit Subtilin erbracht werden, sowohl für Detergens-solubiliertes SpaK, als auch für SpaK aus SMALPs.

Neben der Inkubation mit Subtilin wurde SpaK ebenfalls mit zwei weiteren Lantibiotika inkubiert und analysiert. Zum einen wurde hierbei eine Mutante genutzt, von der bekannt ist, dass sie keine Aktivität des SpaK indiziert und demnach vermutlich auch nicht in der Lage ist an SpaK zu binden. Dies konnte ebenfalls durch LILBID-MS bestätigt werden, da im Gegensatz zum Wildtyp des Subtilin, im Fall der Mutante C11A, keine Komplexbildung mit SpaK detektiert werden konnte. Auch wurde SpaK mit Nisin inkubiert. Bei Nisin handelt es sich um ein Lantibiotikum, welches seine autoinduktive Biosynthese über die Histidinkinase NisK aktiviert. NisK ist dem SpaK sehr ähnlich, entstammt allerdings einem anderen Organismus, dem Bakterium *Lactococcus lactis*. In vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass auch das Lantibiotikum Nisin wohl an SpaK binden kann, dieses allerdings nicht aktiviert.

Die durchgeführten Analysen bestätigen, dass auch Nisin bis zu einem gewissen Maße an SpaK binden kann, womöglich dessen Bindungsaffinität allerdings deutlich geringer ausfällt. So fielen die bei gleichen Messbedingungen detektierten Komplexe aus Lantibiotikum und Histidinkinase im Fall des Nisin und SpaK in den Spektren weit weniger ausgeprägt aus als im

Fall des Subtilin mit SpaK. Zwar kann auf Basis der durchgeführten LILBID-MS Analysen keine quantitative Aussage bezüglich der Bindungsstärke getroffen werden, allerdings kann man auf Basis dieser Beobachtung davon ausgehen, dass Nisin im Zuge des Ionisierungsprozesses leichter von SpaK abzustreifen war. Dies legt wiederum nahe, dass eine Nisin-Bindung an SpaK zwar grundsätzlich möglich ist, Nisin jedoch womöglich eine deutlich schwächere nicht-kovalente Wechselwirkung mit SpaK eingeht.

Im Zuge der LILBID-MS Experimente wurde neben dem Vollängen SpaK auch drei weitere SpaK-Konstrukte untersucht. Hierbei handelte es sich zum einen um eine gekürzte Variante, die nur die Dimerisierungsdomäne umfasste, zum anderen um zwei Varianten der Subtilin-Sensordomäne, bei der einmal die Dimerisierungsdomäne durch GFP ersetzt und einmal komplett abgeschnitten wurde. Hierbei zeigte sich, dass scheinbar nicht nur die Dimerisierungsdomäne alleine dafür verantwortlich zu sein scheint, dass SpaK einen Homo-Dimer ausbildet, sondern dass ebenfalls der membranständige Teil, welcher die Sensordomäne umfasst, seinen Beitrag zur Ausbildung des SpaK-Dimers leistet.

In den Analysen der Sensordomäne zeigten die LILBID-MS Daten zudem, dass offenbar auch bis zu zwei Subtilin-Liganden am SpaK binden können, was insofern nicht überrascht, da jeder Monomer des SpaK-Homo-Dimers eine Subtilin-Bindestelle besitzt. Allerdings waren die Signale eines SpaK-Komplexes mit zwei gebundenen Subtilin-Molekülen deutlich schwächer ausgeprägt. Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, dass, nachdem ein Subtilin gebunden hat, die zweite potentiell vorhandene Bindestelle im Homo-Dimer des SpaK für Subtilin womöglich sterisch abgeschirmt und folglich schlechter zugänglich ist. Die Bindung eines zweiten Subtilins könnte folglich schwächer ausfallen, was sich dadurch bemerkbar machte, dass ein SpaK-Komplex mit zwei Subtilin-Liganden im Zuge der Ionisation leichter dissoziiert werden konnte.

Dass nur im Falle der Sensordomänen-Konstrukte die Bindung eines weiteren, zweiten Subtilin Moleküls detektiert werden konnte, könnte allerdings auch auf eine Konformationsabweichung in diesem SpaK-Derivat zurückzuführen sein, die durch das Fehlen der Dimerisierungsdomäne oder durch den Austausch der Dimerisierungsdomäne mit GFP induziert wurde. Diese Konformationsabweichung könnte es überhaupt erst ermöglicht haben, dass die zwei Bindestellen der dimeren Sensordomäne weit genug auseinanderliegen, sodass sich zwei Subtilin-Liganden folglich sterisch weniger gegenseitig behindern und daher binden konnten.



Berücksichtigt man, dass im Volllängen SpaK aus SMALPs kein SpaK-Dimer-Subtilin-Komplex detektiert werden konnte, lässt sich allerdings auch festhalten, dass, obgleich zwei Bindestellen vorhanden sind, die Besetzung einer von beiden Bindestellen scheinbar ausreichend für eine Aktivierung des SpaK zu sein scheint. Auch kann spekuliert werden, dass es womöglich dabei keine Rolle spielt, welche der beiden Bindestellen zuerst besetzt wird, d.h. die Bindestellen des SpaK-Homodimers gleichwertig sein könnten. Das Vorhandensein zweier Bindestellen könnte wiederum einer effektiveren Sensierung durch Subtilin dienen bzw. diese erlauben. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für weitere Forschung auf diesem Gebiet.

In weiteren Experimenten gelang es ebenfalls eine Bindung des Lantibiotikums Nisin an seine spezifische Histidinkinase NisK aus *Lactococcus lactis* erstmalig nachzuweisen. Zudem konnte auch für NisK erstmals massenspektrometrisch nachgewiesen werden, dass dieses als Dimer vorliegt. Die bisherigen Ergebnisse basieren allerdings nur auf Analysen eines Detergens-solubilisierten NisK. Eine SpaK-analoge Isolierung des NisK via SMALPs könnte ein weiteres System für künftige Bindungs- und insbesondere Aktivitäts-Analysen liefern.

Lantibiotika-Produzenten verfügen über ein Immunsystem, um sich vor dem eigens produzierten Lantibiotikum zu schützen. Dieses besteht im Fall des Subtilin aus einem ABC-Transporter (SpaFEG) und einer weiteren Komponente, die als Spal bezeichnet wird. Während bereits gezeigt werden konnte, dass die durch den ABC-Transporter SpaFEG vermittelte Immunität auf dem Transport der Lantibiotika-Moleküle in den extrazellulären Raum beruht, ist der genaue Wirkmechanismus des Lipoproteins Spal noch nicht bekannt.<sup>165,167,166</sup> *Cross-linking* Experimente deuteten bereits auf eine direkte Bindung zwischen Subtilin und Spal hin.<sup>172</sup> Bislang gelang es aber nicht, eine direkte Interaktion zwischen Spal und dem Lantibiotikum nachzuweisen. Auch dieses Problem konnte im Rahmen dieser Arbeit gelöst werden. So gelang es erstmalig eine direkte Interaktion/Bindung des Lantibiotikums Subtilin mit dem Immunitätsprotein Spal nachzuweisen. Die LILBID-MS Spektren zeigten Spal sowohl als Monomer als auch in Form eines Dimers. Weitere Analysen zeigten, dass ungeachtet des oligomeren Zustands des Spals, dieses im Zuge der Immunitätsantwort sehr wahrscheinlich nur mit einem Subtilin interagiert. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings bedacht werden, dass es sich bei dem untersuchten Spal um ein Lipoprotein handelt, welches in der Membran verankert vorliegt. Für die LILBID-MS Analysen wurde allerdings auf eine verkürzte und lösliche Variante zurückgegriffen.

#### 7.4 UV-schaltbare Lipide in NDs

Lipide spielen insbesondere für MPs hinsichtlich deren Konformation, Funktion oder auch im Zuge der Oligomerisierung eine wichtige Rolle, weshalb es von besonderem Interesse ist spezifisch mit MPs interagierende Lipide zu identifizieren. Unterschiedliche Studien mittels nativer MS haben gezeigt, dass an MPs bei Überführung in die Gasphase einige Lipide gebunden bleiben und es daher möglich ist Protein-Lipid-Komplexe zu detektieren.<sup>194</sup> Allerdings erschweren hierbei gegebenenfalls unspezifisch gebundene Lipide eine Analyse. Auch in Bezug auf den Ionisierungsprozess bei der LILBID-MS eignet sich nicht jedes Lipid gleichermaßen. So können etwa manche in Verbindung mit NDs genutzten Lipide bei der Ionisierung vom MSP und den zu untersuchenden Proteinen nicht oder nur schlecht abgestreift werden, was sich in den Spektren als Lipid-Cluster-Anhaftungen an Protein-Signalen widerspiegelt. Diese Lipid-Anhaftungen können im schlimmsten Fall zu einem Informationsverlust führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob es möglich ist diese problematischen Lipid-Anhaftungen an in NDs solubilisierten Proteinen durch den Einsatz von UV-schaltbaren Lipiden zu reduzieren. Die Idee hierbei bestand darin, durch UV-Bestrahlung das Schalten von UV-schaltbaren Lipiden (FAAzo4PC) und eine damit einhergehende Konformationsänderung der Lipide zu induzieren, dadurch wiederum schwach gebundene unspezifische Lipide abzustreifen und gleichzeitig wiederum stärker am Protein gebundene spezifische Lipide identifizieren zu können.

Es wurden zunächst leere NDs mit den drei Lipiden DMPG, DOPG und DMPC jeweils in Kombination mit dem photoschaltbaren Lipid FAAzo4PC in unterschiedlichem Verhältnis präpariert und untersucht. Für DOPG und DMPC ist bekannt, dass diese sich im LILBID-Ionenfreisetzungsprozess schlecht aus der ND bzw. vom MSP abstreifen lassen, wohingegen DMPG gut vom MSP abgestreift werden kann. NDs mit dem Lipid DMPG dienten daher als Kontrolle, um zu verifizieren, dass das FAAzo4PC seinerseits keine Lipid-Cluster ausbildet oder begünstigt. Dies konnte in den Experimenten mit DMPG-NDs auch bestätigt werden. Zudem zeigten sich in allen untersuchten NDs, dass die am MSP anhaftenden Lipide von den jeweils genutzten Lipiden DOPC, DOPG und DMPG stammten und nicht vom photoschaltbaren Lipid. Das FAAzo4PC hat demnach seinerseits keine in den LILBID-MS-Spektren störenden,

kontraproduktiven Lipid-Cluster zur Folge und scheint selbst gut vom MSP im Ionisierungsprozess abgestreift werden zu können.

Für DOPG/FAAzo4PC NDs konnte gezeigt werden, dass mit höherem Anteil an UV-schaltbarem Lipid mehr der unerwünschten Lipid-Cluster entfernt werden können. Ein Effekt, ungeachtet des Lipid/FAAzo4PC-Verhältnisses, konnte im Fall des Lipids DOPC jedoch nicht beobachtet werden. In weiteren Experimenten wurde zudem untersucht und gezeigt, dass weder die UV-Laserintensität noch die UV-Bestrahlungsdauer einen Einfluss hinsichtlich einer effektiveren Lipid-Cluster-Minimierung hat.

Da lediglich NDs unter Verwendung des Lipids DOPG in Verbindung mit FAAzo4PC zu einer Reduzierung von Lipid-Clustern in den LILBID-MS-Spektren führten, wurde diese Lipidkombination in NDs genutzt, um PR zu solubilisieren und zu analysieren. Hierbei zeigte sich, dass grundsätzlich NDs, die FAAzo4PC und DOPG Lipide enthalten, eine Solubilisierung von MPs ermöglichen. Allerdings konnte auch im Rahmen dieser Experimente keine signifikante Verbesserung der spektralen Auflösung durch eine UV-induzierte Konformationsänderung des FAAzo4PC und einer damit einhergehenden erhöhten Abspaltung an DOPG vom Protein erreicht werden. Vermutlich lagern sich mehr DOPG als FAAzo4PC Lipide in Proteinnähe an, sodass deren Konformationsänderung nicht zu einer gewünschten vermehrten Abspaltung der Protein-nahen, unspezifisch gebundenen Lipiden führt. Andererseits wäre denkbar, dass die Kohlenwasserstoffkette der Schwanzgruppe des FAAzo4PC nicht ausreichend lang sein könnte, um einen signifikanten Einfluss hinsichtlich des Abspaltens anderer Lipide von einem Protein zu erwirken. Daher ist es sicher von Interesse, die gezeigten Experimente mit einem hinsichtlich der Kohlenwasserstoffkette modifizierten bzw. verlängerten photoschaltbaren Lipid zu untersuchen.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich ein stärkerer Effekt durch Erhöhung der IR-Laserleistung hinsichtlich der Reduzierung von unerwünschten Lipid-Clustern bemerkbar macht. Daher kann es ebenfalls von Interesse sein, künftig die Möglichkeit zu schaffen die Analyt-Tropfen mit höherer IR-Laserleistung zu bestrahlen. Dies könnte beispielsweise durch Tropfen-Bestrahlung mit einem weiteren IR-Laser realisiert werden. Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass eine erhöhte IR-Laserleistung mit einer stärkeren Dissoziation von Proteinkomplexen einhergehen kann. Auch könnten bei zu hoher

IR-Laserleistung ebenfalls spezifisch gebundene Lipide mit abgestreift werden. Eine sorgsame Anpassung bzw. Erhöhung der Laserleistung wäre für derartige Experimente daher unerlässlich.

## 7.5 UV-induzierte Komplexbildung

Licht hat sich als ein hervorragendes Werkzeug in der Analytik etabliert, welches es erlaubt biologische Prozesse örtlich, zeitlich und darüber hinaus sehr selektiv zu kontrollieren. Das gezielte Triggern einer Protein-Protein-Interaktion kann z.B. durch sog. *photo-cleaving* induziert und durch den Einsatz von PLS ermöglicht werden.

Bisweilen bietet die native MS kaum Möglichkeiten schnelle, licht-induzierte Reaktionen zu analysieren und kinetische Informationen hierfür zu gewinnen. Daher beschäftigte sich ein weiterer Teil dieser Dissertation damit zu untersuchen, ob und wie sich lichtgesteuerte Reaktionen mittels LILBID-MS induzieren und ggf. zeitlich analysieren lassen könnten. Hierfür wurde das von Thomas & Tampe<sup>175</sup> genutzte Prinzip adaptiert, mit dem die Komplexbildung des heterodimeren MHC-I/TAPBPR unter Verwendung eines photospaltbaren Peptids erfolgreich charakterisiert werden konnte.

MHC-I besitzt eine Bindestelle, an der TAPBPR binden kann. Die Bindestelle kann durch ein PP blockiert werden. Durch UV-Bestrahlung kann wiederum die Spaltung des PP induziert werden, was zur Freigabe der Bindestelle führt und es erlaubt bei gleichzeitiger Anwesenheit von TAPBPR und MHC-I in Lösung eine Licht-getriggerte Komplexbildung zu beobachten.<sup>175</sup>

Um besagte Komplexbildung mittels LILBID-MS induzieren und analysieren zu können, wurde ein UV-Laser zusätzlich zum IR-Laser in die Ionenkammer eingespiegelt. Die Laser wurden so gekoppelt, dass ein UV-Bestrahlungsereignis der einzelnen Analyt-Tröpfchen auf einer  $\mu$ s-Zeitskala direkt vor oder nach der Ionenfreisetzung durch den IR-Laser erfolgen kann. Ein einzelner Analyt-Tropfen dient somit als Reaktionskammer für die Komplexbildung. Die Reaktionszeit ( $\Delta t$ ) ist dabei definiert über die Zeit zwischen UV-Bestrahlung und Freisetzung der Ionen und kann auf einer  $\mu$ s-Zeitskala variiert werden. Über die Variation der Reaktionszeit sollte somit eine Information über die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelbar sein.

In ersten Experimenten wurde die erfolgreiche Spaltung des PP aufgezeigt sowie die UV-induzierte Abspaltung des PP von MHC-I. Hierbei zeigte sich, dass innerhalb der Analyt-Tröpfchen erfolgreich und effizient eine Spaltung des Peptids sowie eine Freisetzung der MHC-I Bindestelle induziert und detektiert werden kann. Ebenfalls gelang es in weiteren Experimenten eine TAPBPR/MHC-I Komplexbildung zu induzieren und zu detektieren. Allerdings brachte eine Bestrahlungsverzögerung zwischen UV- und IR-Laser nicht den gewünschten zeitlichen Informationsgewinn, weder im Fall der Spaltung des PP noch hinsichtlich der Komplexbildung. Dies legt nahe, dass die ablaufende Reaktion entweder sehr schnell sein muss ( $< \mu\text{s}$ ) und/oder andere Effekte eine Rolle spielen, wie bspw. die Leistung des UV-Lasers bzw. die hierbei auf die Tropfen und Reaktionspartner übertragene Energie einen Einfluss auf die beobachtbare Kinetik besitzt. Eine Variation der UV-Laserleistung brachte hierüber jedoch keinen Aufschluss und bedarf daher einer genaueren Untersuchung. Da angenommen wurde, dass bereits die geringste einstellbare Leistung des UV-Lasers ausreichend Energie liefern könnte, um eine schnelle und effiziente Spaltung des PP bzw. eine Reaktion zu induzieren, wurden weiterhin Experimente durchgeführt, in denen die Spaltung des Peptids via Bestrahlung mit einer deutlich leistungsärmeren UV-LED induziert wurde. Diese wurde über dem Tröpfchenwerfer bzw. dessen Glaskapillare implementiert. Die Kapillare des Tröpfchenwerfers diente hierbei als Reservoir und Reaktionskammer für die Probe. Diese wurde in Intervallen für je 5 s lang bestrahlt. Zwischen den einzelnen Bestrahlungsereignissen wurde die Probe in die Ionenkammer überführt und Spektren aufgenommen. Es zeigte sich, dass bei Verwendung der UV-LED tatsächlich mit fortschreitender Bestrahlungsdauer ein Anstieg der Signalintensität des PP-Spaltprodukts detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde das Signal des intakten PP zunehmend schwächer und konnte letztlich gar nicht mehr detektiert werden, was wiederum auf eine vollständig erfolgte Spaltung des Peptids schließen lässt. Während eine komplette Spaltung im Falle einer hohen LED-Leistung binnen 25 s erzielt werden konnte, zeigten analoge Messungen bei geringer LED-Leistung eine komplette Spaltung des PP erst nach 35 s. Dies untermauert die Annahme, dass die genutzte UV-Leistung bzw. die auf die Probe übertragene Energie eine maßgebliche Rolle hinsichtlich des beobachtbaren zeitlichen Ablaufs der Spaltung des PP spielt und berücksichtigt werden muss, wenn kinetische Informationen gewonnen werden sollen.

Obgleich diese Messungen einen zeitlichen Verlauf der Peptidspaltung aufzeigen und belegen, dass mittels LILBID-MS grundsätzlich zeitliche Informationen bzgl. UV-induzierter Reaktionen gewonnen werden können, müssen die ermittelten Zeiten der Peptidspaltung an sich mit Bedacht betrachtet werden. So wurden die hierbei aufgenommenen Spektren über mehrere einzelne Analyt-Tropfen aufsummiert. Jeder Tropfen stellt allerdings nur einen Auszug aus dem gesamten Reaktionsvolumen dar. Eine genaue Konzentration der einzelnen Komponenten und ob diese reagiert haben oder nicht, kann folglich nicht klar definiert werden. Einen weiteren Aspekt, den es hinsichtlich dieser Experimente zu berücksichtigen gilt, stellt die Tatsache dar, dass keine Informationen erhalten werden konnten, aus welchem Material genau die Glaskapillare des Tröpfchenwerfers besteht. So ist es denkbar, dass diese einen Teil des UV-Lichts absorbierte. Dies sollte zwar beim Vergleich zwischen den beiden Experimenten mit unterschiedlicher LED-Leistung keine Rolle spielen, stellt allerdings ein Problem dar, wenn es darum geht die LED-Leistung mit der Spaltungsgeschwindigkeit bzw. Spaltungseffizienz zu korrelieren.

Ein weiteres Problem welches bei diesen Experimenten bedacht werden sollte, stellt die Temperatur dar, die ebenfalls eine Rolle auf die Peptidspaltung gehabt haben könnte. So zeigten Temperaturmessungen, dass die LED je nach eingestellter Leistung unterschiedlich und teils bis zu 70 °C heiß wurde. Die, bedingt durch den Aufbau des LILBID-Setups, räumliche Nähe der UV-LED zur Glaskapillare und folglich zur Probe macht es sehr wahrscheinlich, dass sich diese ebenfalls erwärmte und folglich einen Effekt auf die Geschwindigkeit der Spaltung gehabt haben könnte.

Weiterhin ist bekannt, dass die Intensität einzelner Signale in LILBID-MS stark mit dem Winkel korreliert, in dem der Laser den Tropfen trifft. Folglich könnte auch das Aufsummieren über einzelne Tröpfchen bei der Spektrenaufnahme ein Problem bzgl. der Gewinnung von kinetischen Informationen darstellen, insbesondere auch hinsichtlich einer Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Dieses Problem könnte durch eine qLILBID-analoge Auswertung der Daten, d.h. via Analyse einzelner Analyt-Tropfen, umgangen werden.<sup>196</sup>

Da es grundsätzlich möglich war eine PP-Spaltung zu induzieren und eine Komplexbildung zu detektieren, bleibt festzuhalten, dass LILBID-MS großes Potential besitzt kinetische Informationen bzgl. schnellen Licht-induzierten Reaktionen zu gewinnen. Um die beschriebenen Probleme, wie etwa hinsichtlich Temperatur bei Bestrahlung mittels UV-LED

oder eine zu hohe Leistung des UV-Lasers zu umgehen, würde es sich anbieten das Setup weiter zu modifizieren. So könnte beispielsweise eine in der Leistung variabelere UV-Bestrahlungsquelle über eine Glasfaser in die Anlage eingespiegelt werden, um einzelne Tropfen zu bestrahlen. Alternativ könnte man die Leistung des UV-Lasers durch Filter oder eine längere Weglänge des Laserstrahls abschwächen.

Abschließend sei an dieser Stelle noch einmal erwähnt welche flexible, vielseitige und hervorragende native massenspektrometrische Ionisationsmethode LILBID darstellt, um biologische Systeme zu untersuchen und zu charakterisieren. LILBID-MS zeichnet sich beispielsweise durch seine verhältnismäßig hohe Toleranz gegenüber verschiedensten Pufferzusammensetzungen aus. Es besteht die Möglichkeit sowohl Biomolekülkomplexe intakt hinsichtlich ihres natürlichen Oligomierzustands zu analysieren als auch diese zur Charakterisierung bewusst in ihre Subkomplexe zu dissoziieren. Ebenso eignet sich LILBID-MS hervorragend zur Durchführung von Liganden-Bindungsstudien, um nur einige Anwendungsbeispiele zu nennen. Vor allem in Kombination mit MM-Systemen zur Analyse von Membranproteinen zeigt sich die besondere Bedeutung und nahezu einzigartige Stärke von LILBID-MS. So konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht nur erstmals gezeigt werden, dass sich LILBID-MS auch zur Analyse von MPs unter Verwendung des MM-Systems der Saposine eignet. Es konnten ebenfalls in Kombination mit den MM-Systemen der NDs und SMALPs zahlreiche biologische Fragestellungen geklärt werden, sei es bzgl. des Assemblierungsmechanismus' und der Membraninsertion des  $\Phi$ X174-E oder der Lantibiotika-Bindungsstudien im Zuge der Charakterisierung der Histidininkinase SpaK. Auch konnte in Experimenten zur UV-induzierten Komplexbildung gezeigt werden, welche weiterhin großes Potenzial LILBID-MS noch birgt und wie dessen Anwendungsgebiet künftig sogar noch erweitert werden kann.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	beta-amyloid
Abb.	Abbildung
Abu	$\alpha$ -Aminobuttersäure
AFM	<i>atomic force microscopy</i> ; dt. Atomkraftmikroskopie
ATD	<i>arrival time distribution</i> ; dt. Ankunftszeitverteilung
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	<i>arbitrary unit</i> ; dt. willkürliche Einheit
Brij 35	Polyoxyethylenlaurylether
C	Coulomb
CCS	<i>collision cross-section</i> ; dt. Kollisionsquerschnitt
CEM	<i>chain ejection model</i>
CF	<i>cell-free</i> ; dt. zellfrei
CFPS	<i>cell-free protein synthesis</i> ; dt. zellfreie Protein-Synthese
CID	<i>collision induced dissociation</i> ; dt. kollisionsinduzierte Dissoziation
CRM	<i>charge residue model</i>
Cryo-EM	Cryo-Elektronenmikroskopie
Da	Dalton
DC	<i>direct current</i> ; dt. Gleichstrom
Dha	2,3-Didehydroalanin
Dhb	(Z)-2,3-Didehydrobutyrin
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
DMPC	<i>1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DMPG	<i>1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol</i>
DOPG	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>electrospray ionisation</i> ; dt. Elektrosprayionisation
FWHM	<i>full width at half maximum</i> ; dt. Halbwertsbreite
GC	Gaschromatographie
GFP	grün fluoreszierendes Protein



hc	<i>heavy chain</i> ; dt. schwere Kette
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> ; dt. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICR	Ionencyclotronresonanz
IEM	<i>ion evaporation model</i>
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
IR	Infrarot
kDa	Kilo-Dalton
LILBID	<i>laser induced liquid bead ion desorption</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i> ; dt. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MCP	<i>microchannel plate</i> ; dt. Mikrokanalplatte
MD	Molekulardynamik
MDa	Mega-Dalton
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ; dt. Haupthistokompatibilitätskomplex
MM	<i>membrane-mimic</i> ; dt. Membran-Imitation
MP	Membranprotein
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
MSDC	<i>Micro Spin Desalting Column</i>
MSP	<i>membrane scaffold protein</i> ; dt. Membran-Gerüstprotein
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
nESI	nano Elektrosprayionisation
ND	Nanodisc
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> ; dt. Kernspinresonanz
NP	Nano-Partikel
OPO	Optisch parametrischer Oszillator
PC	Phosphatidylcholin
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> ; dt. Potential des Wasserstoffs

pl	isoelektrischer Punkt
PL	photoschaltbares Lipid
PLC	<i>peptide loading complex</i> ; dt. Peptid-Beladungskomplex
PLS	photolabilen Schutzgruppe
PP	photospaltbares Peptid
PR	Proteorhodopsin
RiPPs	ribosomal synthetisierte, post-translational modifizierte Peptide
SAXS	<i>small-angle X-ray scattering</i> ; dt. Kleinwinkelstreuung von Röntgenstrahlen
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; dt. Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> ; dt. Größenausschlusschromatographie
SEM	<i>standard error of the mean</i> ; dt. Standardfehler des Mittelwertes
SMA	Styrol-Maleinsäureanhydrid
SMALP	<i>styrene-maleic acid lipid particle</i> ; dt. Styrol-Maleinsäure Lipid-Partikel
UV	ultraviolett
TOF	<i>time-of-flight</i> ; dt. Flugzeit
TR	<i>time-resolved</i> ; dt. zeit-aufgelöst
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## 9. Literaturverzeichnis

- (1) Coon, J. J.; Syka, J. E. P.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. *BioTechniques* **2005**, DOI: 10.2144/05384TE01.
- (2) Barth, M.; Schmidt, C. *Journal of mass spectrometry: JMS* **2020**, DOI: 10.1002/jms.4578.
- (3) Heck, A. J. R. *Nature methods* **2008**, DOI: 10.1038/nmeth.1265.
- (4) Morgner, N.; Barth, H.-D.; Brutschy, B. *Aust. J. Chem.* **2006**, DOI: 10.1071/CH05285.
- (5) Oliver Peetz. *Method development to investigate non-covalently bound membrane proteins with native mass spectrometry*: Frankfurt am Main, 2018.
- (6) Seddon, A. M.; Curnow, P.; Booth, P. J. *Biochimica et biophysica acta* **2004**, DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.04.011.
- (7) Kehlenbeck, D.-M.; Josts, I.; Nitsche, J.; Busch, S.; Forsyth, V. T.; Tidow, H. *Biological chemistry* **2019**, DOI: 10.1515/hsz-2019-0171.
- (8) Jones, A. J. Y.; Gabriel, F.; Tandale, A.; Nietlispach, D. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2020**, DOI: 10.3390/molecules25204729.
- (9) Popot, J.-L. *Annual review of biochemistry* **2010**, DOI: 10.1146/annurev.biochem.052208.114057.
- (10) Chen, A.; Majdinasab, E. J.; Fiori, M. C.; Liang, H.; Altenberg, G. A. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2020**, DOI: 10.3389/fbioe.2020.598450.
- (11) Hellwig, N.; Peetz, O.; Ahdash, Z.; Tascón, I.; Booth, P. J.; Mikusevic, V.; Diskowski, M.; Politis, A.; Hellmich, Y.; Hänelt, I.; Reading, E.; Morgner, N. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2018**, DOI: 10.1039/C8CC06284F.
- (12) Viegas, A.; Viennet, T.; Etzkorn, M. *Biological chemistry* **2016**, DOI: 10.1515/hsz-2016-0224.
- (13) Henrich, E.; Peetz, O.; Hein, C.; Laguerre, A.; Hoffmann, B.; Hoffmann, J.; Dötsch, V.; Bernhard, F.; Morgner, N. *eLife* **2017**, DOI: 10.7554/eLife.20954.
- (14) Henrich, E.; Sörmann, J.; Eberhardt, P.; Peetz, O.; Mezhyrova, J.; Morgner, N.; Fendler, K.; Dötsch, V.; Wachtveitl, J.; Bernhard, F.; Bamann, C. *Biophysical journal* **2017**, DOI: 10.1016/j.bpj.2017.03.026.
- (15) Peetz, O.; Henrich, E.; Laguerre, A.; Löhr, F.; Hein, C.; Dötsch, V.; Bernhard, F.; Morgner, N. *Analytical chemistry* **2017**, DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03309.
- (16) Young, K. D.; Young R. *Journal of virology* **1982** (44), 993–1002.
- (17) Romero-Calle, D.; Guimarães Benevides, R.; Góes-Neto, A.; Billington, C. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* **2019**, DOI: 10.3390/antibiotics8030138.
- (18) Cotter, P. D.; Ross, R. P.; Hill, C. *Nature reviews. Microbiology* **2013**, DOI: 10.1038/nrmicro2937.
- (19) Chatterjee, C.; Paul, M.; Xie, L.; van der Donk, W. A. *Chemical reviews* **2005**, DOI: 10.1021/cr030105v.
- (20) Christoph Geiger. *Untersuchung der Lantibiotika Autoinduktion in Lactococcus lactis und Bacillus subtilis*: Frankfurt am Main, 2019.

- (21) Spieß, T.; Korn, S. M.; Kötter, P.; Entian, K.-D. *Applied and environmental microbiology* **2015**, DOI: 10.1128/AEM.02392-15.
- (22) Tobias Spieß. *Spezifität der Subtilin- und Nisin-vermittelten Aktivierung der Histidinkinasen SpaK in Bacillus subtilis und NisK in Lactococcus lactis*: Frankfurt am Main, 2015.
- (23) Frauenfeld, J.; Löving, R.; Armache, J.-P.; Sonnen, A. F.-P.; Guettou, F.; Moberg, P.; Zhu, L.; Jegerschöld, C.; Flayhan, A.; Briggs, J. A. G.; Garoff, H.; Löw, C.; Cheng, Y.; Nordlund, P. *Nature methods* **2016**, DOI: 10.1038/nmeth.3801.
- (24) Pyle, E.; Kalli, A. C.; Amillis, S.; Hall, Z.; Lau, A. M.; Hanyaloglu, A. C.; Diallinas, G.; Byrne, B.; Politis, A. *Cell chemical biology* **2018**, DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.03.011.
- (25) Stangl, M.; Schneider, D. *Biochimica et biophysica acta* **2015**, DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.03.011.
- (26) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. *Chemical reviews* **2013**, DOI: 10.1021/cr300177k.
- (27) Morstein, J.; Impastato, A. C.; Trauner, D. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2021**, DOI: 10.1002/cbic.202000449.
- (28) Wang, P. *Asian Journal of Organic Chemistry* **2013**, DOI: 10.1002/ajoc.201200197.
- (29) Tan, S.; Tan, H. T.; Chung, M. C. M. *Proteomics* **2008**, DOI: 10.1002/pmic.200800597.
- (30) Guidotti, G. *Annual review of biochemistry* **1972**, DOI: 10.1146/annurev.bi.41.070172.003503.
- (31) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2008**, DOI: 10.1038/nrm2330.
- (32) Watson, H. *Essays in biochemistry* **2015**, DOI: 10.1042/bse0590043.
- (33) Harayama, T.; Riezman, H. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2018**, DOI: 10.1038/nrm.2017.138.
- (34) Frick, M.; Schmidt, C. *Chemistry and physics of lipids* **2019**, DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.04.001.
- (35) Lingwood, D.; Simons, K. *Science (New York, N.Y.)* **2010**, DOI: 10.1126/science.1174621.
- (36) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A. *Journal of lipid research* **2005**, DOI: 10.1194/jlr.E400004-JLR200.
- (37) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R. C.; Nishijima, M.; Raetz, C. R. H.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M. J. O.; Dennis, E. A. *Journal of lipid research* **2009**, DOI: 10.1194/jlr.R800095-JLR200.
- (38) Klose, C.; Surma, M. A.; Simons, K. *Current opinion in cell biology* **2013**, DOI: 10.1016/j.ceb.2013.03.005.
- (39) Frick, M.; Schmidt, C. *Biospektrum* **2019**, DOI: 10.1007/s12268-019-1017-y.
- (40) Yang, K.; Han, X. *Trends in biochemical sciences* **2016**, DOI: 10.1016/j.tibs.2016.08.010.
- (41) Goñi, F. M. *Molecular membrane biology* **2002**, DOI: 10.1080/0968768021000035078.

- (42) Klein, P.; Kanehisa, M.; DeLisi, C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1985**, DOI: 10.1016/0005-2736(85)90375-X.
- (43) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science (New York, N.Y.)* **1972**, DOI: 10.1126/science.175.4023.720.
- (44) Lee, A. G. *Biochemical Society transactions* **2011**, DOI: 10.1042/BST0390761.
- (45) Killian, J.A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1998**, DOI: 10.1016/s0304-4157(98)00017-3.
- (46) Lee, A.G. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2003**, DOI: 10.1016/s0005-2736(03)00056-7.
- (47) Lee, A. G. *Biochimica et biophysica acta* **2004**, DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.05.012.
- (48) Milovanovic, D.; Honigmann, A.; Koike, S.; Göttfert, F.; Pähler, G.; Junius, M.; Müller, S.; Diederichsen, U.; Janshoff, A.; Grubmüller, H.; Risselada, H. J.; Eggeling, C.; Hell, S. W.; van den Bogaart, G.; Jahn, R. *Nature communications* **2015**, DOI: 10.1038/ncomms6984.
- (49) Kucerka, N.; Perlmutter, J. D.; Pan, J.; Tristram-Nagle, S.; Katsaras, J.; Sachs, J. N. *Biophysical journal* **2008**, DOI: 10.1529/biophysj.107.122465.
- (50) Shinzawa-Ittoh, K.; Aoyama, H.; Muramoto, K.; Terada, H.; Kurauchi, T.; Tadehara, Y.; Yamasaki, A.; Sugimura, T.; Kurono, S.; Tsujimoto, K.; Mizushima, T.; Yamashita, E.; Tsukihara, T.; Yoshikawa, S. *The EMBO journal* **2007**, DOI: 10.1038/sj.emboj.7601618.
- (51) Lange, C.; Nett, J. H.; Trumpower, B. L.; Hunte, C. *The EMBO journal* **2001**, DOI: 10.1093/emboj/20.23.6591.
- (52) Palsdottir, H.; Hunte, C. *Biochimica et biophysica acta* **2004**, DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.06.012.
- (53) O'Donnell, V. B.; Dennis, E. A.; Wakelam, M. J. O.; Subramaniam, S. *Science signaling* **2019**, DOI: 10.1126/scisignal.aaw2964.
- (54) Janmey, P. A.; Kinnunen, P. K. J. *Trends in cell biology* **2006**, DOI: 10.1016/j.tcb.2006.08.009.
- (55) Schultz, C. *Nature chemical biology* **2010**, DOI: 10.1038/nchembio.389.
- (56) Bumpus, T. W.; Baskin, J. M. *Trends in biochemical sciences* **2018**, DOI: 10.1016/j.tibs.2018.09.011.
- (57) Höglinger, D.; Nadler, A.; Schultz, C. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, DOI: 10.1016/j.bbalip.2014.03.012.
- (58) Frank, J. A.; Moroni, M.; Moshourab, R.; Sumser, M.; Lewin, G. R.; Trauner, D. *Nature communications* **2015**, DOI: 10.1038/ncomms8118.
- (59) Hamada, T.; Sugimoto, R.; Nagasaki, T.; Takagi, M. *Soft Matter* **2011**, DOI: 10.1039/C0SM00797H.
- (60) Pernpeintner, C.; Frank, J. A.; Urban, P.; Roeske, C. R.; Pritzl, S. D.; Trauner, D.; Lohmüller, T. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2017**, DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01020.
- (61) Urban, P.; Pritzl, S. D.; Ober, M. F.; Dirscherl, C. F.; Pernpeintner, C.; Konrad, D. B.; Frank, J. A.; Trauner, D.; Nickel, B.; Lohmueller, T. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2020**, DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b02942.

- (62) Suzuki, Y.; Nagai, K. H.; Zinchenko, A.; Hamada, T. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2017**, DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00448.
- (63) Doroudgar, M.; Morstein, J.; Becker-Baldus, J.; Trauner, D.; Glaubitz, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, DOI: 10.1021/jacs.1c03524.
- (64) Henrich, E.; Ma, Y.; Engels, I.; Münch, D.; Otten, C.; Schneider, T.; Henrichfreise, B.; Sahl, H.-G.; Dötsch, V.; Bernhard, F. *The Journal of biological chemistry* **2016**, DOI: 10.1074/jbc.M115.664292.
- (65) Zhou, H.-X.; Cross, T. A. *Annual review of biophysics* **2013**, DOI: 10.1146/annurev-biophys-083012-130326.
- (66) Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. *Nanoscale research letters* **2013**, DOI: 10.1186/1556-276X-8-102.
- (67) Sharma, A. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, DOI: 10.1016/S0378-5173(97)00135-X.
- (68) Cuello, L. G.; Romero, J. G.; Cortes, D. M.; Perozo, E. *Biochemistry* **1998**, DOI: 10.1021/bi972997x.
- (69) Marty, M. T.; Hoi, K. K.; Robinson, C. V. *Accounts of chemical research* **2016**, DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00379.
- (70) Demmers, J. A.; van Duijn, E.; Haverkamp, J.; Greathouse, D. V.; Koeppe, R. E.; Heck, A. J.; Killian, J. A. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, DOI: 10.1074/jbc.M101401200.
- (71) Frick, M.; Hofmann, T.; Haupt, C.; Schmidt, C. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2018**, DOI: 10.1007/s00216-018-1113-8.
- (72) Bayburt, T. H.; Grinkova, Y. V.; Sligar, S. G. *Nano Lett.* **2002**, DOI: 10.1021/nl025623k.
- (73) Frauenfeld, J.; Gumbart, J.; van der Sluis, E. O.; Funes, S.; Gartmann, M.; Beatrix, B.; Mielke, T.; Berninghausen, O.; Becker, T.; Schulten, K.; Beckmann, R. *Nature structural & molecular biology* **2011**, DOI: 10.1038/nsmb.2026.
- (74) Denisov, I. G.; Grinkova, Y. V.; Lazarides, A. A.; Sligar, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, DOI: 10.1021/ja0393574.
- (75) Li, Y.; Kijac, A. Z.; Sligar, S. G.; Rienstra, C. M. *Biophysical journal* **2006**, DOI: 10.1529/biophysj.106.087072.
- (76) Denisov, I. G.; Sligar, S. G. *Nature structural & molecular biology* **2016**, DOI: 10.1038/nsmb.3195.
- (77) Denisov, I. G.; Sligar, S. G. *Chemical reviews* **2017**, DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00690.
- (78) Hagn, F.; Etzkorn, M.; Raschle, T.; Wagner, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, DOI: 10.1021/ja310901f.
- (79) Marty, M. T.; Zhang, H.; Cui, W.; Blankenship, R. E.; Gross, M. L.; Sligar, S. G. *Analytical chemistry* **2012**, DOI: 10.1021/ac302663f.
- (80) Rouck, J. E.; Krapf, J. E.; Roy, J.; Huff, H. C.; Das, A. *FEBS letters* **2017**, DOI: 10.1002/1873-3468.12706.
- (81) Henrich, E.; Dötsch, V.; Bernhard, F. *Methods in enzymology* **2015**, DOI: 10.1016/bs.mie.2014.12.016.
- (82) Marty, M. T.; Wilcox, K. C.; Klein, W. L.; Sligar, S. G. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, DOI: 10.1007/s00216-013-6790-8.

- (83) Reid, D. J.; Keener, J. E.; Wheeler, A. P.; Zambrano, D. E.; Diesing, J. M.; Reinhardt-Szyba, M.; Makarov, A.; Marty, M. T. *Analytical chemistry* **2017**, DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03569.
- (84) Keener, J. E.; Zambrano, D. E.; Zhang, G.; Zak, C. K.; Reid, D. J.; Deodhar, B. S.; Pemberton, J. E.; Prell, J. S.; Marty, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, DOI: 10.1021/jacs.8b11529.
- (85) Flayhan, A.; Mertens, H. D. T.; Ural-Blimke, Y.; Martinez Molledo, M.; Svergun, D. I.; Löw, C. *Structure (London, England : 1993)* **2018**, DOI: 10.1016/j.str.2018.01.007.
- (86) Lyons, J. A.; Bøggild, A.; Nissen, P.; Frauenfeld, J. *Methods in enzymology* **2017**, DOI: 10.1016/bs.mie.2017.06.035.
- (87) Jamshad, M.; Lin, Y.-P.; Knowles, T. J.; Parslow, R. A.; Harris, C.; Wheatley, M.; Poyner, D. R.; Bill, R. M.; Thomas, O. R. T.; Overduin, M.; Dafforn, T. R. *Biochemical Society transactions* **2011**, DOI: 10.1042/BST0390813.
- (88) Domínguez Pardo, J. J.; Koorengevel, M. C.; Uwugiaren, N.; Weijers, J.; Kopf, A. H.; Jahn, H.; van Walree, C. A.; van Steenberg, M. J.; Killian, J. A. *Biophysical journal* **2018**, DOI: 10.1016/j.bpj.2018.05.032.
- (89) Scheidelaar, S.; Koorengevel, M. C.; Pardo, J. D.; Meeldijk, J. D.; Breukink, E.; Killian, J. A. *Biophysical journal* **2015**, DOI: 10.1016/j.bpj.2014.11.3464.
- (90) Xue, M.; Cheng, L.; Faustino, I.; Guo, W.; Marrink, S. J. *Biophysical journal* **2018**, DOI: 10.1016/j.bpj.2018.06.018.
- (91) Thomson, J. J. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1897**, DOI: 10.1080/14786449708621070.
- (92) Dempster, A. J. *Phys. Rev.* **1918**, DOI: 10.1103/PhysRev.11.316.
- (93) Aston, F. W. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1919**, DOI: 10.1080/14786441208636004.
- (94) Siuzdak, G. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation* **2004**, DOI: 10.1016/j.jala.2004.01.004.
- (95) Watson, J. T.; Sparkman, O. D. *Introduction to mass spectrometry*, 4th edn.; Wiley: Chichester, 2009.
- (96) Gross, J. H. *Massenspektrometrie*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013.
- (97) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Shi, S. D. H. *Analytical chemistry* **2002**, DOI: 10.1021/ac022010j.
- (98) Pól, J.; Strohal, M.; Havlíček, V.; Volný, M. *Histochemistry and cell biology* **2010**, DOI: 10.1007/s00418-010-0753-3.
- (99) Medhe, S. *Mass Spectrom Purif Tech* **2018**, DOI: 10.4172/2469-9861.1000126.
- (100) Haag, A. M. *Advances in experimental medicine and biology* **2016**, DOI: 10.1007/978-3-319-41448-5\_7.
- (101) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass spectrometry*, 3rd edn.; Wiley: Chichester, 2011.
- (102) Koppelaar, D. W.; Barinaga, C. J.; Denton, M. B.; Sperline, R. P.; Hieftje, G. M.; Schilling, G. D.; Andrade, F. J.; Barnes, J. H. *Analytical chemistry* **2005**, DOI: 10.1021/ac053495p.

- (103) Bechara, C.; Robinson, C. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, DOI: 10.1021/jacs.5b00420.
- (104) Bich, C.; Zenobi, R. *Current opinion in structural biology* **2009**, DOI: 10.1016/j.sbi.2009.08.004.
- (105) Schmidt, C.; Robinson, C. V. *The FEBS journal* **2014**, DOI: 10.1111/febs.12707.
- (106) Bai, X.-c.; McMullan, G.; Scheres, S. H. W. *Trends in biochemical sciences* **2015**, DOI: 10.1016/j.tibs.2014.10.005.
- (107) Schmidt, M. J.; Fedoseev, A.; Bücken, D.; Borbas, J.; Peter, C.; Drescher, M.; Summerer, D. *ACS chemical biology* **2015**, DOI: 10.1021/acscchembio.5b00512.
- (108) Glasscock, J. M.; Zhu, Y.; Chowdhury, P.; Tang, J.; Gai, F. *Biochemistry* **2008**, DOI: 10.1021/bi8012406.
- (109) Snijder, J.; Rose, R. J.; Veessler, D.; Johnson, J. E.; Heck, A. J. R. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2013**, DOI: 10.1002/anie.201210197.
- (110) Loo, J. A. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, DOI: 10.1002/(SICI)1098-2787(1997)16:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-L.
- (111) Lengqvist, J.; Svensson, R.; Evergren, E.; Morgenstern, R.; Griffiths, W. J. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, DOI: 10.1074/jbc.M310958200.
- (112) Morgner, N.; Kleinschroth, T.; Barth, H.-D.; Ludwig, B.; Brutschy, B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, DOI: 10.1016/j.jasms.2007.04.013.
- (113) Peetz, O.; Hellwig, N.; Henrich, E.; Mezhyrova, J.; Dötsch, V.; Bernhard, F.; Morgner, N. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2019**, DOI: 10.1007/s13361-018-2061-4.
- (114) Kleinekofort, W.; Pfenninger, A.; Plomer, T.; Griesinger, C.; Brutschy, B. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1996**, DOI: 10.1016/S0168-1176(96)04507-7.
- (115) Kleinekofort, W.; Avdiev, J.; Brutschy, B. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1996**, DOI: 10.1016/0168-1176(95)04330-6.
- (116) Wattenberg, A.; Sobott, F.; Barth, H.-D.; Brutschy, B. *Eur. J. Mass Spectrom.* **1999**, DOI: 10.1255/ejms.251.
- (117) Nina Morgner. *Mass spectrometry of biomolecules from micro-droplets*: Frankfurt am Main, 2008.
- (118) Wiley, W. C.; McLaren, I. H. *Review of Scientific Instruments* **1955**, DOI: 10.1063/1.1715212.
- (119) Young, W.A.P.; Ridley, R. G.; Daly, N. R. *Nuclear Instruments and Methods* **1967**, DOI: 10.1016/0029-554X(67)90011-0.
- (120) Wolf, M. *Phys. Unserer Zeit* **1981**, DOI: 10.1002/piuz.19810120305.
- (121) Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S. *Analytical chemistry* **2013**, DOI: 10.1021/ac302789c.
- (122) Juraschek, R.; Dülcks, T.; Karas, M. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, DOI: 10.1016/S1044-0305(98)00157-3.
- (123) Benesch, J. L. P.; Ruotolo, B. T.; Simmons, D. A.; Robinson, C. V. *Chemical reviews* **2007**, DOI: 10.1021/cr068289b.



- (124) Woods, L. A.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, DOI: 10.1016/j.bbapap.2012.10.002.
- (125) Smith, D. P.; Knapman, T. W.; Campuzano, I.; Malham, R. W.; Berryman, J. T.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E. *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)* **2009**, DOI: 10.1255/ejms.947.
- (126) Mezhyrova, J.; Martin, J.; Peetz, O.; Dötsch, V.; Morgner, N.; Ma, Y.; Bernhard, F. *The FEBS journal* **2021**, DOI: 10.1111/febs.15642.
- (127) Marty, M. T.; Baldwin, A. J.; Marklund, E. G.; Hochberg, G. K. A.; Benesch, J. L. P.; Robinson, C. V. *Analytical chemistry* **2015**, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00140.
- (128) Marty, M. T.; Zhang, H.; Cui, W.; Gross, M. L.; Sligar, S. G. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2014**, DOI: 10.1007/s13361-013-0782-y.
- (129) Hoi, K. K.; Bada Juarez, J. F.; Judge, P. J.; Yen, H.-Y.; Di Wu; Vinals, J.; Taylor, G. F.; Watts, A.; Robinson, C. V. *Nano Lett.* **2021**, DOI: 10.1021/acs.nanolett.0c04911.
- (130) Chen, Y.-C.; Urban, P. L. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, DOI: 10.1016/j.trac.2012.11.010.
- (131) Rob, T.; Wilson, D. J. *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)* **2012**, DOI: 10.1255/ejms.1176.
- (132) Tobias Lieblein. *Time-Resolved Mass Spectrometry*: Frankfurt am Main, 2019.
- (133) Lee, J. K.; Kim, S.; Nam, H. G.; Zare, R. N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, DOI: 10.1073/pnas.1503689112.
- (134) Miao, Z.; Chen, H.; Liu, P.; Liu, Y. *Analytical chemistry* **2011**, DOI: 10.1021/ac200842e.
- (135) Zinck, N.; Stark, A.-K.; Wilson, D. J.; Sharon, M. *ChemistryOpen* **2014**, DOI: 10.1002/open.201402002.
- (136) Lieblein, T.; Zangl, R.; Martin, J.; Hoffmann, J.; Hutchison, M. J.; Stark, T.; Stirnal, E.; Schrader, T.; Schwalbe, H.; Morgner, N. *eLife* **2020**, DOI: 10.7554/eLife.59306.
- (137) Stark, T.; Lieblein, T.; Pohland, M.; Kalden, E.; Freund, P.; Zangl, R.; Grewal, R.; Heilemann, M.; Eckert, G. P.; Morgner, N.; Göbel, M. W. *Biochemistry* **2017**, DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00223.
- (138) Ankenbruck, N.; Courtney, T.; Naro, Y.; Deiters, A. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2018**, DOI: 10.1002/anie.201700171.
- (139) Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2012**, DOI: 10.1002/anie.201202134.
- (140) Olszak, T.; Latka, A.; Roszniowski, B.; Valvano, M. A.; Drulis-Kawa, Z. *Current medicinal chemistry* **2017**, DOI: 10.2174/0929867324666170413100136.
- (141) Bernhardt, T. G.; Wang, I.-N.; Struck, D. K.; Young, R. *Research in Microbiology* **2002**, DOI: 10.1016/s0923-2508(02)01330-x.
- (142) W Lubitz; M Szostak; G Halfmann; U Bläsi; G Wanner; A Witte.
- (143) Witte, A.; Bläsi, U.; Halfmann, G.; Szostak, M.; Wanner, G.; Lubitz, W. *Biochimie* **1990**, DOI: 10.1016/0300-9084(90)90145-7.

- (144) Schön, P.; Schrot, G.; Wanner, G.; Lubitz, W.; Witte, A. *FEMS microbiology reviews* **1995**, DOI: 10.1111/j.1574-6976.1995.tb00203.x.
- (145) Langemann, T.; Koller, V. J.; Muhammad, A.; Kudela, P.; Mayr, U. B.; Lubitz, W. *Bioengineered bugs* **2010**, DOI: 10.4161/bbug.1.5.12540.
- (146) Witte, A.; Wanner, G.; Bläsi, U.; Halfmann, G.; Szostak, M.; Lubitz, W. *Journal of bacteriology* **1990**, DOI: 10.1128/jb.172.7.4109-4114.1990.
- (147) Tanaka, S.; Clemons, W. M. *Molecular microbiology* **2012**, DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08153.x.
- (148) Witte, A.; Schrot, G.; Schön, P.; Lubitz, W. *Molecular microbiology* **1997**, DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.5781941.x.
- (149) Bernhardt, T. G.; Roof, W. D.; Young, R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, DOI: 10.1073/pnas.97.8.4297.
- (150) Maratea, D.; Young, K.; Young, R. *Gene* **1985**, DOI: 10.1016/0378-1119(85)90022-8.
- (151) Roof, W. D.; Horne, S. M.; Young, K. D.; Young, R. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, DOI: 10.1016/S0021-9258(17)42027-8.
- (152) Weininger, U.; Haupt, C.; Schweimer, K.; Graubner, W.; Kovermann, M.; Brüser, T.; Scholz, C.; Schaarschmidt, P.; Zoldak, G.; Schmid, F. X.; Balbach, J. *Journal of molecular biology* **2009**, DOI: 10.1016/j.jmb.2009.01.034.
- (153) Mendel, S.; Holbourn, J. M.; Schouten, J. A.; Bugg, T. D. H. *Microbiology (Reading, England)* **2006**, DOI: 10.1099/mic.0.28776-0.
- (154) O'Brien, J. S.; Kishimoto, Y. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1991**, DOI: 10.1096/fasebj.5.3.2001789.
- (155) Popovic, K.; Holyoake, J.; Pomès, R.; Privé, G. G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, DOI: 10.1073/pnas.1115743109.
- (156) Reckel, S.; Gottstein, D.; Stehle, J.; Löhr, F.; Verhoefen, M.-K.; Takeda, M.; Silvers, R.; Kainosho, M.; Glaubitz, C.; Wachtveitl, J.; Bernhard, F.; Schwalbe, H.; Güntert, P.; Dötsch, V. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2011**, DOI: 10.1002/anie.201105648.
- (157) Maciejko, J.; Mehler, M.; Kaur, J.; Lieblein, T.; Morgner, N.; Ouari, O.; Tordo, P.; Becker-Baldus, J.; Glaubitz, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, DOI: 10.1021/jacs.5b03606.
- (158) Morrison, E. A.; DeKoster, G. T.; Dutta, S.; Vafabakhsh, R.; Clarkson, M. W.; Bahl, A.; Kern, D.; Ha, T.; Henzler-Wildman, K. A. *Nature* **2011**, DOI: 10.1038/nature10703.
- (159) Sikora, C. W.; Turner, R. J. *Biophysical journal* **2005**, DOI: 10.1529/biophysj.104.049247.
- (160) Ubarretxena-Belandia, I.; Baldwin, J. M.; Schuldiner, S.; Tate, C. G. *The EMBO journal* **2003**, DOI: 10.1093/emboj/cdg611.
- (161) Bierbaum, G.; Sahl, H.-G. *Current pharmaceutical biotechnology* **2009**, DOI: 10.2174/138920109787048616.
- (162) Arnison, P. G.; Bibb, M. J.; Bierbaum, G.; Bowers, A. A.; Bugni, T. S.; Bulaj, G.; Camarero, J. A.; Campopiano, D. J.; Challis, G. L.; Clardy, J.; Cotter, P. D.; Craik, D. J.; Dawson, M.; Dittmann, E.; Donadio, S.; Dorrestein, P. C.; Entian, K.-D.; Fischbach, M. A.; Garavelli, J. S.; Göransson, U.; Gruber, C.

W.; Haft, D. H.; Hemscheidt, T. K.; Hertweck, C.; Hill, C.; Horswill, A. R.; Jaspars, M.; Kelly, W. L.; Klinman, J. P.; Kuipers, O. P.; Link, A. J.; Liu, W.; Marahiel, M. A.; Mitchell, D. A.; Moll, G. N.; Moore, B. S.; Müller, R.; Nair, S. K.; Nes, I. F.; Norris, G. E.; Olivera, B. M.; Onaka, H.; Patchett, M. L.; Piel, J.; Reaney, M. J. T.; Rebuffat, S.; Ross, R. P.; Sahl, H.-G.; Schmidt, E. W.; Selsted, M. E.; Severinov, K.; Shen, B.; Sivonen, K.; Smith, L.; Stein, T.; Süßmuth, R. D.; Tagg, J. R.; Tang, G.-L.; Truman, A. W.; Vederas, J. C.; Walsh, C. T.; Walton, J. D.; Wenzel, S. C.; Willey, J. M.; van der Donk, W. A. *Natural product reports* **2013**, DOI: 10.1039/c2np20085f.

(163) Willey, J. M.; van der Donk, W. A. *Annual review of microbiology* **2007**, DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093501.

(164) Stein, T.; Borchert, S.; Kiesau, P.; Heinzmann, S.; Klöss, S.; Klein, C.; Helfrich, M.; Entian, K.-D. *Molecular microbiology* **2002**, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02869.x.

(165) Klein, C.; Entian, K. D. *Applied and environmental microbiology* **1994**, DOI: 10.1128/aem.60.8.2793-2801.1994.

(166) Siegers, K.; Entian, K. D. *Applied and environmental microbiology* **1995**, DOI: 10.1128/aem.61.3.1082-1089.1995.

(167) Ra, R.; Beerthuyzen, M. M.; Vos, W. M. de; Saris, P. E. J.; Kuipers, O. P. *Microbiology (Reading, England)* **1999**, DOI: 10.1099/13500872-145-5-1227.

(168) Stein, T.; Heinzmann, S.; Solovieva, I.; Entian, K.-D. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, DOI: 10.1074/jbc.M207237200.

(169) Christ, N. A.; Bochmann, S.; Gottstein, D.; Duchardt-Ferner, E.; Hellmich, U. A.; Düsterhus, S.; Kötter, P.; Güntert, P.; Entian, K.-D.; Wöhnert, J. *The Journal of biological chemistry* **2012**, DOI: 10.1074/jbc.M112.401620.

(170) Hacker, C.; Christ, N. A.; Duchardt-Ferner, E.; Korn, S.; Göbl, C.; Berninger, L.; Düsterhus, S.; Hellmich, U. A.; Madl, T.; Kötter, P.; Entian, K.-D.; Wöhnert, J. *The Journal of biological chemistry* **2015**, DOI: 10.1074/jbc.M115.679969.

(171) Geiger, C.; Korn, S. M.; Häsler, M.; Peetz, O.; Martin, J.; Kötter, P.; Morgner, N.; Entian, K.-D. *Applied and environmental microbiology* **2019**, DOI: 10.1128/AEM.00534-19.

(172) Stein, T.; Heinzmann, S.; Düsterhus, S.; Borchert, S.; Entian, K.-D. *Journal of bacteriology* **2005**, DOI: 10.1128/JB.187.3.822-828.2005.

(173) Blees, A.; Janulienė, D.; Hofmann, T.; Koller, N.; Schmidt, C.; Trowitzsch, S.; Moeller, A.; Tampé, R. *Nature* **2017**, DOI: 10.1038/nature24627.

(174) Hulpke, S.; Tampé, R. *Trends in biochemical sciences* **2013**, DOI: 10.1016/j.tibs.2013.06.003.

(175) Thomas, C.; Tampé, R. *Science (New York, N.Y.)* **2017**, DOI: 10.1126/science.aao6001.

(176) Thomas, C.; Tampé, R. *Frontiers in immunology* **2017**, DOI: 10.3389/fimmu.2017.00065.

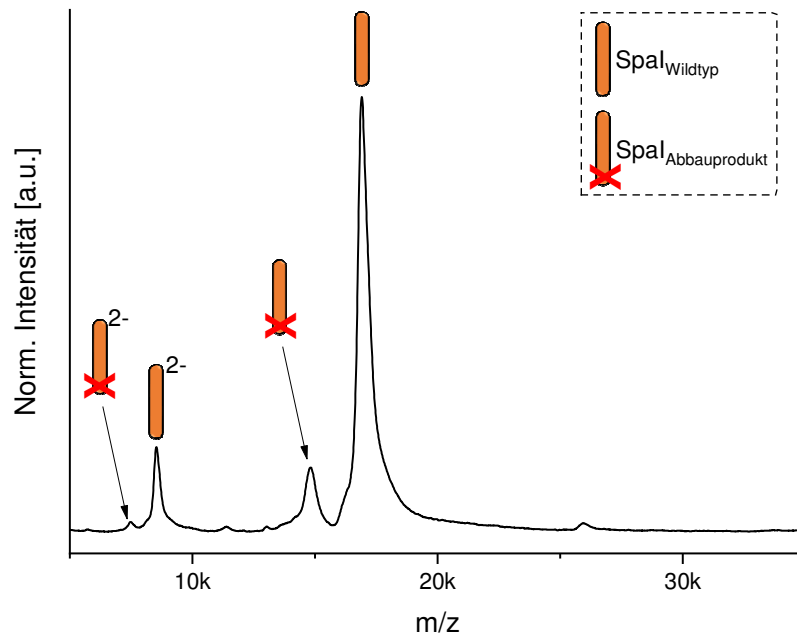
(177) Jin, X.; Hong, S. H. *Biochemical Engineering Journal* **2018**, DOI: 10.1016/j.bej.2018.07.013.

(178) Zemella, A.; Thoring, L.; Hoffmeister, C.; Kubick, S. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2015**, DOI: 10.1002/cbic.201500340.

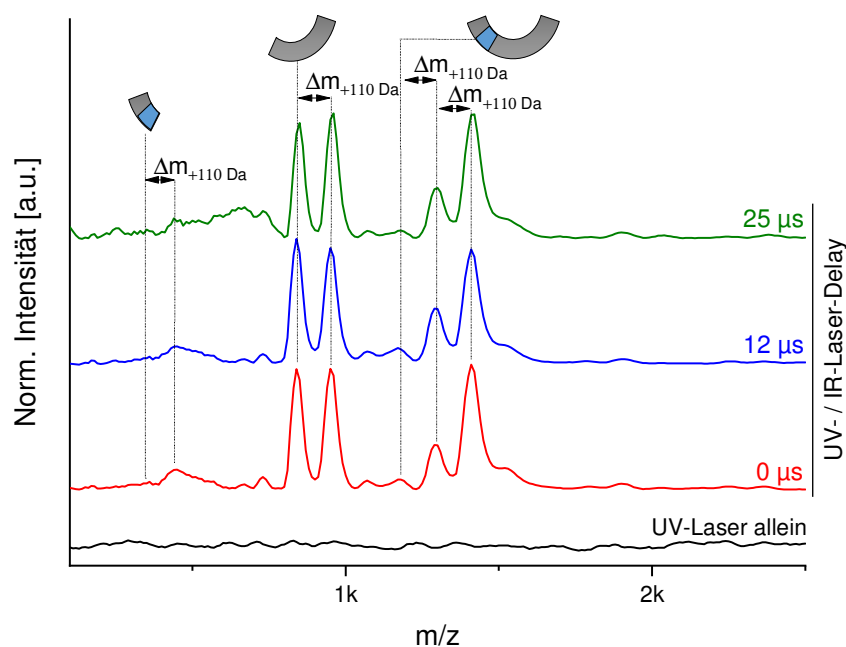
(179) Rolf, J.; Rosenthal, K.; Lütz, S. *Catalysts* **2019**, DOI: 10.3390/catal9020190.

- (180) Cappuccio, J. A.; Blanchette, C. D.; Sulchek, T. A.; Arroyo, E. S.; Kralj, J. M.; Hinz, A. K.; Kuhn, E. A.; Chromy, B. A.; Segelke, B. W.; Rothschild, K. J.; Fletcher, J. E.; Katzen, F.; Peterson, T. C.; Kudlicki, W. A.; Bench, G.; Hoepflich, P. D.; Coleman, M. A. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2008**, DOI: 10.1074/mcp.m800191-mcp200.
- (181) Roos, C.; Kai, L.; Haberstock, S.; Proverbio, D.; Ghoshdastider, U.; Ma, Y.; Filipek, S.; Wang, X.; Dötsch, V.; Bernhard, F. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2014**, DOI: 10.1007/978-1-62703-782-2\_7.
- (182) Nirenberg, M. W.; Matthaei, J. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1961**, DOI: 10.1073/pnas.47.10.1588.
- (183) Morgner, N.; Robinson, C. V. *Analytical chemistry* **2012**, DOI: 10.1021/ac300056a.
- (184) Jia, B.; Jeon, C. O. *Open biology* **2016**, DOI: 10.1098/rsob.160196.
- (185) Yung, M. C.; Bourguet, F. A.; Carpenter, T. S.; Coleman, M. A. *Microbial cell factories* **2017**, DOI: 10.1186/s12934-017-0685-x.
- (186) Zheng, Y.; Struck, D. K.; Young, R. *Biochemistry* **2009**, DOI: 10.1021/bi900469g.
- (187) Bernhardt, T. G.; Roof, W. D.; Young, R. *Molecular microbiology* **2002**, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02984.x.
- (188) Zhang, J. W.; Leach, M. R.; Zamble, D. B. *Journal of bacteriology* **2007**, DOI: 10.1128/JB.00922-07.
- (189) Patriarchi, T.; Shen, A.; He, W.; Baikoghli, M.; Cheng, R. H.; Xiang, Y. K.; Coleman, M. A.; Tian, L. *Scientific reports* **2018**, DOI: 10.1038/s41598-018-21863-3.
- (190) Ritchie, T. K.; Grinkova, Y. V.; Bayburt, T. H.; Denisov, I. G.; Zolnerciks, J. K.; Atkins, W. M.; Sligar, S. G., Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs. In *Liposomes, Part F*; Elsevier, 2009.
- (191) Gottschalk, K.-E.; Soskine, M.; Schuldiner, S.; Kessler, H. *Biophysical journal* **2004**, DOI: 10.1529/biophysj.103.034546.
- (192) Shcherbakov, A. A.; Hisao, G.; Mandala, V. S.; Thomas, N. E.; Soltani, M.; Salter, E. A.; Davis, J. H.; Henzler-Wildman, K. A.; Hong, M. *Nature communications* **2021**, DOI: 10.1038/s41467-020-20468-7.
- (193) Rogers, L. A.; Whittier, E. O. *Journal of bacteriology* **1928**, DOI: 10.1128/jb.16.4.211-229.1928.
- (194) Barrera, N. P.; Zhou, M.; Robinson, C. V. *Trends in cell biology* **2013**, DOI: 10.1016/j.tcb.2012.08.007.
- (195) Shamir, M.; Bar-On, Y.; Phillips, R.; Milo, R. *Cell* **2016**, DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.058.
- (196) Phoebe Young. *Developing a LILBID-based method to quantitatively assess the binding strengths of noncovalent complexes*: Frankfurt am Main, 2020.

## 10. Anhang



**Abbildung A1: LILBID-MS Spektrum des  $\text{Spal}_{\text{Wildtyp}}$ .** Das Spektrum zeigt zusätzlich zu Signalen des  $\text{Spal}_{\text{Wildtyp}}$  ebenfalls unerwünschte Signale, die auf proteolytischen Abbau des Proteins zurückgeführt werden können.



**Abbildung A2: LILBID-MS Spektren der UV-induzierten Peptidspaltung in Abhängigkeit des *Delays* zwischen IR- und UV-Bestrahlung des Analyt-Tropfens.** Unter der Voraussetzung, dass die Spaltung des PP innerhalb von wenigen  $\mu\text{s}$  erfolgt, sollte eine UV-Bestrahlung des Tropfens vor dem eigentlichen Prozess der Ionenfreisetzung es ermöglichen, eine zeitliche Information darüber zu gewinnen, wie schnell die Peptid-Spaltung abläuft. Allerdings zeigt sich in den Spektren bei einem IR-/UV-Laser-Delay im Bereich von 0 – 25  $\mu\text{s}$  kein Unterschied bzgl. der beobachtbaren Peptidspaltung bzw. bzgl. den detektierbaren Signalen. Eine alleinige UV-Bestrahlung der Analyt-Tropfen führt zu keinen detektierbaren Analyt-Signalen.

