

Untersuchung der lateralen Organisation und Phasenumwandlung von festkörpergestützten Lipidmembranen

Adsorptionskinetik membranbindender Annexine und
Phasenübergangsverhalten mikrostrukturierter Lipidbilayer

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Simon Faiß

geb. in Mainz

Mainz, 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Festkörpergestützte Lipidmembranen	4
1.2	Dynamische Monte Carlo-Simulationen	9
1.3	Annexine	11
1.4	Zielstellung der Arbeit	13
2	Messmethoden	16
2.1	Ellipsometrie	16
2.1.1	Optische Grundlagen.....	17
2.1.2	Die ellipsometrischen Grundgleichungen	22
2.1.3	Bildgebende Ellipsometrie	22
2.1.4	Aufbau.....	23
2.1.5	Erstellen der orts aufgelösten Schichtdickeninformation	25
2.1.6	Optische Modelle	27
2.1.7	Datenauswertung.....	30
2.2	Die Quarzmikrowaage.....	31
2.2.1	Piezoelektrizität.....	32
2.2.2	Elektroakustik	33
2.2.3	Messaufbau und Messbedingungen	35
2.3	Rasterkraftmikroskopie	36
2.3.1	Regelkreise.....	38
2.3.2	Betriebsmodi	39
2.4	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie.....	40
2.5	Dynamische Monte Carlo-Simulationen	42
2.5.1	Kinetik der RSA.....	43
3	Präparative Methoden	46
3.1	Isolierung von Annexin A1 und A2t.....	46
3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels UV-Spektroskopie	47
3.3	Proteinlabeling mit Fluoreszenzfarbstoff.....	47
3.4	Eigenschaften der verwendeten Lipide	48
3.4.1	Phasenverhalten von Phospholipiden.....	49
3.5	Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	51

3.6	Herstellung unilamellarer Vesikel.....	52
3.7	Behandlung der Substrate zur Erzeugung festkörperunterstützter Lipidmembranen	53
3.8	Darstellung von unstrukturierten Lipidmembranen	54
3.8.1	Präparation auf Quarzresonatoren.....	54
3.8.2	Präparation auf Siliziumträgern für die Rasterkraftmikroskopie	55
3.8.3	Präparation auf Siliziumträgern für die Ellipsometrie	55
3.9	Darstellung von strukturierten Lipidmembranen	55
3.9.1	Herstellung des mikrofluiden Netzwerks.....	56
3.9.2	Präparation auf Glaträgern für die Fluoreszenzmikroskopie.....	58
3.9.3	Präparaton auf Siliziumträgern und Optislides für die bildgebende Ellipsometrie	59
3.10	Adsorption von Annexin A1 und A2t	59
3.10.1	Fluoreszenzmikroskopie	59
3.10.2	Quarzmikrowaage	60
3.10.3	Rasterkraftmikroskopie	60
3.10.4	Ellipsometrie	60

4 Adsorptionsverhalten von Annexin A1 und A2t 62

4.1	Einfluss der Vesikelladung auf den Spreitprozess	62
4.2	Adsorption von Annexin A1	63
4.2.1	Visualisierung durch Fluoreszenzmikroskopie	63
4.2.2	Ellipsometrie-Messungen.....	64
4.2.3	Quarzmikrowaage-Messungen.....	65
4.3	Adsorption von Annexin A2t	66
4.3.1	Visualisierung durch Fluoreszenzmikroskopie	66
4.3.2	Ellipsometrie-Messungen.....	67
4.4	Laterale Organisation von adsorbiertem Annexin A1 und A2t an POPC/POPS-Membranen	71
4.4.1	Annexin A1	73
4.4.2	Annexin A2t.....	76
4.5	Ermittlung der kinetischen Adsorptionsparameter von Annexin A1 mit Hilfe von dynamischen Monte Carlo-Simulationen	77
4.5.1	Bestimmung der Transportrate.....	77
4.5.2	Beschreibung des Modells	78
4.5.3	Beschreibung des Algorithmus	80
4.5.4	Parameter der dynamischen Monte Carlo-Simulationen	83
4.5.5	Anpassen der Simulationen an die QCM-Messungen in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration und der Inkubationszeit	92
4.6	Zusammenfassung und Diskussion	103

5	Thermotropes Phasenverhalten von festkörperunterstützten Lipidmembranen.....	108
5.1	Kooperativität der Hauptphasenumwandlung.....	109
5.2	Bestimmung des Brechungsindex eines mikrostrukturierten festkörperunterstützten DMPC-Bilayers.....	111
5.3	Untersuchung des thermotropen Phasenverhaltens von DMPC	113
5.4	Abhängigkeit des Phasenverhaltens von der Oberfläche	116
5.4.1	Charakterisierung der Optislides.....	116
5.4.2	Untersuchung des Hauptphasenumwandlung von DMPC auf Optislides.....	117
5.5	Abhängigkeit des Phasenübergangsverhaltens von der Kettenlänge	119
5.6	Bestimmung der Kooperativität der Hauptphasenumwandlung	121
5.7	Phasenverhalten von DMPC/Cholesterol - Gemischen	122
5.7.1	Grundlagen.....	122
5.7.2	Experimente	125
5.8	Bildung einer interdigitierten Phase in DMPC in Gegenwart von Ethanol	128
5.8.1	Grundlagen.....	128
5.8.2	Experimenteller Nachweis	130
5.9	Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur	132
5.9.1	Fehlerdiskussion.....	135
6	Zusammenfassung.....	140
7	Literaturverzeichnis.....	142
A	Anhang.....	151
A.1	Abbildungsverzeichnis	151
A.2	Tabellenverzeichnis.....	158
A.3	Abkürzungsverzeichnis	159
A.4	Chemikalien	160
A.5	Geräte und Materialien.....	160

1 Einleitung

1.1 Festkörpergestützte Lipidmembranen

Festkörpergestützte Lipidmembranen dienen seit Anfang der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts als Modellsysteme für Zellmembranen.¹ Im Gegensatz zu vesikulären Systemen oder Lipidmonolagen an der Wasser/Luft - Grenzfläche sind sie einer Vielzahl von oberflächenanalytischen Methoden, wie der Rasterkraftmikroskopie, Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), Quarzmikrowaagentechnik, Impedanzspektroskopie, TIRF (*total internal reflection fluorescence*) und ATR-FTIR (*attenuated total reflection - Fourier transform infrared spectroscopy*), zugänglich.² Daher finden sie in weiten Bereichen der Biophysik ihre Anwendung, unter anderem zur Untersuchung von Membranstrukturen, der Membrandynamik, Lipid-Protein- und Ligand-Rezeptor - Wechselwirkungen und der elektrochemischen Eigenschaften von Membranen, sowie in der Entwicklung von Biosensoren. Sie können auf den unterschiedlichsten Substraten, wie z. B. Glas, Silizium, Siliziumdioxid, Siliziumnitrid, Glimmer, Platin, Gold und Titandioxid, erzeugt werden.^{1,3-5} Ein weiterer Vorteil von festkörpergestützten Lipidmembranen ist der starke Kontakt zum Substrat, der eine hohe Langzeit- und mechanische Stabilität zur Folge hat. Zwischen Lipidmembranen und hydrophilen Substraten befindet sich zudem ein dünner (ca. 1 nm) Wasserfilm, der gleichzeitig die laterale Mobilität der Lipide gewährleistet.⁶ Festkörpergestützte Lipidmembranen vereinen somit die thermodynamischen Eigenschaften vesikulärer Systeme mit dem Vorteil der Zugänglichkeit für oberflächenanalytische Methoden.

Die Darstellung von festkörpergestützten Lipidmembranen erfolgt in den meisten Fällen durch Übertrag eines Langmuir-Blodgett - Films oder durch Adhäsion und Spreiten von Vesikeln auf der Oberfläche. Dabei ist das Ziel die Bedeckung der gesamten Substratfläche

mit einem möglichst defektfreien Lipidbilayer, um sie für integrale Untersuchungsmethoden nutzbar zu machen. Durch die Kombination von herkömmlichen oberflächenanalytischen Methoden, wie SPR und Ellipsometrie, mit optischen Mikroskopen oder durch die Anwendung hoch auflösender Rastersondenmikroskope stehen jedoch Techniken zur Verfügung, die nur noch kleine Probenflächen benötigen.

Die Entwicklung **mikrostrukturierter** festkörpergestützter Lipidmembranen vereinte die Vorteile der Messmethoden mit der Möglichkeit auf einer einzelnen Probe mehrere individuell adressierbare Lipidkompartimente zu erzeugen. Dadurch konnte die Voraussetzung zur Entwicklung von Biosensoren für analytische Anwendungen, kombinatorische Bibliotheken und pharmakologisches *screening* geschaffen werden, die kleine Probenvolumina, eine hohe Durchsatzgeschwindigkeit und die Möglichkeit für parallele Kontrollmessungen fordern.

Die Möglichkeiten zur Präparation mikrostrukturierter festkörpergestützter Lipidmembranen sind vielfältig und jede der Methoden besitzt Vor- und Nachteile. **Microcontact printing** (μ CP) und **micromolding in capillaries** (MIMIC) basieren auf softlithographischen Methoden nach Whitesides.⁷⁻¹⁰ In beiden Fällen wird eine Struktur durch Softlithographie auf eine PDMS (Polydimethylsiloxan)-Form übertragen. Diese wird dann entweder als Stempel (μ CP) oder als mikrofluides Netzwerk (MIMIC) genutzt.

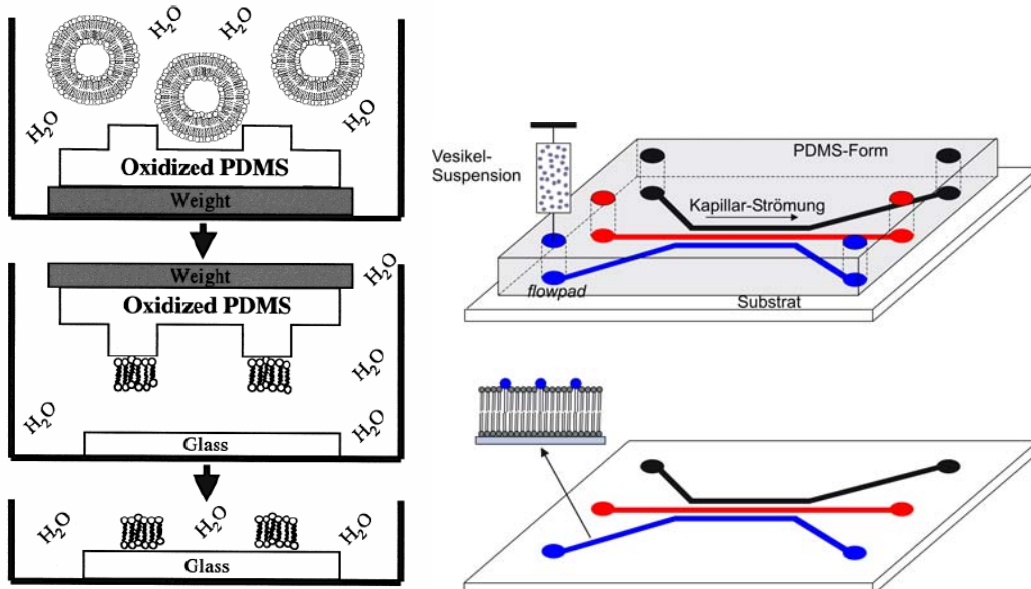


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Präparation mikrostrukturierter Lipidmembranen auf einem Substrat durch *microcontact printing* (A)¹¹ und *micromolding in capillaries* (B).

Beim *microcontact printing* wird die Stempeloberfläche in dem zu strukturierenden Material inkubiert und anschließend auf das Substrat gedrückt. Ein Materialübertrag erfolgt nur an den Stellen, an denen direkter Kontakt hergestellt wird, so dass die Struktur des Stempels direkt auf das Substrat übertragen wird. Eine andere Möglichkeit ist die Erzeugung einer unstrukturierten Lipidmembran, die dann durch das Aufsetzen eines Stempels kontrolliert zerstört wird. Statt PDMS können auch Hydrogele verwendet werden. Diese besitzen eine sehr große Aufnahmefähigkeit, so dass bei der Verwendung von Stempeln aus Agarose-Gel aus 1 μL Vesikelsuspension mehr als 100 Kopien eines Membran-Arrays erzeugt werden können.¹² Die damit erzeugten Strukturen sind mit etwa 200 μm deutlich größer als die der PDMS-Stempel, mit denen Strukturen, die kleiner als 1 μm sind, hergestellt werden können.^{7,10} Allerdings ist bei keiner der Varianten des *microcontact printing* die individuelle Adressierbarkeit der Lipidkompartimente gegeben. Anders ist dies beim *micromolding in capillaries*. Hier wird durch Softlithographie die inverse Struktur in einer PDMS-Form erzeugt, und durch den Kontakt der Form mit dem Substrat wird ein mikrofluides Netzwerk erzeugt. Dies kann aus mehreren getrennten, einzeln befüllbaren Kapillaren bestehen. Die Zugabe von unterschiedlichen Vesikelsuspensionen führt nach Adhärenz und Spreiten der Vesikel auf dem Substrat zu mikrostrukturierten Lipidmembranen. Diese Methode benötigt extrem kleine Volumina ($< 0.3 \mu\text{L}$) und ist unter anderem auf Glas, Gold, Glimmer und Siliziumdioxid durchführbar.¹³⁻¹⁶

Eine andere Methode ist die direkte Strukturierung eines Lipidbilayers durch teilweise Belichtung mit kurzwelligem UV-Licht. Die unstrukturierte Membran auf Si/SiO₂ wird durch eine Maske hindurch belichtet und das UV-Licht führt zur Entstehung von Ozon an der Oberfläche, wodurch die Membran an diesen Stellen zerstört wird. Der unbelichtete Lipidbilayer bleibt auf dem Substrat zurück und kann z. B. mit bildgebender Ellipsometrie untersucht werden.^{17,18}

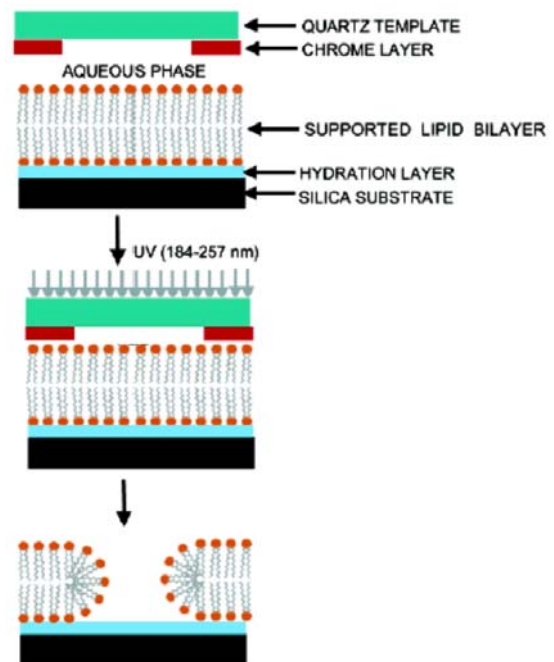


Abbildung 1.2: Präparation mikrostrukturierter Lipidmembranen durch Belichtung mit UV-Licht.¹⁷

Lithographische Techniken werden auch eingesetzt, um strukturierte Barrieren aus Photolack auf dem Substrat zu erzeugen. Dazu wird das Substrat mit Photolack beschichtet und anschließend durch eine Maske hindurch belichtet. Bei Verwendung eines positiv-Photolacks werden dann nur die belichteten Stellen durch den Entwickler entfernt und der zurückbleibende Photolack verhindert nach Zugabe einer Vesikelsuspension das Entstehen einer Lipidmembran. Die Barrieren verhindern auch bei der Darstellung fluider Lipidmembranen das Vermischen einzelner Lipidkompartimente (Abbildung 1.3 A).¹⁹

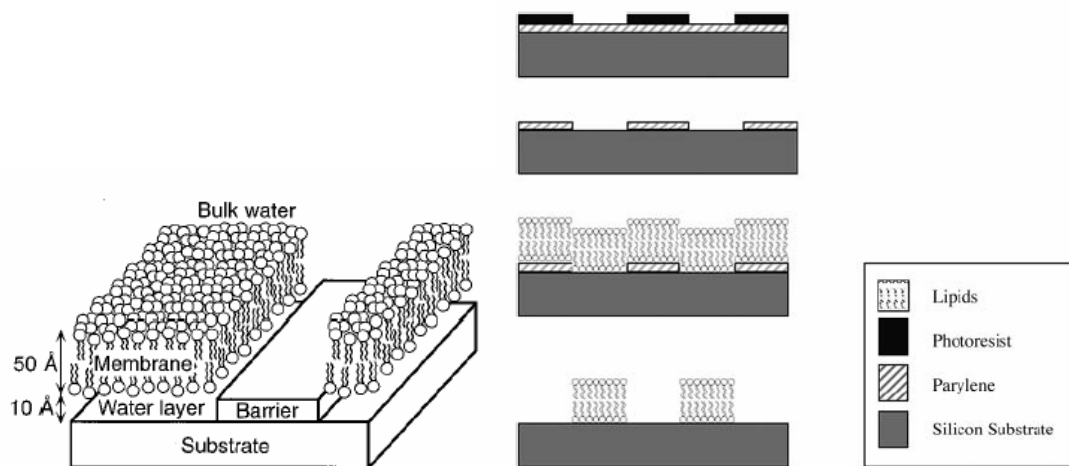


Abbildung 1.3: A) Strukturierte Lipidmembranen, getrennt durch eine Barriere aus Photolack.¹⁹ B) Darstellung barrierefreier strukturierter Lipidmembranen mit Hilfe der Polymer lift-off Technik.²⁰

Eine Weiterentwicklung dieser Methode besteht darin, zuerst eine Struktur aus mikrofluiden Kanälen in eine Glas- oder Silizium-Oberfläche zu ätzen. Diese können dann entweder direkt als strukturierte Oberfläche verwendet werden, oder man benutzt diese Kanäle um darin wiederum strukturierte Membrankompartimente zu erzeugen. Dazu wird die Oberfläche zuerst mit Parylen und anschließend mit einem Photolack beschichtet. Dann wird durch eine Maske hindurch belichtet und der Photolack entwickelt. Das freiliegende Parylen kann dann in einem Sauerstoffplasma entfernt werden. Der restliche Photolack wird abgelöst, so dass eine strukturierte Oberfläche aus Parylen entsteht. Nach der Zugabe einer Vesikelsuspension und Bildung einer Lipidmembran kann das restliche Parylen entfernt werden, so dass Lipidkompartimente entstehen, die nicht durch Barrieren begrenzt sind (Abbildung 1.3 B).^{20,21}

Eine weitere interessante lithographische Technik beinhaltet die Verwendung von polymerisierbaren Lipiden, die in Kohlenwasserstoffketten Diacetyl-Gruppen aufweisen.

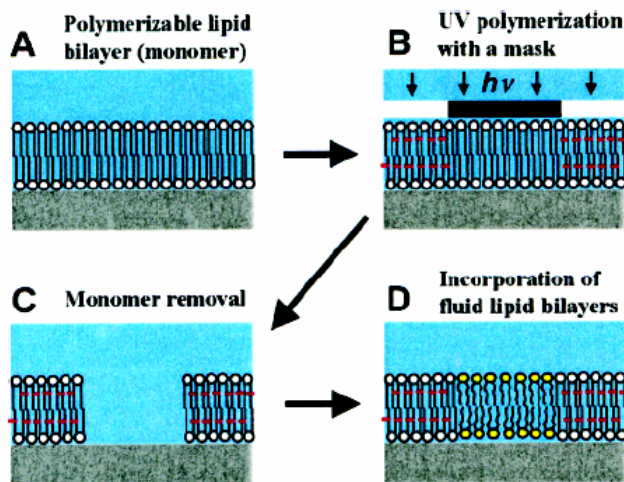


Abbildung 1.4: Erzeugung einer strukturierten Membran aus polymerisierten Lipiden (A-C) und anschließende Präparation fluidier Lipidkompartimente (D).²³

Nach der Belichtung durch eine Photomaske mit UV-Licht sind die polymerisierten Lipidmembranen in organischen Lösungsmitteln unlöslich, so dass die unpolymersierten Lipide selektiv entfernt werden können. In den entstandenen Löcher können dann durch Vesikelspreiten Lipidmembranen erzeugt werden.^{22,23}

Die neueste Entwicklung zur Erzeugung frei stehender, individuell adressierbarer, festkörpergestützter Lipidmembranen ist die Verwendung von kleinen Spitzen aus der Rasterkraftmikroskopie zur *dip-pen Nanolithographie* (DPN). Dabei wird eine feine Spitze in ein Reservoir aus Lipidmolekülen getaucht, wodurch diese teilweise an der Spitze haften bleiben. Anschließend wird die Spitze wie ein Stift über das Substrat gezogen und das anhaftende Material übertragen. Zur Herstellung von Lipidbilayern müssen dabei die experimentellen Parameter, wie Luftfeuchtigkeit und Geschwindigkeit, genau geregelt werden. Durch die Verwendung vieler paralleler Spitzen können so frei stehende Lipidstreifen unterschiedlicher Zusammensetzung mit einer Breite von 100 nm erzeugt werden.²⁴

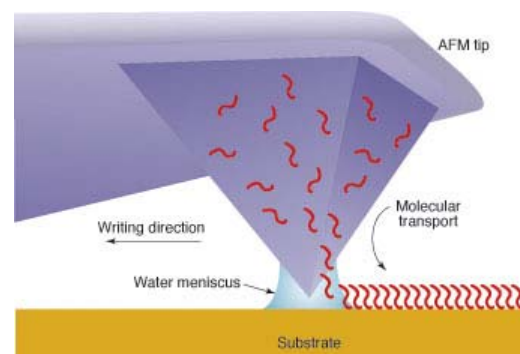


Abbildung 1.5: Prinzip der DPN. An der SFM-Spitze anhaftende Moleküle werden über einen Wassermeniskus auf die Oberfläche übertragen.²⁵

Strukturierte Lipidmembranen lassen sich auf viele verschiedene Weisen herstellen, wobei die individuelle Adressierbarkeit nur bei der Verwendung von mikrofluiden Netzwerken und der *dip-pen* - Methode gegeben ist. Dies ist aber für die Anwendung in der Biosensorik eine wichtige Voraussetzung, um z. B. parallele Untersuchungen und Kontrollexperimente durchführen zu können. Frei stehende Membranen sind relevant für Messungen, bei denen die laterale Ausdehnung eines Bilayers von Interesse ist. Strukturierte Barrieren können außerdem die Verfügbarkeit für analytische Methoden, wie Rastersondentechniken, einschränken.

Viele Methoden sind in der beobachtbaren Gesamtfläche eingeschränkt, so sinkt z. B. das Beobachtungsfeld eines Mikroskops mit zunehmender Vergrößerung. Auch bei der Rasterkraftmikroskopie lässt sich ein großer Bildausschnitt nicht mit dem hohen lateralen Auflösungsvermögen vereinen. Daher ist die Erzeugung möglichst kleiner Lipidstrukturen von großer Bedeutung. Gerade bei den lithographischen Methoden ist die Herstellung hochauflösender Photomasken teuer und die Apparaturen für Belichtung und Entwicklung aufwendig. Durch die explosiven Fortschritte in der Halbleiterindustrie ist es jedoch möglich, Strukturen mit Ausdehnungen im Nanometer-Bereich zu fertigen, die theoretisch auch für die Darstellung von strukturierten Lipidmembranen verwendet werden können. Hier bietet die *dip-pen* - Nanolithographie eine Alternative, die allerdings noch am Anfang ihrer Entwicklung steht und nicht problemlos in einem beliebigen Labor reproduziert werden kann.

1.2 Dynamische Monte Carlo-Simulationen

Mit der schnell voranschreitenden Entwicklung der Computer und der großen Verfügbarkeit schneller und billiger Prozessoren wurden Computersimulationen zu einer immer beliebteren Methode zu Untersuchung zahlreicher Zusammenhänge im Bereich der Biophysik. Monte Carlo-Simulationen wurden eingesetzt um Oberflächenreaktionen zu studieren und Zusammenhänge zwischen mikroskopischen Reaktionsschritten und makroskopischen Eigenschaften aufzuklären. Klassische Monte Carlo-Methoden behandelten zu Beginn hauptsächlich Gleichgewichtssysteme. Da sich jedoch viele der beobachtbaren Phänomene nicht im Gleichgewicht abspielen, wurde die Methode der dynamischen Monte Carlo-Simulationen entwickelt, die das zeitabhängige Verhalten eines Systems simulieren. Dynamische Monte Carlo-Methoden basieren auf einem stochastischen Modell des

untersuchten Systems. Bei der Untersuchung von Adsorptionsprozessen auf Oberflächen beinhaltet das Modell die Oberfläche, das Adsorbat und die mikroskopischen Reaktionsschritte, die die Konfiguration der Oberfläche mit der Zeit ändern. Das zeitabhängige Verhalten des Systems wird von den Raten der einzelnen Reaktionsschritte bestimmt, die in der Simulation als Wahrscheinlichkeiten berücksichtigt werden. Die zeitabhängige Oberflächenkonfiguration ist dann durch eine Master-Gleichung gegeben, die die Entwicklung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Systemkonfigurationen mit der Zeit beschreibt. Da dynamische Monte Carlo-Simulationen mit realen Zeitinkrementen arbeiten, können experimentelle Resultate auf diese Weise reproduziert werden und erlauben die Bestimmung makroskopischer Ratenkonstanten.

Bei der Entwicklung eines Modells für die Adsorption von Proteinen auf Lipidmembranen stellt die Vielzahl der freien Parameter des Systems ein großes Problem dar. Dazu zählen unter anderem der Transport der Proteine zur Oberfläche sowie die Oberflächenbeschaffenheit. Während der Transport in laminaren Strömungen in Abhängigkeit von der Geometrie der Messzelle recht gut beschrieben werden kann (z. B. als *perfect sink* oder Staupunktgeometrie), ist eine genaue Beschreibung einer Membranoberfläche durch eine mögliche Existenz unterschiedlicher Bindungsplätze schwierig. Außerdem können Proteine nur in einfachen Fällen durch harte, nicht miteinander wechselwirkende Kugeln beschrieben werden. Viele globulare Proteine besitzen eine ellipsoidale Form und können daher in unterschiedlichen Orientierungen auf der Oberfläche adsorbieren und gegebenenfalls ihre Orientierung nach der Adsorption ändern oder sogar denaturieren.²⁶ Laterale Wechselwirkungen zwischen Proteinen können im Extremfall zur Bildung von zweidimensionalen Kristallen führen.²⁷ Auf diese Effekte hat auch die Pufferzusammensetzung einen großen Einfluss, so dass auch diese bei der Modellierung gegebenenfalls berücksichtigt werden muss. Die Proteinadsorption kann außerdem reversibel oder irreversibel erfolgen, in manchen Fällen ist jedoch eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, so dass eine Kombination beider Prozesse nötig ist.²⁸

Als Basis für die Modellierung der Proteinadsorption auf Lipidmembranen wird häufig die zufällige sequentielle Adsorption (RSA = *random sequential adsorption*), die zur Beschreibung der Adsorption sphärischer Partikel entwickelt wurde.^{29,30} Die sequentielle Adsorption von Proteinen auf zufälligen Positionen auf der Oberfläche führt zur Bildung kleiner Lücken, die zu klein für weitere adsorbierende Partikel sind. Mit zunehmender Belegung dauert es auch zunehmend länger eine Stelle zu finden, die groß genug für ein adsorbierendes Molekül ist. Dies ist die zweidimensionale Entsprechung des

eindimensionalen *parking lot* - Problems und im Gegensatz dazu nicht analytisch lösbar. Es existieren jedoch Näherungslösungen für reversible und irreversible Adsorptionsprozesse.³¹ Zahlreiche Veröffentlichungen befassen sich mit der Erweiterung der RSA auf kooperative Prozesse und die Adsorption von Mischungen, nicht-sphärischen oder deformierbaren Partikeln auf homogenen und heterogenen Oberflächen.³²⁻³⁵

1.3 Annexine

Die Gruppe der Annexine umfasst eine Vielzahl peripherer Membranproteine, die in nahezu allen Lebewesen vorkommen. Eine charakteristische Eigenschaft der Annexine ist die Bindung an negativ geladene Phospholipide unter Vermittlung von Ca^{2+} -Ionen. Die Calcium- und Membranbindungsstellen sind in einer strukturell hochkonservierten C-terminalen Domäne lokalisiert, die für die Ähnlichkeit der biochemischen Eigenschaften der Annexine verantwortlich ist. Eine einheitliche Nomenklatur der Annexine wurde 1990 von Crumpton und Dedman vorgeschlagen, die den Begriff vom griechischen Wort „annex“ für „verbinden“ oder „zusammenbringen“ ableiteten, da die Annexine die Eigenschaft besitzen, Membranen zu binden und teilweise zu verknüpfen.³⁶ Über die genaue Funktion der Annexine ist bisher wenig bekannt, ihnen werden aber die Beteiligung an verschiedenen membrandynamischen Prozessen, wie der Regulation der Membranorganisation und des Membrantransports, an endo- und exozytotischen Prozessen, an der Membran/Zytoskelett-Verknüpfung und an der Regulation von Ionenströmen über Membranen, zugeschrieben.³⁷⁻³⁹ In den meisten Zellarten wird mehr als ein Annexintyp exprimiert, was trotz der strukturellen Ähnlichkeit auf unterschiedliche Funktionen schließen lässt. Die in Vertebraten (Wirbeltiere) vorkommende Annexine werden mit dem Buchstaben A gekennzeichnet und besitzen Molmassen von 30 - 40 kDa. Bisher wurden zwölf Annexine (A1 bis A11 und A13) in Vertebraten und mehr als 160 Annexine in Invertebraten, Pilzen, Schwämmen und Pflanzen gefunden.

Die in Abbildung 1.6 dargestellte Kristallstruktur von Annexin A1 in Gegenwart von 100 mM Calciumacetat zeigt die vier Subdomänen, die aus je fünf α -Helices bestehen und sich zu einer gekrümmten Scheibe anordnen. Die als gelbe Kugeln dargestellten Calcium-Bindungsstellen befinden sich an der konvexen Seite des Moleküls, der N-Terminus schließt sich an die äußere Subdomäne an der konkaven Seite an. Annexin A1 besitzt acht

Ca²⁺-Bindungsstellen, die unterschiedliche Koordinationen und Ca²⁺-Affinitäten aufweisen. Bei niedrigeren Calciumkonzentrationen sind daher nicht alle Bindungsstellen besetzt.^{40,41}

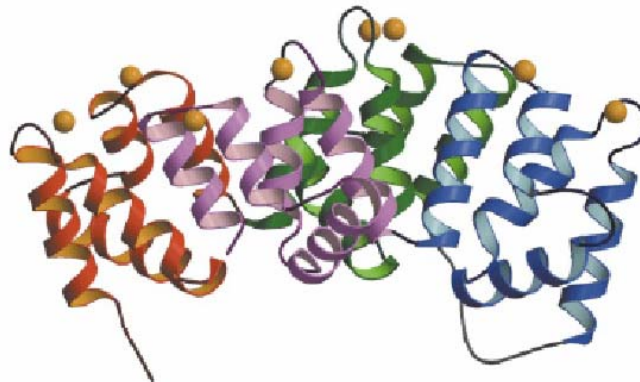


Abbildung 1.6: Kristallstruktur von Annexin A1 in Gegenwart von 100 mM Calciumacetat. Die Ca²⁺-Ionen sind als gelbe Kugeln dargestellt. Die vier Subdomänen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Der N-Terminus, der sich an der unteren Seite anschließt konnte nicht eindeutig lokalisiert werden und ist daher nicht dargestellt.⁴¹

Eine Besonderheit der Annexine ist die vergleichsweise geringe Ca²⁺-Affinität in Abwesenheit von Phospholipiden. Für die Dissoziationskonstante findet man Werte von $K_D = 25 - 1000 \mu\text{M}$. Allerdings steigt die Affinität in Gegenwart von Phospholipiden um etwa den Faktor 100, was bedeutet, dass alle drei Komponenten - Protein, Ca²⁺-Ionen und Phospholipide - an der Komplexbildung beteiligt sind.⁴²

Während Annexin A1 vorwiegend als Monomer vorliegt, wird das monomere Annexin A2 nur selten gefunden. Häufiger ist die Bildung eines Heterotetramers, das aus zwei Annexin A2 Monomeren und einem p11 - Dimer besteht und als Annexin A2t bezeichnet wird. Der Proteinligand p11 gehört zur Familie der S100-Proteine (S100A10). Dies sind relativ kleine, saure, Ca²⁺-bindende Proteine mit einer Molmasse von 9 - 12 kDa, die bisher ausschließlich in Wirbeltieren gefunden wurden. Der Proteinligand p11 dimerisiert über hydrophobe Wechselwirkungen und bindet an den N-Terminus von Annexin A2. Im Annexin A2t werden somit zwei Annexin A2 Monomere durch ein p11 - Dimer verknüpft.

Eine weitere Eigenschaft bestimmter Annexine ist die Fähigkeit, Membranen zu aggregieren. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Für Annexin A1 werden sowohl hydrophobe Wechselwirkungen des N-Terminus mit der Lipidmembran als auch die Bildung von Dimeren und Oligomeren diskutiert.^{43,44} Im Falle des Annexin A2t weisen aktuelle Studien auf die Bildung eines Heterooktamers hin.^{45,46} Diese Fähigkeit zur Membranaggregation lässt auf eine Beteiligung der Annexine bei der Zell-Zell-Adhäsion schließen.⁴²

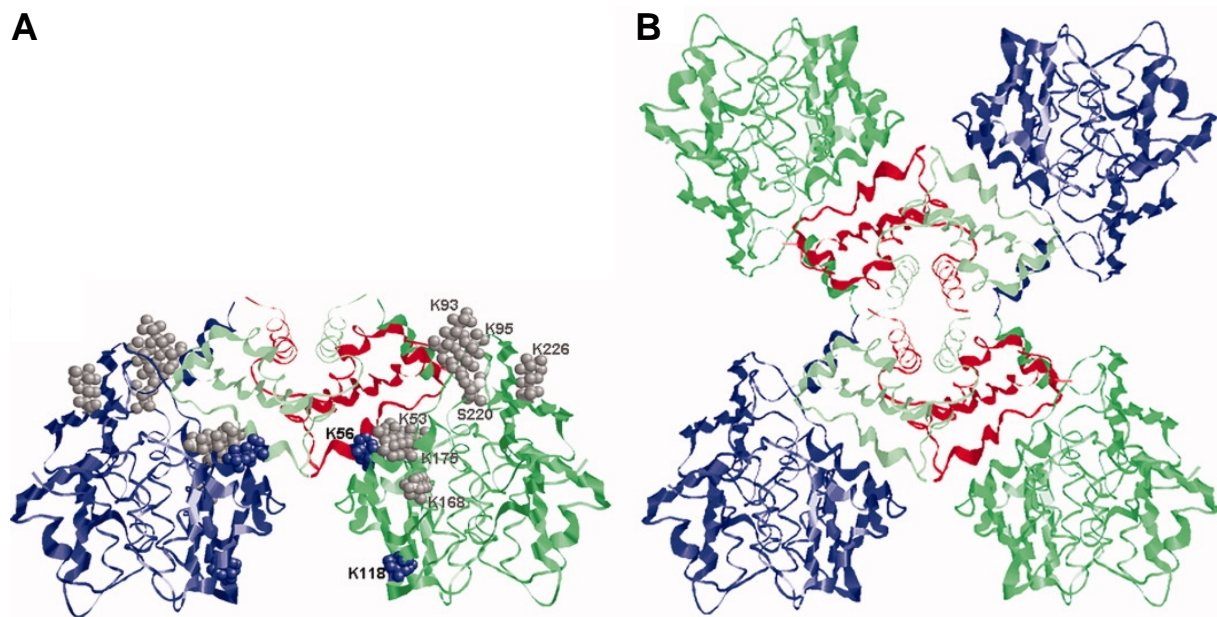


Abbildung 1.7: Modelle des Annexin A2/p11 - Komplexes. A) Heterotetramer. B) Heterooktamer. Die Annexin A2 - Untereinheiten sind in blau und grün dargestellt, die p11 - Moleküle in rot.⁴⁵

Quantitative Untersuchungen zur Annexin-Membran-Wechselwirkung wurden anfangs hauptsächlich mit Hilfe von Vesikelpelletierungsassays durchgeführt.⁴⁷ Allerdings ist diese Methode aufgrund der membranaggregierenden Eigenschaften vieler Annexine nur bedingt nutzbar. Kinetische Untersuchungen der Wechselwirkung von Annexin A1 und A2t mit Membranen wurden daher hauptsächlich auf festkörpergestützten Bilayern mit Hilfe der Quarzmikrowaage-technik durchgeführt.⁴⁸⁻⁵¹

1.4 Zielstellung der Arbeit

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte das Bindungsverhalten von Annexin A1 und Annexin A2t an festkörperunterstützte Lipidmembranen aus POPC und POPS untersucht werden. Dabei waren sowohl die Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung, von der Calciumkonzentration und von der Inkubationszeit von Interesse. Aus der Kombination von Fluoreszenzaufnahmen, Quarzmikrowaage-Messungen und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen sollte ein Bindungsmodell entwickelt werden, das als Basis für die Durchführung dynamischer Monte Carlo-Simulationen dienen sollte. Durch die Anpassung der Computersimulationen an die experimentellen Daten sollten Erkenntnisse über die

calciumabhängige Membranstruktur sowie die kinetischen Konstanten der Bindung auf Basis eines zweidimensionalen RSA-Modells gewonnen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Methode der bildgebenden Ellipsometrie in Kombination mit der Präparation individuell adressierbarer, frei stehender, festkörperunterstützter Lipidmembranen dazu verwendet werden, das Verhalten der Lipidmembranen beim thermotropen Phasenübergang zu untersuchen. Dabei sollten verschiedene Lipide sowie der Einfluss von Cholesterol analysiert werden und die Bildung einer interdigitierten Phase durch Zugabe von Ethanol nachgewiesen werden. Ziel war es, den Einfluss des Substrats im Vergleich mit Ergebnissen an vesikulären Systemen zu untersuchen.

2 Messmethoden

2.1 Ellipsometrie

Die Methode der Ellipsometrie basiert auf der Änderung des Polarisationszustandes von monochromatischem Licht nach Reflektion an einer Oberfläche. Durch die Messung dieser Änderung lassen sich Aussagen über die optischen Eigenschaften der reflektierenden Oberfläche treffen. Im Jahre 1945 wurde der Begriff der Ellipsometrie erstmals von Alexandre Rothen im Zusammenhang mit der Bestimmung von Schichtdicken dünner Filme eingeführt.⁵² Das optische Prinzip war jedoch schon seit dem späten 19. Jahrhundert bekannt und ein Gerät mit ähnlichem Aufbau wurde unter anderem von Paul Drude 1901 beschrieben.^{53,54} Anders als bei einem herkömmlichen Lichtmikroskop wird alleine die Änderung des Polarisationszustandes untersucht, das vertikale Auflösungsvermögen ist daher nicht durch die Wellenlänge beschränkt und liegt bei modernen Geräten unterhalb von 1 nm. Proben können im Vakuum, an Luft und in Flüssigkeiten vermessen werden und es kann ein sehr großer Temperaturbereich (-269 - 1000 °C) abgedeckt werden.⁵⁵ Außerdem ist kein Marker, wie bei der Fluoreszenzmikroskopie, notwendig und es tritt kein mechanischer Kontakt mit der Probe, wie bei der Rasterkraftmikroskopie, auf. Mit der Ellipsometrie lassen sich Schichtdicken im subatomaren Bereich messen, z. B. die Adsorption von Gasen auf Metalloberflächen.⁵⁶ In der Biophysik wird die Ellipsometrie unter anderem zur Untersuchung der Proteinadsorption auf funktionalisierten Oberflächen und zur Bestimmung von optischen Eigenschaften, wie Brechungsindex und Anisotropie, von Lipidmembranen eingesetzt.⁵⁷⁻⁶²

2.1.1 Optische Grundlagen

2.1.1.1 Die Polarisation von Licht

Licht ist eine sich räumlich ausbreitende elektromagnetische Welle, die mathematisch durch Kombination eines elektrischen und eines magnetischen Feldvektors beschrieben werden kann. Beide Feldvektoren stehen immer senkrecht zueinander und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichts, es ist also eine Transversalwelle. Die folgenden Betrachtungen beziehen sich ausschließlich auf den elektrischen Feldvektor, da die elektrischen Wechselwirkungen zwischen Licht und Materie etwa tausend Mal stärker sind als die magnetischen. Das elektrische Feld kann allgemein beschrieben werden durch:

$$E = E_0 \cdot \sin(\omega t - kx + \delta) \quad (2.1)$$

mit dem elektrischen Feldvektor E , der Amplitude E_0 , der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$, dem Wellenvektor $k = 2\pi/\lambda$ und einer Phasenverschiebung δ . Im Allgemeinen emittieren Lichtquellen unpolarisiertes Licht bestehend aus sehr vielen überlagerten Wellenzügen, deren Schwingungsebenen statistisch verteilt sind. Unter polarisiertem Licht hingegen versteht man eine Welle mit einer bestimmten Schwingungsebene. Durch die Überlagerung zweier senkrecht zueinander polarisierten Teilstrahlen mit gleicher Wellenlänge lässt sich ein beliebiger Polarisationszustand beschreiben. Die Wellengleichungen lauten dann

$$E_s = E_{s0} \cdot \sin(\omega t) \quad (2.2)$$

$$E_p = E_{p0} \cdot \sin(\omega t + \delta) \quad (2.3)$$

mit den elektrischen Feldvektoren senkrecht (E_s) und parallel (E_p) zu einer festen Hilfsebene im Raum. Die Phasenverschiebung δ zwischen den beiden Teilstrahlen spielt in der Ellipsometrie eine wichtige Rolle. Die Superposition zweier Teilstrahlen, die eine Phasenverschiebung ungleich null besitzen, resultiert im Allgemeinen in einem elliptisch rotierenden E -Vektor.

Die Linearkombination von Gleichung (2.2) und (2.3) lässt sich nach Elimination der Zeit in die allgemeine Ellipsengleichung umformen:

$$\left(\frac{E_s}{E_{s0}}\right)^2 + \left(\frac{E_p}{E_{p0}}\right)^2 - 2\frac{E_s E_p}{E_{s0} E_{p0}} \cos \delta = \sin^2 \delta. \quad (2.4)$$

Aus der Messung der Elliptizität der Polarisation lässt sich damit auf die Phasenverschiebung zwischen den beiden Teilstrahlen schließen. Die Messung der Elliptizität ist außerdem sehr einfach, indem man mit einem rotierenden Analysator die Intensität des transmittierten Lichts als Funktion der Analysatorstellung bestimmt und gab daher der Methode der Ellipsometrie ihren Namen.

Es gibt zwei Spezialfälle:

1. **Lineare Polarisation:** Licht, dessen elektrischer Feldvektor nur in einer Ebene schwingt, bezeichnet man als linear polarisiertes Licht. Dies tritt auf, wenn E_s und E_p eine Phasenverschiebung von $\delta = N \cdot \pi$ mit $N = 0, 1, 2, \dots$ aufweisen.
2. **Zirkulare Polarisation:** Besitzen beide Teilstrahlen die gleiche Amplitude ($E_{s0} = E_{p0}$) und eine Phasenverschiebung von $\delta = \frac{(2N+1)}{2} \cdot \pi$ mit $N = 0, 1, 2, \dots$, so beschreibt der resultierende Feldvektor eine Kreisbahn mit dem Radius $r = E_{s0} = E_{p0}$.

Für alle anderen Fälle erhält man **elliptisch polarisiertes** Licht.

2.1.1.2 Wechselwirkung von Licht und Materie

Die Wechselwirkung zwischen einem Lichtstrahl und einem Medium wird durch dessen optische Eigenschaften bestimmt. Diese lassen sich durch den komplexen Brechungsindex

$$n^* = n + ik \quad (2.5)$$

beschreiben. Dabei ist n der (klassische) Brechungsindex und k der Extinktionskoeffizient. Der Brechungsindex n ist definiert über die Geschwindigkeit des Lichts in dem betreffenden Medium. Für Vakuum gilt dabei $n=1$, so dass allgemein $n = c/v$ mit der

Lichtgeschwindigkeit c im Vakuum und der Lichtgeschwindigkeit v im Medium gilt. Der Extinktionskoeffizient beschreibt die absorbierenden Eigenschaften eines Materials. Es gilt:

$$k = \frac{n \cdot \lambda_M}{4\pi} \cdot \alpha \quad (2.6)$$

mit der Wellenlänge des Lichts in dem betreffenden Medium λ_M und dem Absorptionskoeffizient α . Dieser ist definiert über die Lichtintensität $I(z)$ nach einer im Medium zurückgelegten Wegstrecke z im Verhältnis zur Lichtintensität an der Grenzfläche des Mediums I_0 :

$$I(z) = I_0 \cdot \exp(-\alpha z). \quad (2.7)$$

Trifft ein Lichtstrahl auf die Grenzfläche zwischen zwei Medien, so wird ein Teil des Lichtstrahls reflektiert und ein anderer Teil gebrochen (Abbildung 2.1). Für die Reflektion gilt, dass der Einfallswinkel (φ_1) gleich dem Ausfallswinkel ist. Für das Verhältnis zwischen dem Einfallswinkel und dem Winkel (φ_2) nach der Brechung an der Grenzfläche hingegen gilt das Snellius'sche Gesetz:

$$n_1^* \cdot \sin \varphi_1 = n_2^* \cdot \sin \varphi_2 \quad (2.8)$$

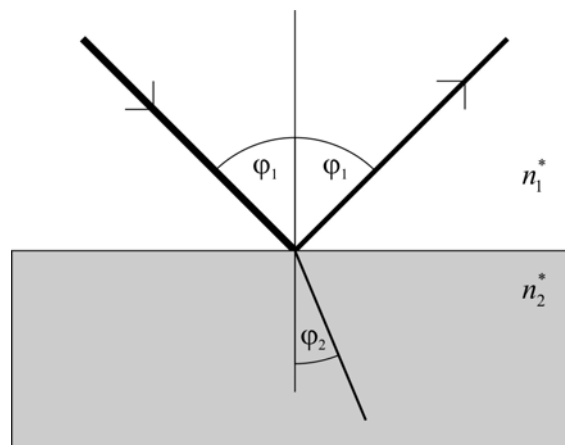


Abbildung 2.1: Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche.

Der Brechungsindex weist zusätzlich eine Wellenlängenabhängigkeit auf. Näherungsweise kann dies durch die Cauchy-Gleichung beschrieben werden. Danach gilt:

$$n(\lambda) = n_1 + \frac{n_2}{\lambda^2} + \frac{n_3}{\lambda^4} + \dots \quad (2.9)$$

mit den Cauchy-Koeffizienten n_1 , n_2 und n_3 . Analog kann dies für den Extinktionskoeffizienten k formuliert werden.

2.1.1.3 Reflexion und Brechung von polarisiertem Licht

Beim Auftreffen eines Lichtstrahls auf die Grenzfläche zwischen zwei Medien werden sowohl der reflektierte als auch der gebrochene Lichtstrahl teilpolarisiert. Für eine anschauliche Betrachtung ist es daher sinnvoll, den einfallenden Lichtstrahl in zwei Teilwellen zu zerlegen, deren elektrische Feldvektoren senkrecht (E_s) und parallel (E_p) zur Einfallsebene liegen. Diese Einfallsebene wird, wie in Abbildung 2.2 dargestellt, von der Ausbreitungsrichtung des Lichts und der Grenzflächennormalen aufgespannt. Die Amplitudenverhältnisse der reflektierten und einfallenden Teilwellen werden als Fresnel-Koeffizienten r^s und r^p bezeichnet. Sie lassen sich durch die Fresnelschen Gleichungen beschreiben:⁵⁵

$$r_{12}^s = \frac{n_1^* \cos \varphi_1 - n_2^* \cos \varphi_2}{n_1^* \cos \varphi_1 + n_2^* \cos \varphi_2}$$

$$r_{12}^p = \frac{n_2^* \cos \varphi_1 - n_1^* \cos \varphi_2}{n_2^* \cos \varphi_1 + n_1^* \cos \varphi_2}$$
(2.10)

Werden die Amplituden des einfallenden Lichtstrahls $E_s = E_p = 1$ gesetzt, geben die Fresnelkoeffizienten direkt die Amplituden der reflektierten Teilwellen an.

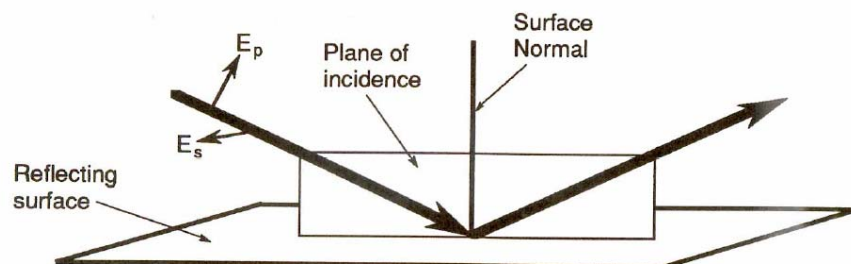


Abbildung 2.2: Reflexion an einer Oberfläche, Definition der Einfallsebene und der elektrischen Feldvektoren E_s und E_p .⁵⁵

Die entsprechenden Intensitäten, oder auch Reflektivitäten, der Wellen senkrecht (R^s) und parallel (R^p) zur Einfallsebene sind gegeben durch $R^s = |r_{12}^s|^2$ und $R^p = |r_{12}^p|^2$. R^p durchläuft in

Abhängigkeit vom Einfallswinkel ein Minimum, den so genannten Brewsterwinkel. Für nichtadsorbierende Materialien gilt zusätzlich $R^p = 0$, d. h. parallel zur Einfallsebene polarisiertes Licht wird durch die Reflexion komplett ausgelöscht (Abbildung 2.3 A). Dieser Effekt wird in der Brewsterwinkel-Mikroskopie verwendet.

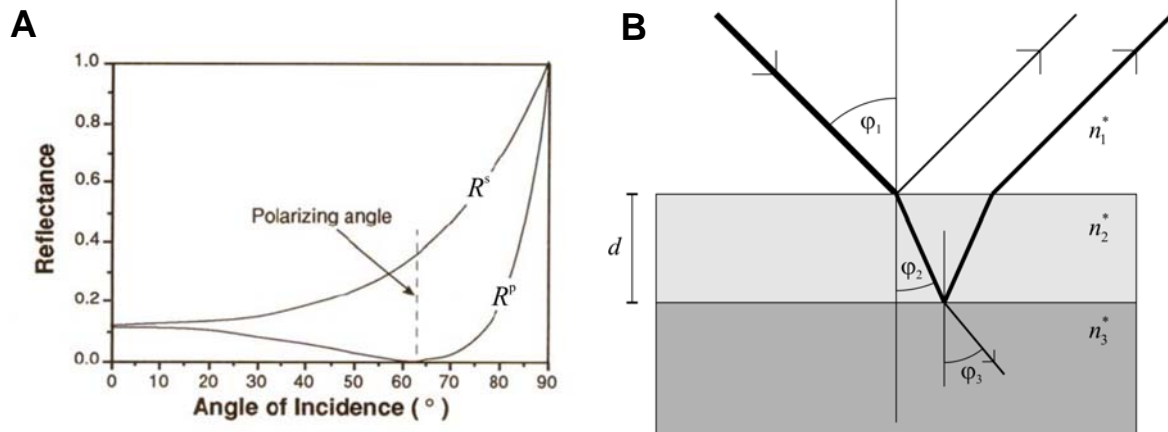


Abbildung 2.3: A) Die Reflektivitäten R^p und R^s als Funktion des Einfallswinkels für ein transparentes Material mit $n_2 = 2.0$.⁵⁵ B) Reflexion und Lichtbrechung an einem Substrat (3) mit einem dünnen Film (2) mit Schichtdicke d .

Die in der Ellipsometrie untersuchten Proben bestehen im Allgemeinen aus einem dünnen transparenten Film auf einer stark reflektierenden Oberfläche (Abbildung 2.3 B). Die Fresnel-Koeffizienten sind dann gegeben durch:

$$r_{123}^s = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s \exp(-i2\beta)}{1 + r_{12}^s \cdot r_{23}^s \exp(-i2\beta)} \quad \text{und} \quad r_{123}^p = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \exp(-i2\beta)}{1 + r_{12}^p \cdot r_{23}^p \exp(-i2\beta)} \quad (2.11)$$

mit der optischen Weglänge β (unter Vernachlässigung von Vielfachreflektionen):

$$\beta = 2\pi \cdot \frac{d}{\lambda} \cdot n_2^* \cos \varphi_2. \quad (2.12)$$

Dabei ist d die Schichtdicke des untersuchten Films (2). Für die Reflektivitäten gilt dann:

$$R^s = |r_{123}^s|^2 \quad \text{und} \quad R^p = |r_{123}^p|^2. \quad (2.13)$$

2.1.2 Die ellipsometrischen Grundgleichungen

In der Ellipsometrie betrachtet man im Allgemeinen nicht die einzelnen Reflektivitäten, sondern deren Quotient. Dadurch eliminiert man die Abhängigkeit von der Intensität der einfallenden Welle. Die fundamentale Gleichung der Ellipsometrie lautet dann:

$$\rho = \frac{R^p}{R^s} = \tan \Psi \cdot e^{i\Delta} \quad (2.14)$$

Delta (Δ) und Psi (Ψ) sind die beiden ellipsometrischen Winkel. Delta bezeichnet die Änderung der Phasendifferenz zwischen den beiden Teilwellen vor und nach der Reflexion an der Oberfläche:

$$\Delta = \delta_1 - \delta_2. \quad (2.15)$$

Psi ist ein Maß für die Änderung der Amplituden der reflektierten Teilwellen im Verhältnis zu den einfallenden Teilwellen:

$$\tan \Psi = \frac{|R^p|}{|R^s|}. \quad (2.16)$$

Die Definition der beiden ellipsometrischen Winkel hat hauptsächlich historische Gründe. Die ersten entwickelten Geräte waren so genannte „Null-Ellipsometer“, d. h. die Intensität wurde durch die Drehung zweier Polarisatoren vor und nach der Reflexion an der Probe minimiert. Die beiden Winkel Delta und Psi lassen sich dann direkt aus der Stellung der Polarisatoren bei minimaler Intensität ablesen.

2.1.3 Bildgebende Ellipsometrie

Wie bereits erwähnt, besitzen herkömmliche Ellipsometer ein vertikales Auflösungsvermögen im Subnanometer-Bereich. Allerdings wird das laterale Auflösungsvermögen dadurch beschränkt, dass im Detektor das Signal des kompletten Laserstrahls erfasst wird. Das ankommende Signal gibt somit einen Mittelwert der vom Laserstrahl ausgeleuchteten Fläche mit. Der Durchmesser eines Laserstrahls beträgt etwa 0.3 – 1 mm. Man erhält also ein

gemitteltes Signal über eine relativ große Fläche und es ist nicht möglich, z. B. Mikroheterogenitäten oder mikrostrukturierte Oberflächen zu untersuchen.

Eine Verbesserung des lateralen Auflösungsvermögens kann durch die Verwendung einer CCD-Kamera als Detektor in Verbindung mit einem Objektiv im reflektierten Strahlengang erzielt werden. Mit Hilfe einer geeigneten Software ist es dann möglich, einzelne Regionen im Bildausschnitt zu definieren und getrennt zu untersuchen. Das Auflösungsvermögen ist dann nur noch durch die CCD-Kamera und, wie bei einem optischen Mikroskop, durch die numerische Apertur des Objektivs und die Wellenlänge des verwendeten Lasers beschränkt.

2.1.4 Aufbau

Im Folgenden wird der Aufbau des verwendeten Null-Ellipsometers EP³-SW der Firma Nanofilm (Nanofilm Technologie, Göttingen) beschrieben. Zuvor soll jedoch kurz die allgemeine Konzeption eines Ellipsometers und die Funktionsweise der einzelnen optischen Komponenten behandelt werden.

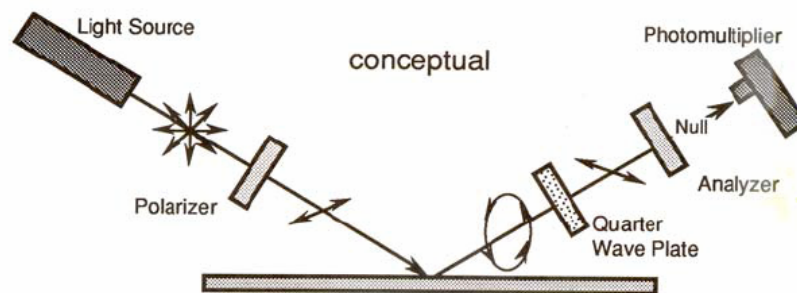


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau eines konzeptionellen Ellipsometers mit dem Kompensator im Strahlengang nach der Reflexion an der Probenoberfläche.⁵⁵

Der schematische Aufbau eines Ellipsometers ist in Abbildung 2.4 gezeigt. Als Lichtquelle wird eine monochromatische Lichtquelle, im Allgemeinen ein Laser oder eine Xenonlampe mit monochromatischen Filtern, verwendet. Das von der Lichtquelle ausgestrahlte unpolarisierte Licht wird dann durch einen Polarisator linear polarisiert und unter einem festen Winkel auf die Probe eingestrahlt. Durch die Reflexion an der Substratoberfläche ändert sich wie oben gezeigt der Polarisationszustand des Lichts, so dass man im Allgemeinen elliptisch polarisiertes Licht erhält. Der Kompensator erzeugt daraus wieder linear

polarisiertes Licht. Er besteht aus einem doppelbrechendem Material, d. h. die Geschwindigkeit der Lichtwelle hängt von ihrer Orientierung ab. Diese Materialien besitzen eine schnelle und eine langsame Achse, die senkrecht zueinander und zur Ausbreitungsrichtung des Lichts stehen. Der Anteil des Lichts, dessen elektrischer Feldvektor in Richtung der schnellen Achse liegt, bewegt sich daher schneller durch den Kompensator als der Anteil, dessen elektrischer Feldvektor sich in der langsamen Achse befindet. Dadurch wird zwischen diesen beiden Teilwellen eine Phasendifferenz erzeugt, dessen Wert von der Dicke des Kompensators abhängig ist. Im Allgemeinen beträgt sie $\frac{\pi}{2}$, d. h. ein Viertel der Wellenlänge (daher im Englischen *quarterwave plate*). Der reflektierte Lichtstrahl wird durch Drehung des Kompensators linear polarisiert und anschließend durch einen weiteren Polarisator, zur Unterscheidung oft Analysator genannt, ausgeblendet.⁶³ Als Detektor dient ein *Photomultiplier*.

In modernen Geräten wird ein leicht veränderter Aufbau, der in Abbildung 2.5 dargestellt ist, verwendet. Dabei wird der Kompensator direkt hinter dem Polarisator positioniert. Die Elliptizität des eingestrahlt Lichtstrahls wird so eingestellt, dass man durch die Änderung des Polarisationszustandes bei der Reflektion linear polarisiertes Licht erhält. Üblicherweise wird dies durch die Drehung des Polarisators bei festem Kompensator-Winkel erreicht.

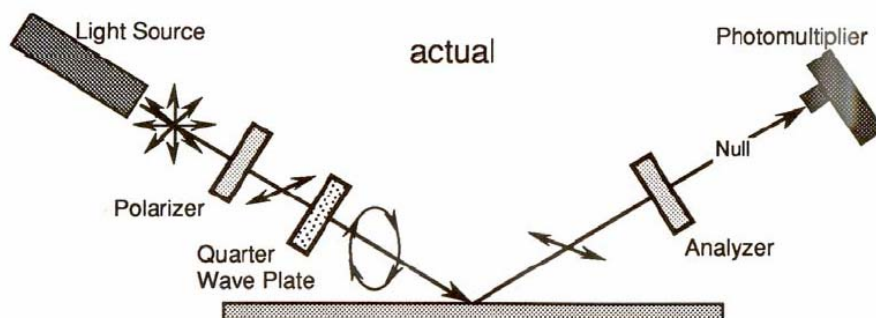


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines modernen Ellipsometers mit dem Kompensator im Strahlengang vor der Reflektion und rotierendem Polarisator und Analysator.⁵⁵

Der reflektierte, linear polarisierte Lichtstrahl wird dann wiederum vom Analysator minimiert. Bei diesem Aufbau gibt es eine mehrere Möglichkeiten, durch Drehung der optischen Komponenten ein Intensitätsminimum zu finden. Üblicherweise wird dies auf zwei oder vier so genannte Zonen reduziert.

Für das verwendete Ellipsometer (EP³, Nanofilm Technologie) gilt:

Zone 1:	$-45^\circ < P_1 < 135^\circ,$	$0^\circ < A_1 < 90^\circ,$	$K = 45^\circ$
Zone 2:	$-135^\circ < P_2 < 45^\circ,$	$-90^\circ < A_2 < 90^\circ,$	$K = 45^\circ$
Zone 3:	$45^\circ < P_3 < -135^\circ,$	$0^\circ < A_3 < 90^\circ,$	$K = -45^\circ$
Zone 4:	$-135^\circ < P_4 < 135^\circ,$	$-90^\circ < A_4 < 0^\circ,$	$K = -45^\circ$

Für die ellipsometrischen Winkel Delta und Psi gelten dann:

$$\begin{aligned} \Delta_1 &= 270^\circ - 2 \cdot P_1, & \Psi_1 &= A_1 \\ \Delta_2 &= 90^\circ - 2 \cdot P_2, & \Psi_2 &= -A_2 \\ \Delta_3 &= 90^\circ + 2 \cdot P_3, & \Psi_3 &= A_3 \\ \Delta_4 &= 270^\circ + 2 \cdot P_4, & \Psi_4 &= -A_4. \end{aligned}$$

Delta und Psi können durch eine Messung in einer einzelnen der vier Zonen bestimmt werden. Durch Bestimmung des Mittelwerts aus den Messungen in allen vier Zonen erhält man jedoch eine größere Genauigkeit.

2.1.5 Erstellen der ortsaufgelösten Schichtdickeninformation

Mit Hilfe des EP³-Ellipsometers ist es möglich, im Bildausschnitt nicht nur mehrere Regionen unterschiedlicher Größe zu definieren und zu vermessen, sondern auch im gesamten Bereich ortsaufgelöst die Schichtdicke zu bestimmen. Man besitzt die Möglichkeit so genannte „Maps“ zu erstellen, diese können die ortsaufgelöste Information der ellipsometrischen Winkel Delta oder Psi enthalten und in Informationen einer Schichtdicke umgerechnet werden.

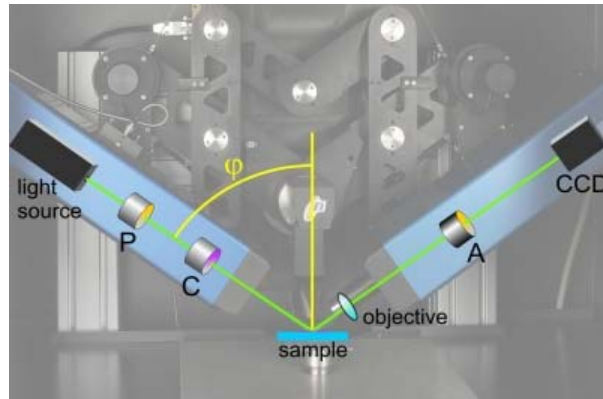


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau des bildgebenden Ellipsometers EP³-SW der Firma Nanofilm.

Für den Fall, dass eine strukturierte Oberfläche vorliegt, d. h. auf der Probe befinden sich Bereiche unterschiedlicher Schichtdicke oder mehrere Materialien mit unterschiedlichen Brechungsindizes, so ist die Bedingung für minimale Intensität in diesen Bereichen ebenfalls unterschiedlich. Stellt man die Intensität für einen Bereich auf Null, so erscheinen Bereiche mit einer anderen Schichtdicke heller. Aus dem Bild der CCD-Kamera lässt sich daher eine Veränderung der Schichtdicke durch unterschiedliche Intensitäten unterscheiden. Um nun z. B. eine „Delta-Map“ zu erstellen, werden nun bei unterschiedlichen Polarisatorstellungen Kontrastbilder aufgenommen. Dies ist in Abbildung 2.7 anhand einer mikrostrukturierten Oberfläche dargestellt. In einem Schachbrett-Muster wurde eine BSA-Schicht auf eine Si/SiO₂-Oberfläche übertragen. Der Höhenunterschied zwischen dem Substrat und dem Proteinlayer beträgt etwa 3 nm. Aus der Überlagerung dieser Kontrastbilder lässt sich anschließend der ellipsometrische Winkel Delta für jeden Pixel berechnen. Voraussetzung dafür ist natürlich, dass der Polarisator während der Messung einmal das Minimum für den entsprechenden Punkt durchschreitet. Außerdem sollte sich der Analysator möglichst nah an seiner Minimumposition befinden. Für die Aufnahme einer „Psi-Map“ wird entsprechend die Analysatorstellung variiert. Besitzt man dann die Delta- und Psi-Information für jeden Punkt auf der Oberfläche, so kann daraus die Schichtdicke berechnet werden. Bei dünnen Filmen ist die Abhängigkeit von Psi von der Schichtdicke sehr gering. Es genügt daher, die Schichtdicke nur aus der Delta-Information zu berechnen. Die Genauigkeit der Schichtdicken-Messung wird nur wenig beeinträchtigt, man spart aber viel Zeit und Rechenleistung. Die erreichte Ortsauflösung beträgt bei dem verwendeten 20× Objektiv etwa 1 μm .

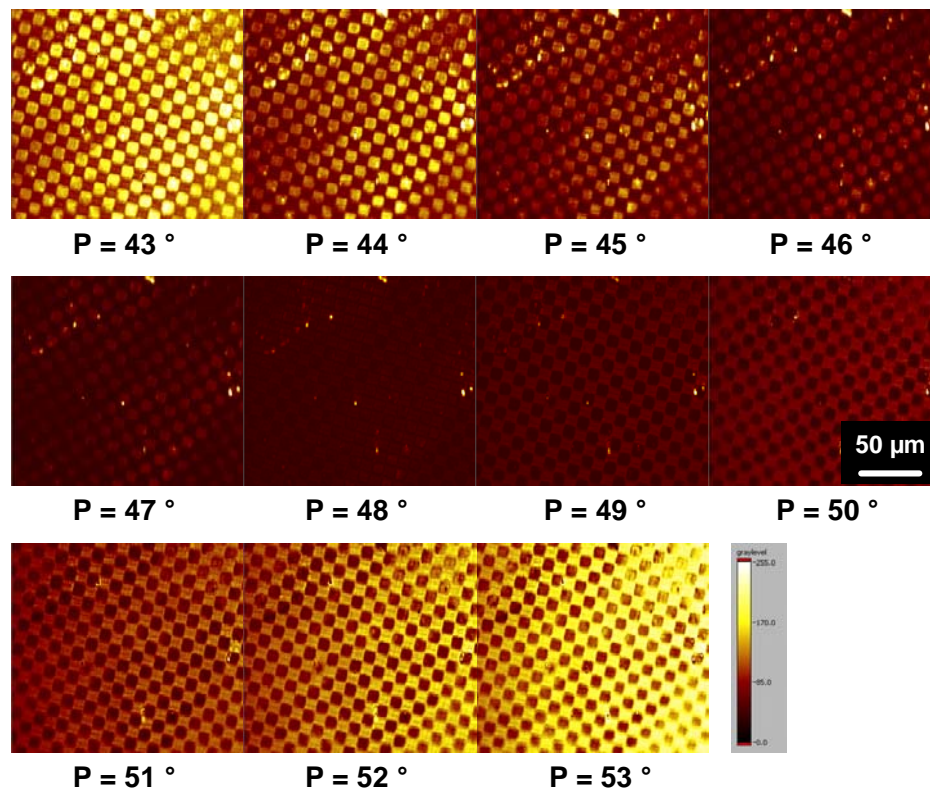


Abbildung 2.7: Graustufen-Kontrastbilder einer mikrostrukturierten BSA-Schicht auf Si/SiO₂ bei schrittweiser Änderung des Polarisatorwinkels von 43 ° auf 53 °. Das Muster wird durch den Nulldurchgang des Polarisators invertiert. Eine hellere Fläche bedeutet somit im Allgemeinen nicht eine höhere Schichtdicke.

2.1.6 Optische Modelle

In diesem Abschnitt werden die verwendeten optischen Modelle mit den entsprechenden Brechungsindizes vorgestellt. Ein Großteil der ellipsometrischen Messungen wurde auf einem Siliziumsubstrat durchgeführt, dessen Oberfläche chemisch oxidiert wurde (Abbildung 2.8). Auf dieser Siliziumdioxid-Schicht wurde dann eine Lipidmembran erzeugt und gegebenenfalls Protein angebunden. Als umgebendes Medium wurde ein wässriger Puffer (20 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM NaN₃, eventuell 1 mM DTT maximal 1 mM CaCl₂) oder eine Puffer/Ethanol-Mischung ($c_{\text{EtOH}} = 160 \text{ mg/mL}$) verwendet.

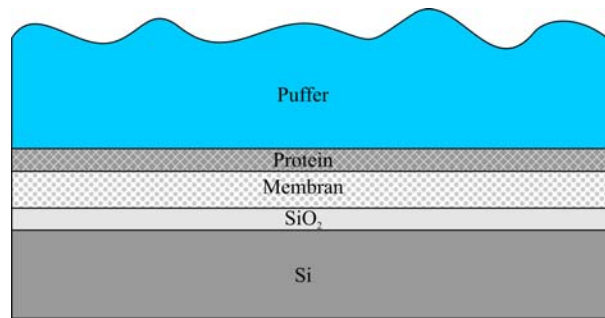


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau einer Ellipsometer-Probe. Auf das Substrat adsorbierte Lipidmembran und Protein werden als dünne Filme modelliert.

Für einige Messungen wurden speziell modifizierte Glasträger, so genannte Optislides, der Firma Nanofilm verwendet. Deren Aufbau ist in Abbildung 2.9 dargestellt. In Tabelle 1 sind die verwendeten Brechungsindizes bei der Laserwellenlänge von 532 nm und die vorkommenden Schichtdickenbereiche für die zu berechnenden Schichten zusammengefasst.

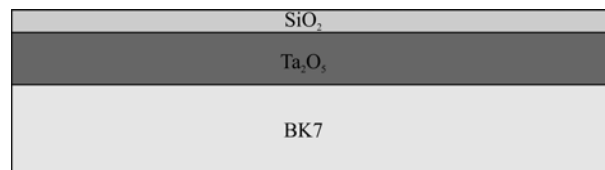


Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau eines Nanofilm Optislides. Die Schichtdicke des stark reflektierenden Ta₂O₅-Layers beträgt etwa 82 nm, die SiO₂-Schicht ist etwa 10 nm dick.

Tabelle 1: Schichtdickenbereiche, Brechungsindizes und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Materialien.

Material	Schichtdicke d / nm	Brechungsindex n
Luft		1.000
H ₂ O / Puffer		1.335
Puffer / Ethanol ⁶⁴		1.346
dotiertes Silizium		$4.1132 + 0.0538 \cdot i$
SiO ₂	0.1 - 3	1.461
BK7		1.528
Ta ₂ O ₅	82	2.348
Membran	2 - 6.5	1.533
Protein ⁶²	0 - 6	1.500

Die Berechnung der Schichtdicken erfolgt durch die Anpassung der gemessenen ellipsometrischen Winkel Delta und Psi an ein optisches Modell mit gegebenen Brechungsindizes. In Abbildung 2.10 sind die simulierten Verläufe von Delta und Psi in Abhängigkeit von der Schichtdicke d für SiO₂ auf dotiertem Silizium (A und B) sowie einer Lipidmembran auf einem 1 nm SiO₂-Layer auf dotiertem Silizium (C) dargestellt. In einem Schichtdickenbereich von 0 - 200 nm SiO₂ ist eine eindeutige Bestimmung aus nur einem der ellipsometrischen Winkel nicht möglich, da bestimmte Werte von Delta und Psi bei verschiedenen Schichtdicken auftreten. Nur die Kombination beider Winkel liefert in diesem Bereich ein eindeutiges Ergebnis. Betrachtet man jedoch nur den Bereich von 0 - 10 nm SiO₂, lässt sich die Schichtdicke eindeutig aus einem einzelnen Winkel bestimmen. Da die Abhängigkeit des Winkels Delta von der Schichtdicke deutlich größer ist, als die von Psi, kann Delta alleine zur Berechnung der Schichtdicke verwendet werden. Zusätzlich zeigt Delta eine annähernd lineare Abhängigkeit von d . Das gleiche Verhalten findet man auch bei den simulierten Verläufen von Delta und Psi in Abhängigkeit von der Dicke einer Lipidmembran.

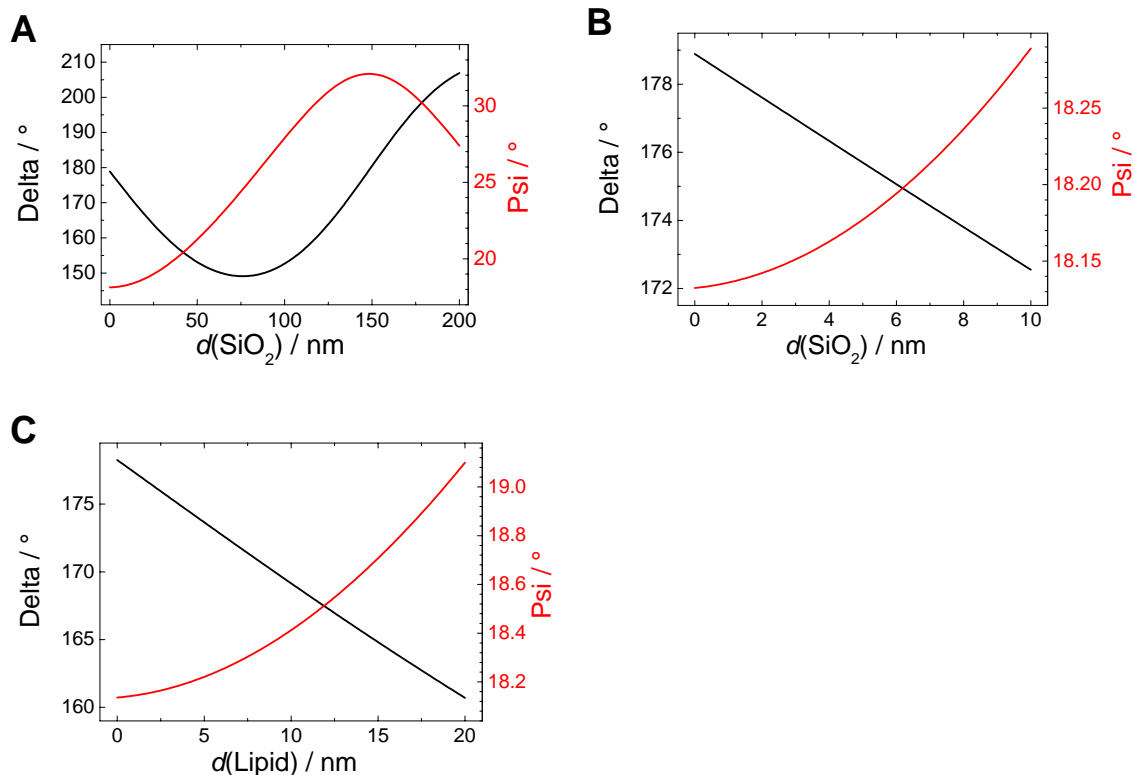


Abbildung 2.10: Abhängigkeiten der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi von der Schichtdicke SiO₂ auf Silizium (A, B) und von der Schichtdicke einer Lipidmembran auf Silizium mit 1 nm SiO₂ (C). Als umgebendes Medium wurde H₂O gewählt.

2.1.7 Datenauswertung

Mit dem bildgebenden Ellipsometer können die ellipsometrischen Winkel Delta und Psi orts aufgelöst bestimmt werden. Dafür können entweder komplette „Delta-„ oder „Psi-Maps“ aufgenommen werden, oder es können im Bildausschnitt der CCD-Kamera Regionen (ROI = *regions of interest*) ausgewählt werden, für die eine Messung die jeweiligen Mittelwerte von Delta und Psi in dieser Region liefert. Abbildung 2.11 zeigt exemplarisch das Kontrastbild von zwei strukturierten Lipidmembranen auf einem Si/SiO₂-Substrat in Puffer. Sowohl auf dem Substrat als auch auf den Lipidbilayern sind Regionen mit unterschiedlicher Größe ausgewählt worden. Die erhaltenen Messwerte der Substratoberfläche können als Kontrolle verwendet werden. Die Durchführung einer 4-Zonen-Messung liefert die genauesten Ergebnisse für Delta und Psi, erfordert jedoch einen etwas größeren Zeitaufwand. Daher wurden bei den aufgenommenen Kinetiken lediglich 1-Zonen-Messungen verwendet. Für die temperaturabhängigen Messungen wurden hingegen 4-Zonen-Messungen durchgeführt.

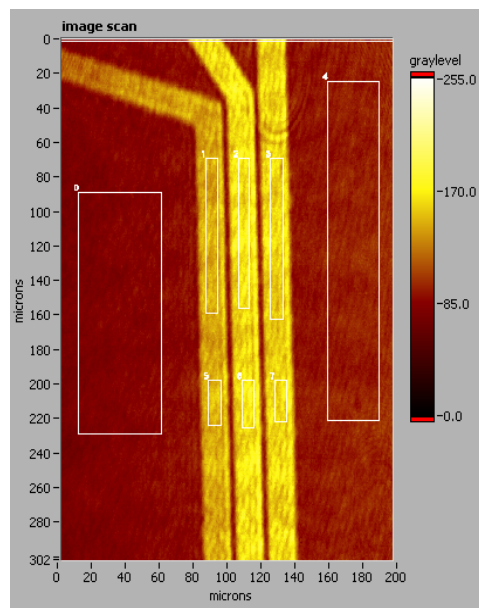


Abbildung 2.11 Graustufenbild eines strukturierten Lipidbilayers auf Si/SiO₂. In weiß sind mehrere *regions of interest* (ROI) eingezeichnet.

Aus der Auswertung einer „Delta-„ oder „Psi-Map“ kann nicht nur die orts aufgelöste Schichtdickeninformation einer Probe ermittelt werden, sondern bei mikrostrukturierten Lipidmembranen auch die Flächenausdehnung des Lipidstreifens. Dazu wurde nach der Aufnahme der „Delta-Map“ für das gesamte Bild oder einen Bildausschnitt eine Histogramm-Analyse durchgeführt. Die Analyse des durch einen schwarzen Rahmen in Abbildung 2.12 A

begrenzten Bildausschnitts führt zu dem in Abbildung 2.12 B dargestellten Histogramm. Die Flächenanteile der Lipidmembran und des Substrats können dann durch die Anpassung einer Linearkombination zweier Gauß-Kurven an das Histogramm berechnet werden.

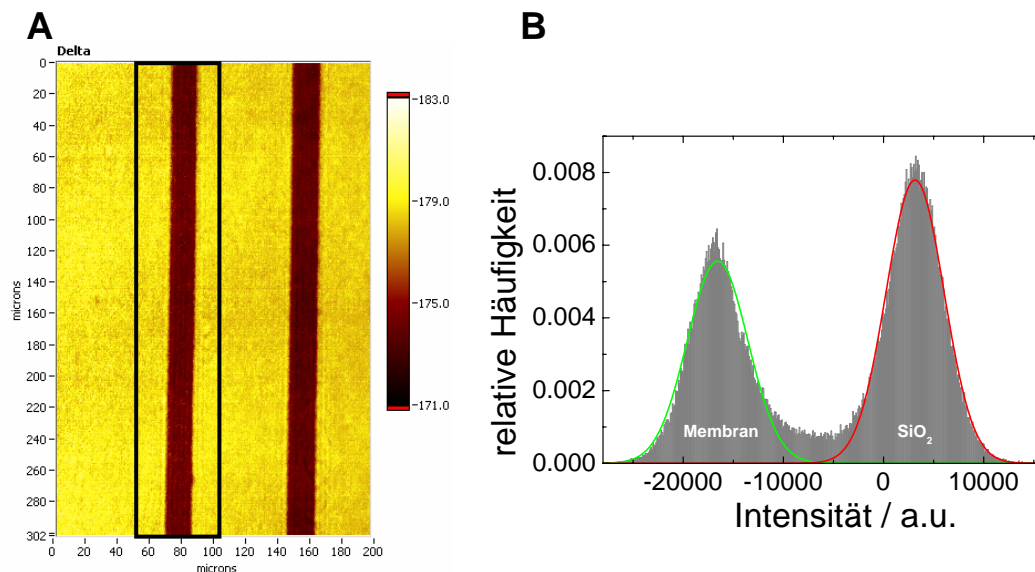


Abbildung 2.12: A) „Delta-Map“ eines strukturierten Lipidbilayers auf Si/SiO₂. Eine Histogramm-Analyse innerhalb des schwarz eingerahmten Bereichs ergibt das in B) dargestellte Histogramm, an das sich die Linearkombination zweier Gauß-Kurven anpassen lässt.

2.2 Die Quarzmikrowaage

(engl. *Quartz crystal microbalance* = QCM)

Die Quarzmikrowaagen-Technik ist eine analytische Methode, welche die *in situ* Detektion von Grenzflächenprozessen, wie z. B. die Massenabscheidung auf Oberflächen, möglich macht. Das Verfahren basiert auf der Eigenfrequenzänderung einer piezoelektrischen Kristallscheibe, sobald diese mit einer Fremdmasse beladen wird. Am häufigsten werden Quarzkristalle als Scheroszillatoren verwendet, die der Methode ihren Namen gaben.^{16,65} Günter Sauerbrey stellte im Jahre 1959 als erster einen linearen Zusammenhang zwischen der Änderung der Resonanzfrequenz Δf und der belegenden Fremdmasse Δm auf:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \cdot \Delta m}{A \cdot \sqrt{c_{66}} \cdot \rho_Q} = -S_f \cdot \frac{\Delta m}{A} \quad (2.17)$$

Hierbei sind A die Elektrodenfläche auf dem Quarz, f_0 die Grundfrequenz des Resonators, ρ_Q die Dichte des Quarzmaterials und \bar{c}_{66} die um den piezoelektrischen Effekt korrigierte Elastizitätskonstante eines *AT-cut* Quarzes. Der Proportionalitätsfaktor S_f wird auch als integrale Schichtwägemempfindlichkeit bezeichnet.⁶⁶

Die Nachweisgrenze bei der Quarzmikrowaagenteknik liegt im Bereich weniger Nanogramm und lässt sich durch Vergrößerung von f_0 erhöhen. Zusätzlich zur Massenbestimmung rigider Filme lassen sich Aussagen über die viskoelastischen Eigenschaften des adsorbierten Materials treffen.¹⁶

In den nachfolgenden Kapiteln werden die theoretischen und praktischen Grundlagen der Quarzmikrowaagenteknik erläutert.

2.2.1 Piezoelektrizität

Kristalle werden als piezoelektrisch bezeichnet, wenn sie einen Zusammenhang zwischen mechanischer Verformung (Zug, Druck, Torsion) und Oberflächenladung zeigen. Wenn ein piezoelektrischer Kristall mechanisch verformt wird, bildet sich eine Potentialdifferenz zwischen den beiden entgegengesetzten Flächen aus. Wenn im umgekehrten Fall an den Kristall eine elektrische Spannung angelegt wird, tritt eine mechanische Verformung auf (inverser piezoelektrischer Effekt, Abbildung 2.13). Dieser auch in Quarzkristallen auftretende Effekt wird in verschiedenen Anwendungen genutzt, z. B. als Zeitgeber in Uhren und Computern oder in Drucksensoren. Voraussetzungen für das Auftreten des piezoelektrischen Effekts sind das Fehlen eines Symmetriezentrums und das Auftreten einer polaren Achse in der Einheitszelle. 20 der 32 Kristallklassen können daher Piezoelektrizität aufweisen, z.B. Quarz, Tourmalin und Rochelle Salz.

Der inverse piezoelektrische Effekt erlaubt es, Quarzkristalle durch Anlegen einer Wechselfrequenz mit der Eigenfrequenz des Quarzes in Schwingung zu versetzen. Die Eigenfrequenz wird durch die Dicke der Quarzscheibe und den Winkel, in dem sie aus dem Kristall herausgeschnitten wird, bestimmt. In dieser Arbeit wurden *AT-cut* Quarze mit einer Dicke von 330 μm verwendet. Dies sind Dickenschwinger mit einer Resonanzfrequenz von 5 MHz.¹⁶

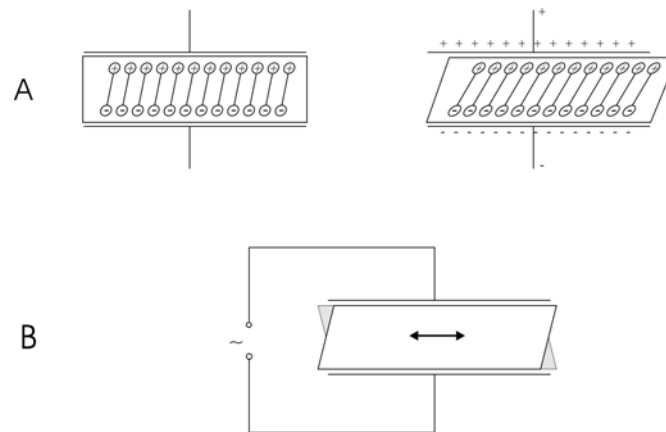


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des Dipolcharakters eines Quarzkristalls und dessen Scherdeformation beim Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes (A) Gleichspannung, B) Wechselspannung).

2.2.2 Elektroakustik

Die elektroakustische Kopplung von piezoelektrischen Schwingern, wie dem Quarzkristall, lässt sich mit Hilfe eines elektrischen Ersatzschaltbildes beschreiben. Im Bereich der Resonanz gilt das nach Butterworth und van Dyke benannte BVD-Schaltbild (Abbildung 2.14).

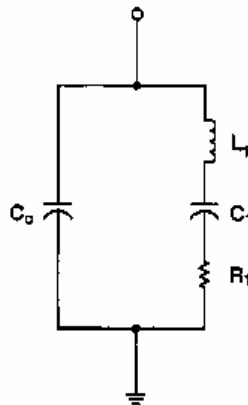


Abbildung 2.14: Butterworth van Dyke (BVD)-Ersatzschaltbild eines Schwingquarzes.⁶⁷

L_1 entspricht der Masse des Quarzes, C_1 seiner Nachgiebigkeit unter Scherspannung und R_1 als ohmscher Widerstand den mechanischen Verlusten durch z. B. Reibung. Zusammengefasst werden diese drei Größen auch als dynamischer oder Serienzweig bezeichnet. Die dazu parallel liegende Kapazität C_0 stellt den elektrischen Zweig dar, denn

das zwischen den beiden Elektroden liegende Quarzmaterial wirkt wie ein Dielektrikum in einem Plattenkondensator.

Man kann für verschiedene Beladungen des Quarzes (dünner Film, viskose Flüssigkeit, dünner Film und viskose Flüssigkeit) jeweils angepasste Ersatzschaltbilder formulieren, wobei ein dünner Film als starre Masse angesehen werden kann. Abbildung 2.15 zeigt exemplarisch das BVD-Ersatzschaltbild für einen mit einer starren Masse belegten Schwingquarz in Kontakt mit einer viskosen Flüssigkeit.⁶⁷

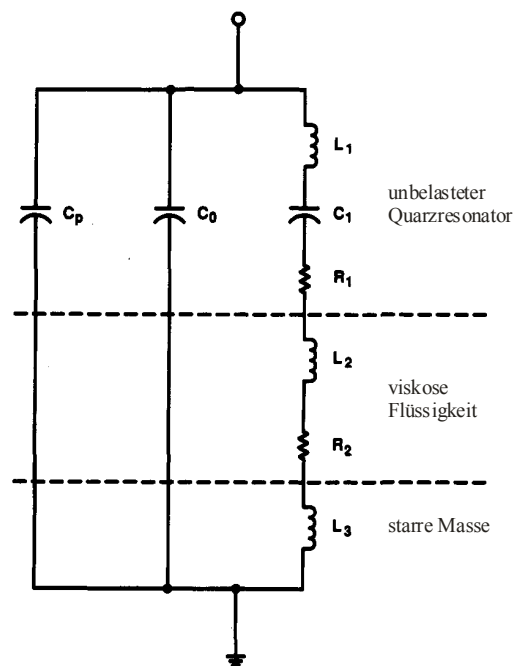


Abbildung 2.15: Ersatzschaltbild eines Quarzresonators in Kontakt mit einer viskosen Flüssigkeit und einer starren Masse. Parasitäre Kapazitäten resultieren aus Kabelverbindungen angeschlossener Messgeräte und sind in C_p zusammengefasst.⁶⁷

Besitzt die beladende Masse viskoelastische Eigenschaften, so gilt nicht mehr die einfache Sauerbrey-Gleichung (2.17). Die Änderung der Resonanzfrequenz hängt dann sowohl von der adsorbierten Masse als auch von deren komplexen Schermodul ab.^{68,69} Dieser Effekt spielt jedoch bei den in dieser Arbeit gezeigten kinetischen Untersuchungen aufgrund der geringen Schichtdicken keine Rolle.

2.2.3 Messaufbau und Messbedingungen

Abbildung 2.16 zeigt den schematischen Versuchsaufbau für die Messungen mit der Quarzmikrowaage. Nach dem Einbau des Quarzes in die Messzelle wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Ismatec, Wertheim-Mondfeld) Puffer aus dem Probengefäß V2 durch die Apparatur gepumpt. Die Probenzugabe erfolgte aus dem Probengefäß V1 durch Umlegen eines 3-Wege-Hahns, wobei der Kreislauf so geschaltet wurde, dass die Flüssigkeit nach der Messzelle wieder zurück in das Probengefäß V1 gelangte. Nach Beendigung der Probenzugabe konnte die funktionalisierte Quarzoberfläche wieder mit probenfreiem Puffer aus V2 gespült werden. Die Pumpgeschwindigkeit wurde während der Messzeit konstant gehalten und es musste darauf geachtet werden, dass Schläuche und Messzelle frei von Luftblasen waren. Durch den Thermoschrank wurde eine konstante Temperatur während der Messung gewährleistet, gleichzeitig diente er als Faradaykäfig.

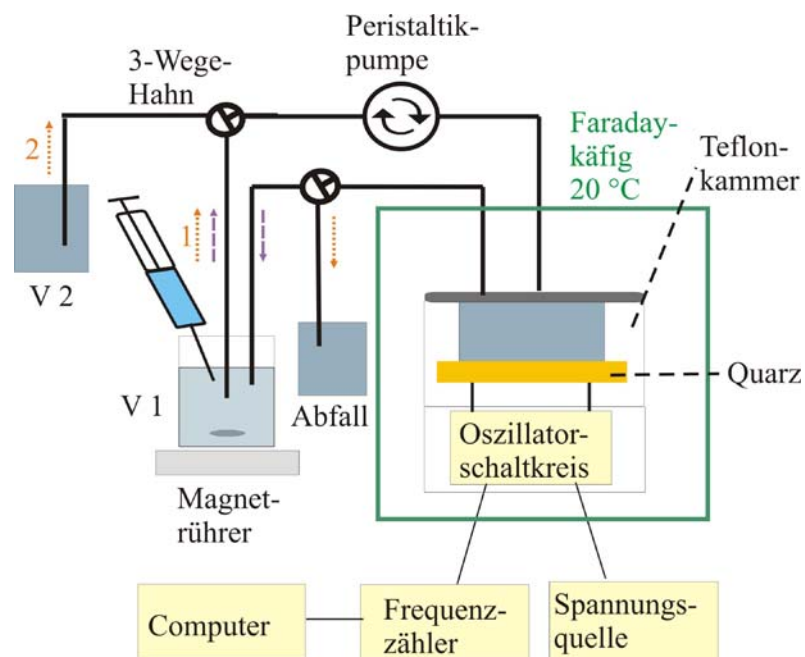


Abbildung 2.16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die QCM-Messung. Messzelle und Reaktionsgefäß befinden sich im Thermoschrank.⁷⁰

Die Goldelektroden des Quarzresonators in der Messzelle wurden an einen Oszillatorschaltkreis (TTL SN74LS124N, Texas Instruments) angeschlossen, in dem der Quarz als frequenzbestimmendes Element fungiert. Der Oszillatorschaltkreis wurde von einer Spannungsquelle konstant mit 4 V (Gleichspannung) gespeist und die auftretenden Energieverlust durch Rückkopplung phasenrichtig ausgeglichen. Die Frequenz wurde über

einen Frequenzzähler ausgelesen und an einen Computer weitergeleitet, an dem ein Resonanzfrequenz-Zeit-Diagramm aufgezeichnet wurde. Die zeitliche Auflösung lag bei 0.2 - 0.3 Sekunden. Die Messzelle ist detailliert in Abbildung 2.17 dargestellt. Im Unterteil sind zwei Kontakte eingelassen, die die Goldelektrode des Quarzresonators mit dem entsprechenden Messgerät verbinden. Die Kontaktierung der oberen Goldelektrode erfolgt durch Silberleitlack, der am Rand des Quarzresonators angebracht wird. Durch die Teflonkammer führen ein zentraler Zulauf und seitliche Abläufe mit einem Durchmesser von je 1 mm. Der Quarz wird mit Kalrez® O-Ringen abgedichtet.

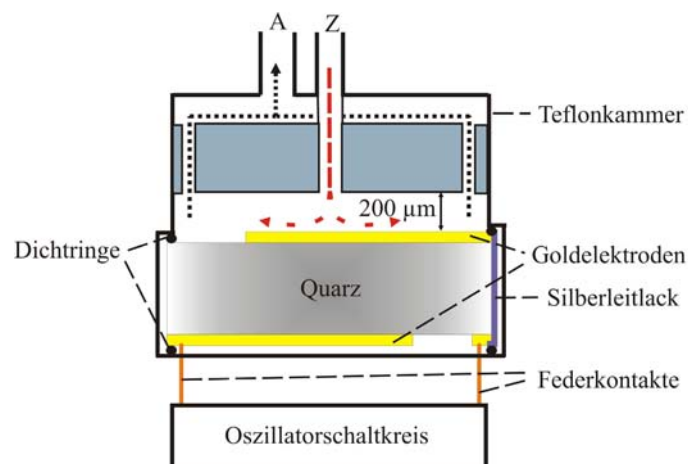


Abbildung 2.17: Schematische Darstellung der QCM-Messzelle.⁷⁰

2.3 Rasterkraftmikroskopie

In der Biophysikalischen Chemie werden für die Abbildung von Oberflächen meistens optische Methoden verwendet. Allerdings ist bei den herkömmlichen optischen Mikroskopen die Auflösung durch das optische Auflösungsvermögen nach Abbe durch die Wellenlänge beschränkt. Um laterale Auflösungen im Nanometerbereich zu erreichen, muss daher auf andere Methoden zurückgegriffen werden. Dazu gehören unter anderem optische Methoden (z. B. TEM) und Rastersondenmethoden (z. B. SNOM und STM). Zu dieser Art gehört auch die Rasterkraftmikroskopie (SFM = *scanning force microscopy*). Die Sonde ist hierbei eine sehr feine Spitze am Ende eines dünnen Federbalkens (Cantilever). Die gemessene Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe resultiert aus elektrostatischen, hydrodynamischen und van der Waals-Kräften. Der Verlauf des Wechselwirkungspotentials und der daraus resultierenden Kraft zwischen Spitze und Probe ist in Abbildung 2.18

skizziert. Anwendung findet das Rasterkraftmikroskopie z. B. in der Strukturaufklärung, zur Abbildung von Topographien und der Detektion von mechanischen Eigenschaften einer Oberfläche.

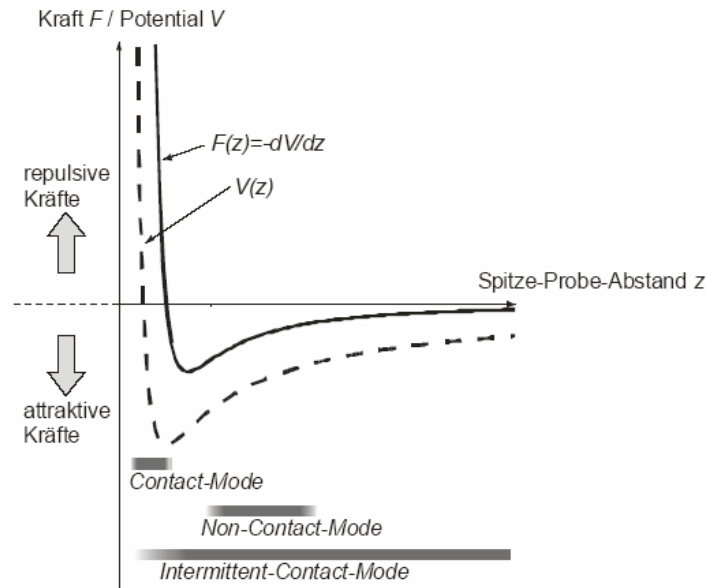


Abbildung 2.18: Das Wechselwirkungspotential $V(z)$ und die daraus abgeleitete Kraft $F(z)$ in Abhängigkeit des Abstandes z zwischen Messspitze und Probe. Zusätzlich sind die Arbeitsbereiche der gängigsten Betriebsmodi eingezeichnet.⁷¹

Das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie wurde erstmals 1986 von Binnig, Quate und Gerber vorgestellt.⁷² Bei der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops, mit dessen Hilfe sich Aussagen über Oberflächeneigenschaften aufgrund eines zwischen Spitze und Probe fließenden Tunnelstroms treffen lassen, fanden sie die oben erwähnten Kräfte, die ebenfalls die Oberflächenbeschaffenheit widerspiegeln. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe verändert sich die Verbiegung des Federbalkens, die Detektion der Verbiegung erfolgt üblicherweise durch das Lichtzeigerprinzip.⁷³ Dabei wird ein von der Rückseite des Federbalkens reflektierter Laserstrahl in einer Vierquadrantenphotodiode gemessen. Die Federbalken bestehen üblicherweise aus Silizium oder Siliziumnitrid, ihre Rückseite kann für eine bessere Reflektion mit Aluminium oder Gold beschichtet sein. Wichtig ist die Federkonstante des Federbalkens, die von dessen Geometrie abhängt und typischerweise zwischen 0.001 N/m und 50 N/m liegt. Je kleiner die Federkonstante des Federbalkens, desto sensibler reagiert dieser auf die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe. Der Spitzenradius beträgt zwischen 2 nm und 100 nm und beeinflusst das laterale Auflösungsvermögen.

Der schematische Aufbau eines Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 2.19 dargestellt. Die Verbiegung des Federbalkens wird durch den reflektierten Laserstrahl gemessen und verstärkt. Der Federbalken selbst kann über einen zusätzlichen Schüttelpiezo oder über die Oszillation eines z -Piezoelements in Schwingung versetzt werden. Die Verwendung eines Schüttelpiezos ist vor allem bei hohen Resonanzfrequenzen des Federbalkens (*tapping*-Modus an Luft) nötig. Die Probe ist meist auf einem Piezoscanner positioniert, der die Verschiebung in x , y und z -Richtung erlaubt. Durch das Abrastern der Oberfläche (xy -Richtung) und die Detektion der zwischen Spitze und Probe auftretenden Kräfte wird dann die Bildinformation gewonnen. Ein elektronischer Rückkopplungsmechanismus ist für die Regelung verantwortlich.

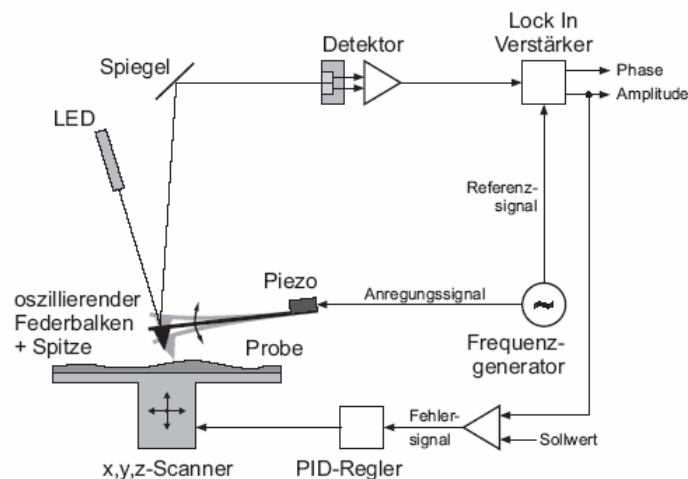


Abbildung 2.19: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops betrieben im *tapping*-Modus.⁷¹

2.3.1 Regelkreise

Während des Abrasterns der Probe wird zur Aufnahme der Bildinformation ein bestimmter Messparameter konstant gehalten (Soll-Wert). Dies kann z. B. die Verbiegung des Federbalkens oder dessen Schwingungsamplitude sein. Sobald der aktuelle Messparameter (Ist-Wert) vom Sollwert abweicht (Regelabweichung), kommt es durch die Elektronik zu einer Regelung, so dass die Abweichung durch eine entsprechende Stellgröße korrigiert wird. Wie diese Stellgröße von der Regelabweichung abhängt, wird durch die Übertragungsfunktion definiert. Im Allgemeinen wird eine Kombination aus einem Proportional- und einem Integral-Regler (Proportional-, Integral- und Differentialregler)

verwendet. Für diesen Regler gilt bei einer zeitabhängigen Regelabweichung $e(t)$ folgende Stellgröße $x(t)$:

$$x(t) = g \left(K_p e(t) + \frac{1}{T_1} \int_{-\infty}^0 e(\tau) d\tau \right). \quad (2.18)$$

Hierbei sind K_p der Proportionalitätsfaktor und T_1 die Nachstellzeit des Integralreglers. Diese beiden Parameter werden so eingestellt, dass die Regelabweichung so gering wie möglich gehalten wird. Der Parameter g ist ein Verstärkungsfaktor.

2.3.2 Betriebsmodi

Es gibt in der Rasterkraftmikroskopie verschiedene Betriebsmodi. Die am häufigsten verwendeten Modi sind der *contact*-Modus und der *intermittent contact*-Modus (auch *tapping*-Modus, deren wichtigsten Eigenschaften im Folgenden kurz erläutert werden.

2.3.2.1 *contact*-Modus

Im *contact*-Modus besteht während der Messung ein ständiger mechanischer Kontakt zwischen Spitze und Probe, wobei die Spitze mit einer konstanten Kraft aufgedrückt wird. Die Verbiegung des Federbalkens wird konstant gehalten und die dafür notwendige Veränderung des z -Piezoscanners aufgenommen. Der *contact*-Modus ermöglicht eine relativ schnelle Aufnahme mit hoher Auflösung, allerdings kann durch den ständigen Kontakt zwischen Spitze und Probe einerseits die Spitze beschädigt werden, andererseits die Probe verändert werden. Weiche Probenbereiche werden durch die wirkenden Kräfte eingedrückt und erscheinen somit niedriger als harte Bereiche. Außerdem sind die auftretenden lateralen Kräfte sehr hoch. Daher ist es mit dieser Methode möglich die Probe zu zerstören, sie kann jedoch auch dazu verwendet werden, kleine Probenbereiche gezielt zu verändern.

2.3.2.2 *tapping*-Modus

Im *tapping*-Modus (oder allgemein *intermittent contact*-Modus) wird der Federbalken im Bereich seiner Resonanzfrequenz angeregt. Die freie Schwingung wird durch die Wechselwirkung mit der Probe beeinflusst und im repulsiven Potentialbereich gedämpft. Die Schwingungsamplitude wird während der Messung konstant gehalten und die dafür notwendige Veränderung des *z*-Piezoscanners als Höheninformation ausgelesen. Durch die Schwingungsdämpfung beim Spitze-Probe-Kontakt ergibt sich zusätzlich eine Phasendifferenz zwischen angeregter und resultierender Schwingung. Diese Phasendifferenz ist ein Maß für die Energiedissipation durch die Probe, so dass sich auch Unterschiede in mechanischen Eigenschaften detektieren lassen. Im Gegensatz zum *contact*-Modus werden im *tapping*-Modus wesentlich kleinere laterale Kräfte auf die Probe ausgeübt. Er wird daher vor allem für weiche Proben bevorzugt.

2.4 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

(CLSM = *confocal laser scanning microscopy*)

Fluorophore sind Moleküle, die Licht absorbieren und Fluoreszenzlicht, das stets eine größere Wellenlänge besitzt, emittieren. Um dieses Phänomen zu detektieren, muss die Quantenausbeute, d. h. die Effektivität dieses Prozesses, ausreichend groß sein. Falls die Emission im Bereich des sichtbaren Lichts liegt, kann man die Fluoreszenz mit einem Lichtmikroskop beobachten. Die Funktionsweise eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 2.20 dargestellt. Als Lichtquelle dient eine Xenon- oder Quecksilberdampfampe, die weißes Licht emittiert. Durch den Anregungsfilter wird ein Wellenlängenbereich herausgefiltert und transmittiert, der mit dem Absorptionsbereich des Fluorophors übereinstimmt. Dieses Licht wird von einem dichroischen Spiegel durch ein Objektiv auf die Probe reflektiert. Das langwelligere Fluoreszenzlicht wird von dem dichroischen Spiegel transmittiert und gelangt durch einen Emissionsfilter und das Okular zum Betrachter.

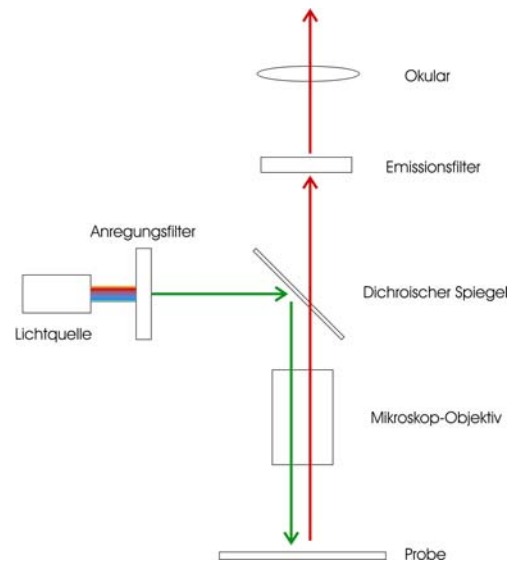


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Fluoreszenzmikroskops.

Bei einem konventionellen Lichtmikroskop wird nicht nur Licht aus der Brennebene des Objektivs detektiert, sondern auch unfokussiertes Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene. Dies verringert die räumliche Auflösung der konventionellen Mikroskopie. Beim konfokalen Mikroskop wird das Licht, das nicht direkt aus der Brennebene kommt, vor dem Detektor ausgeblendet (Abbildung 2.21). Dafür benutzt man zwei Lochblenden mit sehr kleinen Durchmessern. Als Detektor wird z. B. ein *Photomultiplier* verwendet, dessen Signal direkt von einem Computer ausgelesen werden kann.

Durch den symmetrischen Aufbau dieses Systems sind beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal. Die Limitierung des emittierten Lichts auf eine einzelne Fokusebene erhöht die Auflösung und den Kontrast des Bildes. Durch die Verwendung des monochromatischen kohärenten Lichts eines Lasers als Anregungsquelle wird die Auflösung noch weiter verbessert.⁷⁴

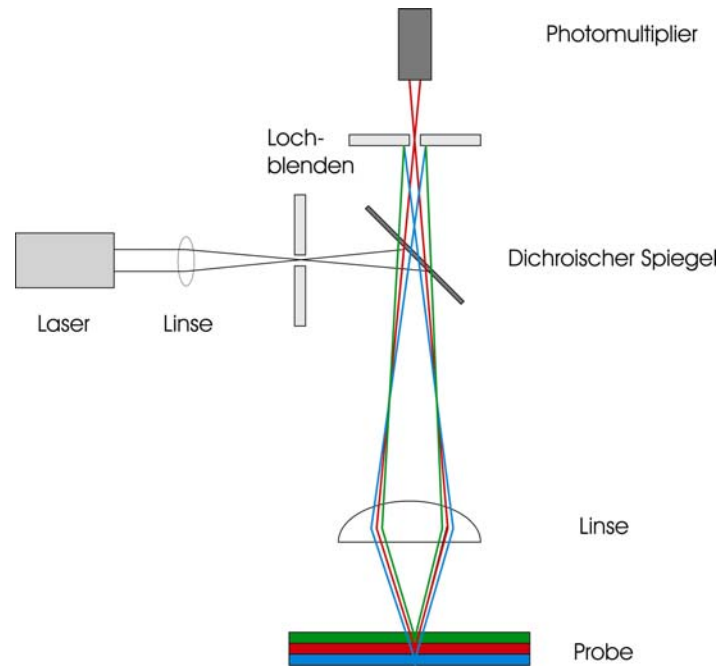


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Nur der rote Lichtstrahl stammt direkt aus der Brennebene. Der blaue und grüne Lichtstrahl, die nicht direkt aus der Brennebene stammen, werden durch die Lochblende vor dem Detektor ausgeblendet.

Das Signal, das genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektivs darstellt, wird von einem Photomultiplier detektiert. Um ein vollständiges Bild zu erhalten, muss die Probe punktweise gerastert werden. Dazu werden bewegliche Spiegel im Strahlengang positioniert. Die einzelnen Signale werden dann von einem Computer zu einem zweidimensionalen Bild zusammengefügt. Durch das Ausblenden des Lichts, das von außerhalb der Fokusebene kommt, werden die Auflösung und der Kontrast des Bildes erhöht. Außerdem kann man durch Veränderung der Fokusebene dreidimensionale Fluoreszenzbilder aufnehmen.

2.5 Dynamische Monte Carlo-Simulationen

Das Bindungsverhalten von Proteinen auf einer heterogenen Oberfläche wurde mit Hilfe von dynamischen Monte Carlo-Simulationen, d. h. basierend auf einer großen Anzahl von Zufallsexperimenten, untersucht. Die Kinetik wurde durch ein Modell der reversiblen zufälligen sequentiellen Adsorption (RSA = *random sequential adsorption*) beschrieben.

2.5.1 Kinetik der RSA

Adsorptionskinetiken kleiner Partikel, die in einer Monolage resultieren, werden gewöhnlich durch das Langmuir-Modell beschrieben:⁷⁵

$$\frac{d\Theta}{dt} = k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} (\Theta_{\text{max}} - \Theta) - k_{\text{off}} \Theta. \quad (2.19)$$

Hierbei ist Θ die Oberflächenbelegung zum Zeitpunkt t , ρ_{bulk} die Dichte der Partikel mit Radius a in der Flüssigkeit, k_{on} und k_{off} die Geschwindigkeitskonstanten für die Ad- und Desorption und Θ_{max} die maximale Belegung ($\Theta_{\text{max}} = 1$). Bei der Adsorption von größeren Partikeln, wie z. B. von Proteinen an einer Lipiddoppelschicht, ist der Radius der adsorbierenden Moleküle größer als der Radius einer einzelnen Lipidkopfgruppe. Im Modell wird dies dadurch berücksichtigt, dass sich ein einzelnes Partikel auf der Oberfläche über mehrere Gitterplätze erstreckt. In diesem Fall wird die Kinetik durch das Langmuir-Modell nicht mehr korrekt wiedergegeben. Die für die Adsorption zur Verfügung stehende Oberfläche ist nicht mehr nur durch die Belegung Θ bestimmt, sondern muss allgemein als eine Funktion der zur Verfügung stehenden Oberfläche (*ASF = available surface function*) $\Phi(\Theta)$ beschrieben werden. Damit ergibt sich eine generalisierte Form der Langmuir-Gleichung

$$\frac{d\Theta}{dt} = k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} \Phi(\Theta) - k_{\text{off}} \Theta \quad (2.20)$$

als Ausgangsgleichung für die zweidimensionale reversible RSA.³¹ Dabei beschreibt der erste Term mit k_{on} eine irreversible RSA, während die Desorption durch die Ergänzung des zweiten Terms mit k_{off} berücksichtigt wird. Im Gegensatz zu dem eindimensionalen Fall, dem so genannten *parking lot model*, lässt sich Gleichung (2.20) nicht analytisch lösen. Es gibt jedoch verschiedene Näherungslösungen für die ASF, die allerdings meist nur eingeschränkt für bestimmte Belegungsgrade gültig sind. Generell werden die adsorbierenden Partikel als Scheiben mit festem Durchmesser d angesehen, die nicht überlappen dürfen. Bei der Adsorption dieser Partikel auf der Oberfläche treten bei höheren Belegungen Probleme auf, da die freie Oberfläche nicht linear mit der Anzahl der adsorbierten Partikel skaliert. Dies ist anschaulich in Abbildung 2.22 dargestellt.⁷⁶

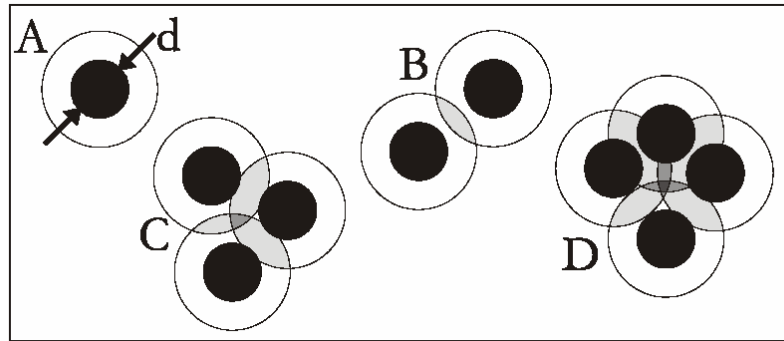


Abbildung 2.22: Teilbereich einer Oberfläche, die mit mehreren Scheiben des Durchmessers d belegt ist. Im Ausschlusskreis mit Durchmesser $2d$ darf sich kein weiterer Mittelpunkt einer Scheibe befinden. Die in grau dargestellten Schnittmengen dieser Bereiche müssen bei der Berechnung der ASF als Korrekturglieder berücksichtigt werden.⁷⁷

Ein einzelnes Partikel verhindert die Adsorption weiterer Partikel in einem Kreis mit dem Durchmesser $2d$, d. h. der Mittelpunkt eines adsorbierenden Partikels darf sich nicht innerhalb dieses Ausschlusskreises befinden. Bei höheren Belegungen tritt jedoch der Fall ein, dass sich die Ausschlusskreise überlappen, so dass die zur Verfügung stehende Oberfläche nicht mehr um πd^2 pro Partikel reduziert wird, sondern um die Schnittmenge der Ausschlusskreise korrigiert werden muss. Die ASF kann durch eine Potenzreihe gemäß

$$\Phi(\Theta) = 1 + A_1 \cdot \Theta + A_2 \cdot \Theta^2 + A_3 \cdot \Theta^3 + \dots \quad (2.21)$$

ausgedrückt werden. Bei Partikel gleicher Größe treten keine Terme höherer Ordnung als A_4 auf. Die Entwicklung der ASF für das irreversible RSA-Modell bis zu Potenzen dritter Ordnung ergibt

$$\Phi(\Theta) = 1 - 4\Theta + \frac{6\sqrt{3}}{\pi} \Theta^2 + \frac{40\sqrt{3} \cdot \pi - 176}{3\pi^2} \Theta^3 \approx 1 - 4\Theta + \frac{6\sqrt{3}}{\pi} \Theta^2 + 1.4069 \cdot \Theta^3, \quad (2.22)$$

während die Entwicklung für die reversible RSA

$$\Phi(\Theta) = 1 - 4\Theta + \frac{6\sqrt{3}}{\pi} \Theta^2 + 2.4243 \cdot \Theta^3 \quad (2.23)$$

ergibt.³¹ Beide Reihenentwicklungen stimmen bis zur zweiten Ordnung überein, die Abweichung der Vorfaktoren für höhere Potenzen resultiert daraus, dass die ASF bei der irreversiblen RSA bei Erreichen der maximalen Belegung, dem so genannten *jamming limit* $\Theta_{\text{jam}} = 0.547$, gleich Null ist.⁷⁸

Einen weiteren großen Einfluss auf die Kinetik eines realen Adsorptionsprozesses hat der Massentransport. Dieser wird einerseits durch die Diffusion der Partikel in der Lösung und andererseits durch einen gerichteten Partikelfluss aufgrund hydrodynamischer Kräfte bestimmt. Allgemein muss daher in Gleichung (2.20) nicht die Partikeldichte in Lösung berücksichtigt werden, sondern genauer die Partikeldichte an der Oberfläche $\rho(\delta)$. Somit ergibt sich dann

$$\frac{d\Theta}{dt} = k_{\text{on}} \pi a^2 \rho(\delta) \Phi(\Theta) - k_{\text{off}} \Theta. \quad (2.24)$$

Da sich der Parameter $\rho(\delta)$ im Allgemeinen schwer bestimmen lässt, ist es hilfreich, diesen in Abhängigkeit von ρ_{bulk} zu formulieren. Unter der Annahme eines linearen Transports von Partikeln aus der Lösung zur Oberfläche ergibt sich für den Partikelfluss j :

$$j = k_{\text{tr}} (\rho_{\text{bulk}} - \rho(\delta)) = \frac{d\Theta}{dt} \quad (2.25)$$

mit der Ratenkonstante k_{tr} für den Transport.

Somit lässt sich Gleichung (2.24) zu

$$\frac{d\Theta}{dt} = \frac{k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} \Phi(\Theta) - k_{\text{off}} \Theta}{1 + \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{tr}}} \Phi(\Theta)} \quad (2.26)$$

umformen.⁷⁹ Gleichung (2.26) dient zur Beschreibung der Kinetik einer reversiblen Proteinadsorption, bei einem irreversiblen Prozess gilt $k_{\text{off}} = 0$, so dass der zweite Term im Zähler entfällt.

3 Präparative Methoden

3.1 Isolierung von Annexin A1 und A2t

Rekombinantes *porcine* Annexin A1 wurde zusammen mit Katja Kastl im Arbeitskreis von Prof. Dr. Volker Gerke im Zentrum Medizinische Biochemie der Universität Münster nach einer Vorschrift von Rosengarth *et al.* durch Proteinexpression in E.Coli – Zellen gewonnen und mittels FPLC gereinigt.^{70,80} Der Heterotetramer-Komplex Annexin A2t wurde im Arbeitskreis Steinem an der Universität Göttingen nach einer Vorschrift von Gerke und Weber aus Schweinemucosa isoliert und ebenfalls mittels FPLC gereinigt.^{50,70,81} Die Analyse der Proteine erfolgte über Gelelektrophorese (SDS-PAGE)⁸² und die Konzentrationsbestimmung über UV-Spektroskopie.

Es lagen 0.5 - 1 mL Aliquots von Annexin A1 mit einer Proteinkonzentration von etwa 0.1 - 0.5 mg/mL in 50 mM Mes/NaOH, 0.1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, pH 5.9 vor. Diese wurden in der Versuchsvorbereitung mindestens 18 Stunden bei 4 °C gegen 20 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, pH 7.4 dialysiert.

Annexin A2t lag in 28 µL Aliquots mit einer Proteinkonzentration von 11.2 mg/mL in 50 mM Mes/NaOH, 0.1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, pH 6.0 vor. Diese wurden vor der Versuchsdurchführung mit 280 µL Puffer (20 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, pH 7.4) auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt.

Die Proteinlösungen wurden bei 4 °C gelagert und maximal zwei Wochen verwendet.

3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels UV-Spektroskopie

Proteinkonzentrationen lassen sich im Allgemeinen durch UV-Spektroskopie bestimmen, wobei die Absorption der in den Proteinen vorhandenen aromatischen Aminosäuren bei 280 nm verwendet wird. Hauptsächlich wird hierbei die Aminosäure Tryptophan detektiert. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1)$$

mit der Extinktion E , dem Extinktionskoeffizienten ε , der Konzentration c und der Schichtdicke der Probe d .

Im Laufe dieser Arbeit wurden die beiden Annexine A1 und A2t verwendet. In Tabelle 2 sind die Molmassen, die Extinktionskoeffizienten und die molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm angegeben.

Tabelle 2: Molmassen und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine Annexin A1 und Annexin A2t.^{70,81,83}

	Molmasse $M / \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{280} / \text{cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$	Molarer Extinktionskoeffizient $\varepsilon^*_{280} / \text{L} \cdot (\text{cm} \cdot \text{mol})^{-1}$
Annexin A1	38700	0.6	23200
Annexin A2t	98900	0.65	64300

3.3 Proteinlabeling mit Fluoreszenzfarbstoff

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von Annexin A1 und A2t an POPC/POPS-Membranen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt. Dazu wurde ein Texas Red-Labeling Kit (Molecular Probes) verwendet. 0.5 mg Protein wurde in 0.5 - 1 mL PBS-Puffer vorgelegt, wobei gegebenenfalls dialysiert wurde, und anschließend mit 50 μL NaHCO_3 ($c = 1 \text{ mol/L}$) versetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff Texas Red wurde als NHS-Ester in DMSO gelöst und im doppelten molaren Überschuss zugegeben. Anschließend wurde eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Die Reaktion erfolgte an frei zugänglichen Amino-Gruppen im

Protein, d. h. hauptsächlich am N-Terminus. Zur Abtrennung des überschüssigen Farbstoffs wurde über eine Sephadex G75-Säule chromatographiert. Die Effizienzanalyse der Reaktion erfolgte mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie nach folgenden Gleichungen für die Proteinkonzentration c_{Protein} in mol/L:

$$c_{\text{Protein}} = \frac{(A_{280} - (A_{595} \cdot 0.18))}{\epsilon_{\text{Protein}}^*} \quad (3.2)$$

und das molare Verhältnis von Farbstoff zu Protein:

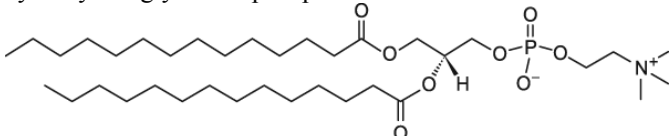
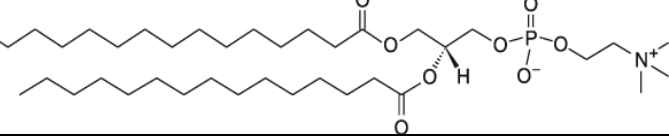
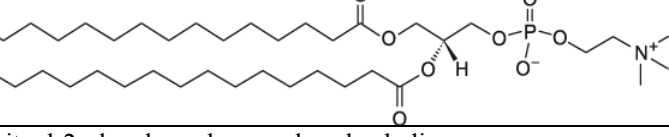
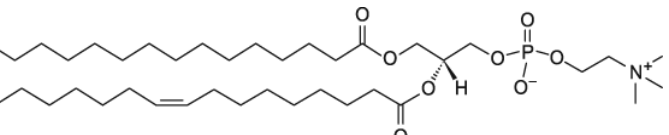
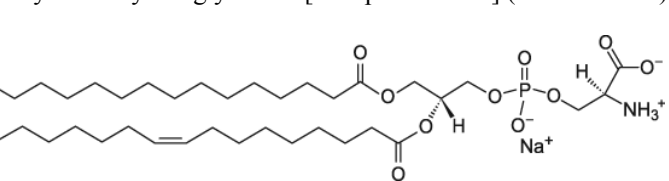
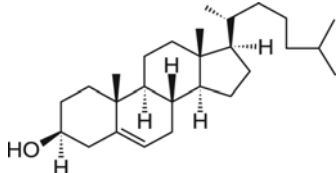
$$\frac{n_{\text{Farbstoff}}}{n_{\text{Protein}}} = \frac{A_{595}}{\epsilon_{\text{Farbstoff}} \cdot c_{\text{Protein}}} \quad (3.3)$$

Hierbei sind A_{280} und A_{595} die gemessenen Absorptionen bei 280 nm und 595 nm, $\epsilon_{\text{Protein}}^*$ der molare Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm und $\epsilon_{\text{Farbstoff}} = 80000 \frac{\text{L}}{\text{cm} \cdot \text{mol}}$ der des Farbstoffs bei 595 nm. Der Faktor $0.18 \cdot A_{595}$ ist eine Korrektur für die Absorption des Farbstoffs bei 280 nm.

3.4 Eigenschaften der verwendeten Lipide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Lipide verwendet. Darunter befanden sich Phospholipide und das Sterol Cholesterol. Lipide sind amphiphile Moleküle, d. h. sie bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Bereich. Bei Phospholipiden ist die hydrophile Kopfgruppe durch einen Phosphorsäurerest gekennzeichnet, bei Cholesterol ist es lediglich eine Hydroxyl-Gruppe. Der hydrophobe Bereich besteht bei Phospholipiden aus zwei Fettsäureresten, bei Cholesterol aus aneinanderhängenden ungesättigten Kohlenwasserstoffringen, dem so genannten Gonan-Gerüst und einer verzweigten Alkylkette.

Tabelle 3: Strukturformeln, Nomenklatur und Eigenschaften der verwendeten Lipide.⁸⁴⁻⁸⁶

Abkürzung	vollständiger Name und Struktur	Kettenlänge	Molmasse M / g·mol ⁻¹	T _m
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin 	14:0-14:0	677.94	23 °C
diC ₁₅ PC	1,2-Dipentadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin 	15:0-15:0	706.00	34 °C
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin 	16:0-16:0	734.05	41 °C
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphocholin 	16:0-18:1	760.09	-2 °C
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[Phospho-L-serin] (Natrium-Salz) 	16:0-18:1	784.00	< -7 °C
	Cholesterol 		386.64	

3.4.1 Phasenverhalten von Phospholipiden

Phospholipidmembranen zeichnen sich im Allgemeinen durch einen hohen Polymorphismus aus. Dabei wird das Auftreten und die Stabilität der Phasen durch die Kettenlänge, deren Sättigungsgrad, die Kopfgruppe und die Symmetrie der Ketten bestimmt. So existieren mehrere Gelphasen (L_c , L_β , L_β' , P_β'), deren Übergänge normalerweise durch niedrige Umwandlungsenthalpien gekennzeichnet sind und oft als Vorumwandlungen bezeichnet

werden. Der Übergang in die fluide, oder flüssigkristalline, Phase L_α besitzt hingegen eine deutlich erhöhte Umwandlungsenthalpie und weist auch die größten Änderungen der physikalischen Eigenschaften, wie z. B. Membrandicke, laterale Mobilität der Lipide, Elastizität und Kompressibilität, auf. Dieser Übergang, in dem die Ordnung der Ketten größtenteils verloren geht, wird daher auch als Hauptphasenumwandlung bezeichnet. Zusätzlich kann durch Zugabe von verschiedenen Alkoholen oder anderer Amphiphile eine interdigitierte Phase ($L_{\beta i}$) hervorgerufen werden, die sich durch eine deutlich verringerte Schichtdicke auszeichnet.

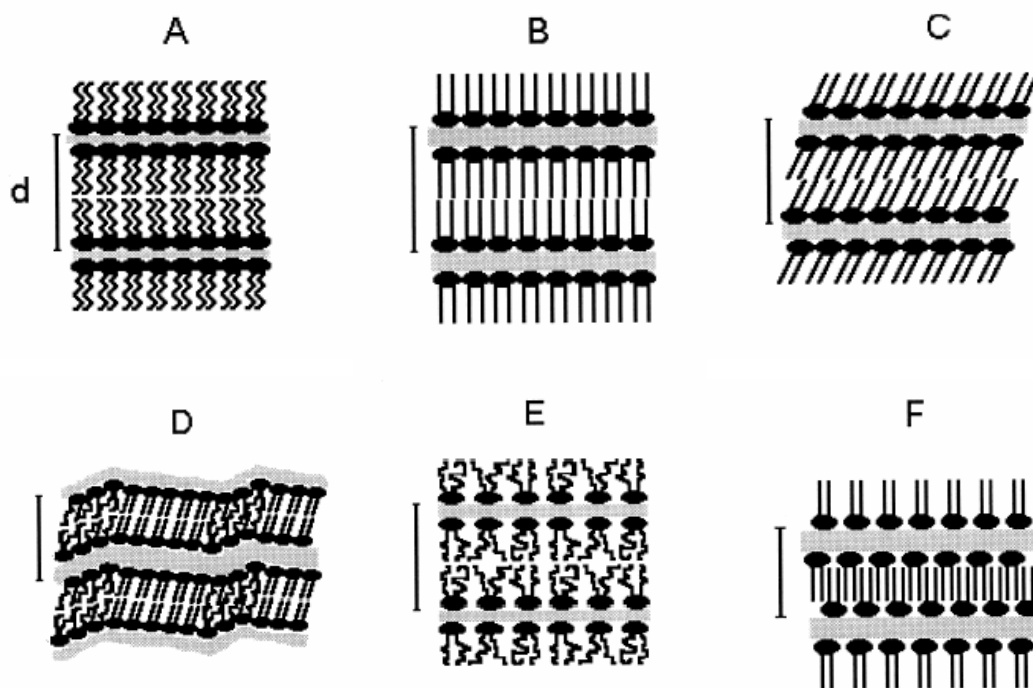


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der bei Lipidmembranen vorkommenden Phasen. A) Sub-Gelphase L_c , B) Gelphase L_β (nicht gekippte Ketten), C) Gelphase L_β , D) rippled Gelphase P_β , E) flüssigkristalline oder fluide Phase L_α , F) interdigitierte Phase $L_{\beta i}$.

3.5 Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen ebenfalls Lipidcharakter, so dass sie in Phospholipidvesikel eingebaut werden können:

- Texas Red® 1,2-dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin, Triethylammonium-Salz (**Texas Red® DHPE**)
- 2-(4,4-Difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-3-dodecyl)-1-hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (**β-BODIPY® 500/510 C₁₂-HPC**)

In den folgenden Abbildungen sind die Strukturformeln und die jeweiligen Absorptions- und Emissionsspektren dargestellt.⁸⁷

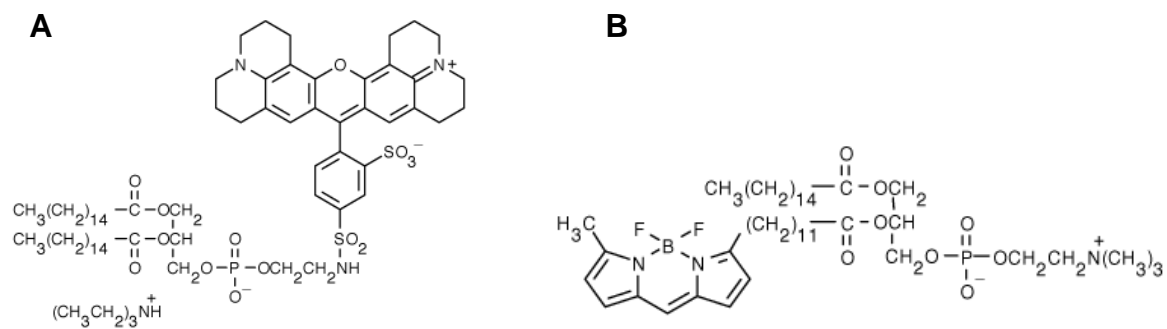


Abbildung 3.2: Strukturformeln von A) TexasRed®-DHPE und B) β-BODIPY® 500/510-C₁₂-HPC.

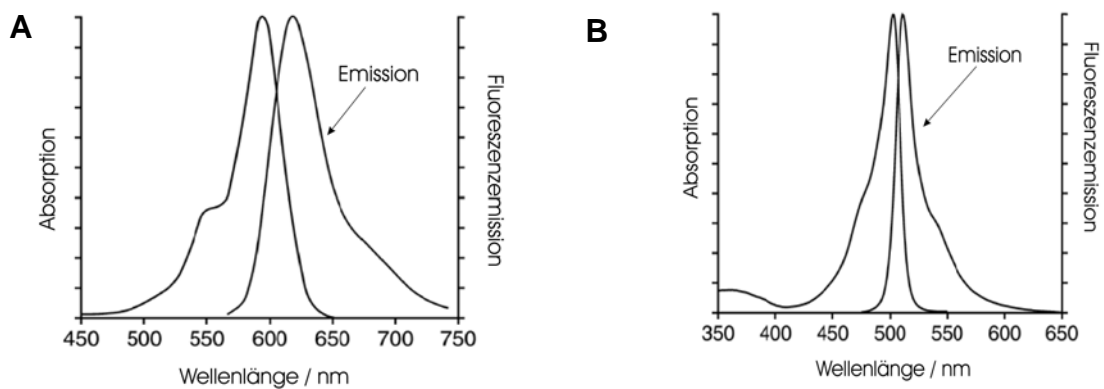


Abbildung 3.3: Absorptions- und Emissionsspektren von A) TexasRed®-DHPE und B) β-BODIPY® 500/510-C₁₂-HPC.

Die Anregung des TexasRed-Farbstoffs erfolgt bei 543 nm, der Bodipy-Farbstoff wurde bei 488 nm angeregt. Die Emissionsbande des Bodipy-Farbstoffs überlappt mit der Absorptionsbande des TexasRed-Farbstoffs. Sie bilden ein so genanntes Försterpaar, d. h. bei ausreichend kleinem Abstand zwischen diesen beiden Farbstoffen fungiert der Bodipy-Farbstoff als Försterdonor, dessen Fluoreszenzemission den längerwellig absorbierenden TexasRed-Farbstoff, den Försterakzeptor, anregen kann.

3.6 Herstellung unilamellarer Vesikel

Kleine unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser kleiner als 100 nm wurden durch die Vesikelextrusionsmethode und durch hochenergetischen Ultraschall hergestellt. In beiden Fällen wurden im Vorfeld Lipidfilme präpariert. Aus Stammlösungen der Lipide in Chloroform mit einer Konzentration von 2 - 10 mg/mL wurden die Lipide im gewünschten molaren Verhältnis in ein sauberes Reagenzglas pipettiert und 0.5 mL Chloroform/Methanol (1:3, v/v) zugegeben, so dass eine Gesamtmenge von 0.25 - 1 mg Lipid vorhanden war. Das Lösungsmittel wurde dann in einem Wasserbad unter einem Stickstoffstrom verdampft, so dass am Reagenzglasboden ein Lipidfilm entstand. Anschließend wurden die Filme drei Stunden im Vakuumschrank getrocknet, um Lösungsmittelreste zu entfernen. Sowohl das Verblasen der Lipidfilme als auch das Evakuieren fanden oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipids statt. Die Reagenzgläser wurden anschließend mit Parafilm verschlossen und bis zu 6 Monate bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Herstellung von Vesikeln wurden die Lipidfilme mit dem entsprechenden Puffer versetzt, so dass eine Konzentration von 0.5 - 1 mg/mL erhalten wurde. Alle folgenden Schritte erfolgten dann oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipids. Nach zehn Minuten wurden die Filme alle fünf Minuten viermal je 20 Sekunden auf einem Vortexer geschüttelt (Heidolph, REAX Top). Die deutlich getrübe Suspension aus multilamellaren Vesikeln wurde dann auf eine Hamiltonspritze aufgezogen und mit Hilfe eines Miniextruders (LiposoFast, Avestin) 31 Mal durch eine Polycarbonatmembran gedrückt, die Löcher mit einem nominellen Durchmesser von 100 nm besaß.⁸⁸ Die daraus resultierende unilamellare Vesikelsuspension konnte dann mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Um nach mehrtägiger Lagerung eventuell durch Vesikelfusion entstandene größere und multilamellare Vesikel zu entfernen, wurden diese Proben in einem

Ultraschall-Becherresonator für 5 - 10 Minuten bei 60 % Leistung beschallt. Dadurch wurde zwar die Größenverteilung der Vesikel verändert, da bei dieser Prozedur auch sehr kleine Vesikel mit Durchmessern unter 20 nm entstehen, allerdings wirken sich diese bei der Erzeugung von festkörperunterstützten Membranen durch Vesikelspreiten nicht negativ aus.

3.7 Behandlung der Substrate zur Erzeugung festkörperunterstützter Lipidmembranen

Glas: Die Glasträger wurden bei 70 °C für 15 Minuten in einer 2 %igen Hellmanex-Lösung und danach zweimal mit Reinstwasser in einem Ultraschallbad behandelt. Die so gereinigten und hydrophilisierten Glasträger konnten zwei Tage in Reinstwasser gelagert werden, bei längerer Lagerung ging die Hydrophilität verloren.

Silizium/Siliziumdioxid: Aus einer Scheibe aus Reinstsilizium mit 20 mm Durchmesser wurden mit einem Glasschneider Siliziumstücke mit der gewünschten Größe geschnitten. Diese wurden dann mit Isopropanol und Reinstwasser abgespült und in einer 1 %igen HF-Lösung für 15 Minuten eingelegt. Dadurch wurden Verunreinigungen und die native Oxidschicht an der Oberfläche entfernt und die gereinigte Siliziumoberfläche besaß einen hydrophoben Charakter. Zur Erzeugung einer 0.5 - 2 nm dicken Siliziumdioxidschicht wurden die Siliziumstücke in einer Mischung aus Reinstwasser, Wasserstoffperoxid (35 %, w/v) und Ammoniak (28 %, w/v) im Verhältnis $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_3$ (5:1:1, v/v) 20 Minuten bei 75 °C behandelt. Danach wurden sie mit viel Reinstwasser gespült und konnten so für zwei Tage in Reinstwasser gelagert werden.

Optislides (Nanofilm): Optislides der Firma Nanofilm sind spezielle Glasträger für die Ellipsometrie. Auf BK7-Objektträger wurden eine ca. 82 nm dicke Schicht Ta_2O_5 mit einem hohen Brechungsindex (2.348) und ein ca. 10 nm dicke Schicht aus SiO_2 aufgedampft. Sie werden aufgrund der stärkeren Reflexion für die Ellipsometrie nutzbar und liefern eine vergleichbare Oberfläche wie normale Glasträger. Zur Reinigung der Oberfläche wurde ein Gemisch aus $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_3$ (5:1:1, v/v) verwendet und die Optislides darin bei 70 °C für 15 Minuten behandelt. Anschließend wurden sie mit viel Reinstwasser abgespült und direkt verwendet.

Quarzkristalle: Für die Quarzmikrowaage-Messungen wurden Quarzkristalle verwendet, auf die beidseitig Elektrodenflächen aus einer 5 nm dicken Schicht Chrom als Haftvermittler und einer 100 nm dicken Goldschicht aufgedampft wurden. Da die Kontaktierung in der Messzelle an der Unterseite erfolgte, wurde die Elektrodenfläche auf der Oberseite mit etwas Silberleitlack mit der Kontaktierungsfläche verbunden. Anschließend wurden die Quarze 30 Sekunden in einem Argon-Plasma behandelt und danach direkt in die Messzelle eingebaut. Zur Reinigung der benutzten Goldoberflächen wurden die Quarze 45 Sekunden in Piranha-Lösung ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$, 7:3, v/v) gehalten und anschließend mit viel Reinstwasser gespült.

3.8 Darstellung von unstrukturierten Lipidmembranen

3.8.1 Präparation auf Quarzresonatoren

Für die Quarzmikrowaage-Messungen wurden Hybridmembranen aus einer Oktanthiol-Monolage und einer POPC/POPS-Monolage verwendet. Die Goldoberfläche wurde für 60 Minuten in einer 2 μM ethanolischen Oktanthiol-Lösung inkubiert und anschließend mehrmals mit Ethanol und Puffer gespült. Dann wurde die Vesikellösung ($c = 0.3 - 0.5 \text{ mg/mL}$ in 20 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 , pH 7.4) zugegeben und für mindestens 60 Minuten inkubiert. Durch die hydrophobe Wechselwirkung der Alkylketten des Oktanthiols mit den Acylketten der Lipide reißen die Vesikel auf und es bildet sich die gewünschte Hybridmembran. Anschließend wurde noch mehrmals mit reinem Puffer gespült, um Restvesikel aus der Lösung zu entfernen. Vor der Proteinzugabe wurde noch einmal mit Puffer mit der gewünschten CaCl_2 -Konzentration (ohne EGTA) gespült. Die Qualität der Oktanthiol-Schicht und der Hybridmembran wurde mit Hilfe der Impedanzspektroskopie überprüft. Die Kapazität einer Oktanthiolschicht sollte dabei zwischen 1.8 und 2.2 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ liegen, die einer Hybridmembran zwischen 0.9 und 1.3 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

3.8.2 Präparation auf Siliziumträgern für die Rasterkraftmikroskopie

Es wurden $1 \times 2 \text{ cm}^2$ große Siliziumträger verwendet. Diese wurden wie beschrieben hydrophilisiert. Zur Herstellung der Lipidmembranen wurden die hydrophilisierten Siliziumträger 60 Minuten mit einer 0.5 mg/mL Vesikelsuspension inkubiert. Die Vesikel wurden in 20 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 , pH 7.4 präpariert. Nach der Inkubation wurde mit calciumfreiem Puffer (1 mM EGTA statt 1 mM CaCl_2) und anschließend mit dem entsprechenden Puffer für die Proteinadsorption (0.05 mM, bzw. 1 mM CaCl_2) gespült. Gegebenenfalls wurde die Membran durch SFM-Aufnahmen überprüft und auf Defektstellen untersucht. Ein vollständiger Bilayer konnte durch Kratzen der Oberfläche mit einer hohen Aufdruckkraft im *contact*-Modus und anschließendem Abbilden des erzeugten Defekts verifiziert werden.

3.8.3 Präparation auf Siliziumträgern für die Ellipsometrie

Für die Ellipsometrie-Messungen wurden Siliziumträger in Größe eines Standardobjektträgers ($26 \times 76 \text{ mm}^2$) verwendet und wie in Kapitel 3.7 behandelt. Unstrukturierte Lipidmembranen wurden erzeugt, indem die Siliziumträger in die Flüssigkeitsmesszelle des Ellipsometers eingebaut und diese luftblasenfrei mit Puffer befüllt wurde. Anschließend wurde die Vesikelsuspension ($c = 0.5 \text{ mg/mL}$ in 20 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 , pH 7.4) zugegeben und die Ausbildung der Lipidmembran anhand der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi beobachtet. Nach der Bildung eines vollständigen Bilayers wurde mit Puffer mit der entsprechenden CaCl_2 -Konzentration (0.25 mM, bzw. 1.0 mM) gespült.

3.9 Darstellung von strukturierten Lipidmembranen

Zur Herstellung von individuell adressierbaren festkörperunterstützten mikrostrukturierten Lipidbilayern wurde die Technik des *micromolding in capillaries* (MIMIC) verwendet. Dazu wird aus einer Form aus Polydimethylsiloxan (PDMS) und einem Substrat (Glas oder

Siliziumdioxid) ein mikrofluides Netzwerk erzeugt, in dessen Kapillaren die Vesikelsuspensionen zugegeben werden können. Durch Adhärenz der Vesikel auf dem Substrat entsteht dann durch das Aufreißen und Fusionieren der Vesikel eine Lipidmembran (Abbildung 3.4). Beim Entfernen der PDMS-Form muss gewährleistet sein, dass die Substratoberfläche komplett mit Flüssigkeit bedeckt ist, da die Membranen an der Luft zerstört werden.

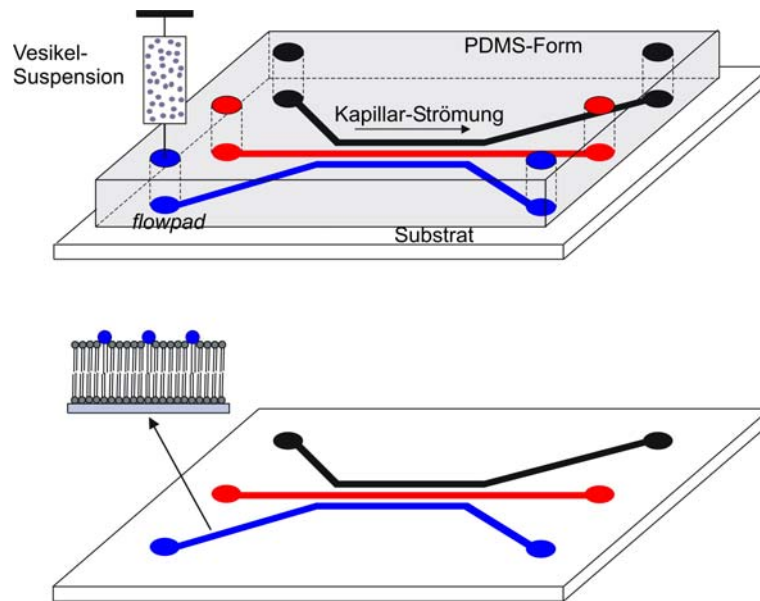


Abbildung 3.4: Präparation individuell adressierbarer mikrostrukturierter Lipidmembranen auf einem Substrat durch *micromolding in capillaries* (MIMIC).

3.9.1 Herstellung des mikrofluiden Netzwerks

Als Elastomer in der Softlithographie wird Polydimethylsiloxan (Sylgard 184, Dow Corning) verwendet. Es besteht aus zwei Komponenten, einem flüssigen PDMS-Präpolymer und einem Härter, der aus einem Platin-Komplex und Copolymeren aus Methylhydrosiloxan und Dimethylsiloxan zusammengesetzt ist. Das Aushärten wird durch eine Platin-katalysierte Vernetzung durch Hydrosilylierung hervorgerufen.⁸ Der Reaktionsweg ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Die mechanischen Eigenschaften des resultierenden PDMS können durch das Verhältnis des Präpolymers zu Härter eingestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verhältnis von 10:1 (w/w) verwendet.

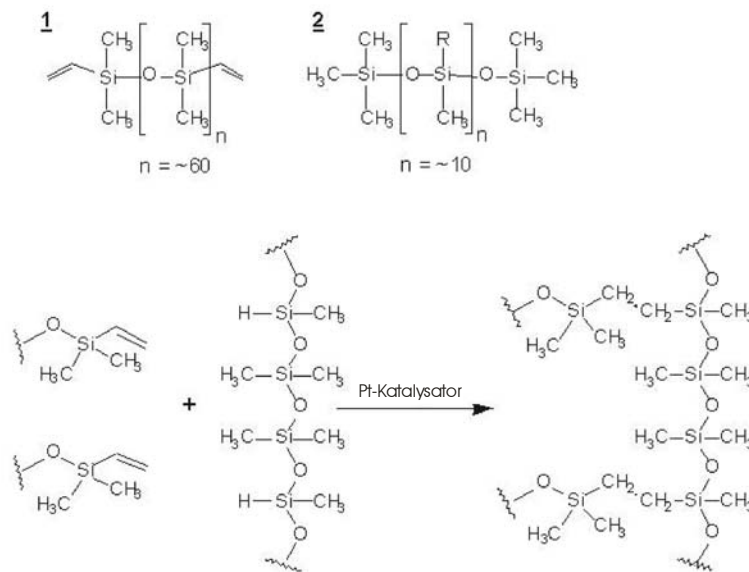


Abbildung 3.5: Reaktion des flüssigen Präpolymers (1) und des Härterers (2) zu festem Polydimethylsiloxan (PDMS).

Präpolymer und Härter wurden gut vermischt und in einem schwachen Wasserstrahlvakuum für etwa 15 Minuten entgast, bis keine Luftblasen mehr erkennbar waren. Danach wurde die noch flüssige Mischung in einen Metallrahmen gegossen, der auf der abzubildenden Struktur positioniert war. Anschließend wurde das PDMS bei 65 °C für vier Stunden ausgehärtet und die strukturierten Formen vorsichtig vom Substrat gelöst (Abbildung 3.6).

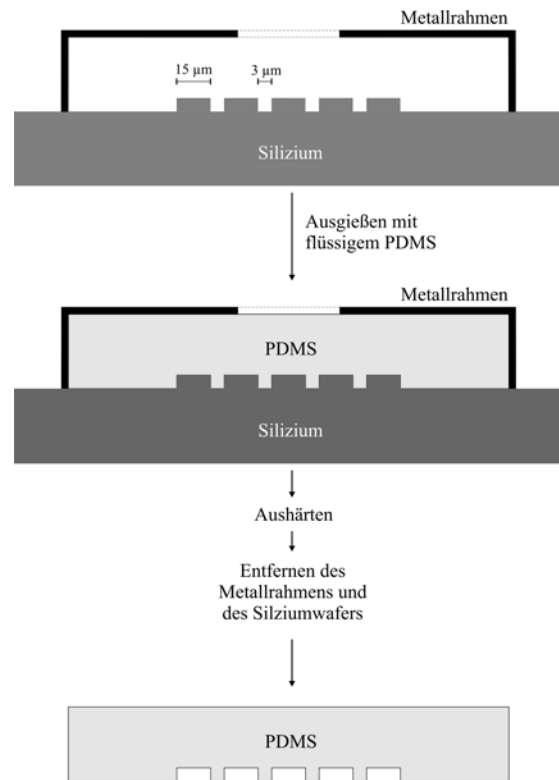


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der softlithographischen Methode zur Herstellung der PDMS-Form für das mikrofluide Netzwerk.

3.9.2 Präparation auf Glaträgern für die Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden runde Glaträger mit einem Durchmesser von 24 mm und einer Dicke von 0.15 mm benutzt. Nach dem Reinigen und Hydrophilisieren der Oberfläche wurden sie im Stickstoffstrom trocken geblasen und anschließend mit etwas Nagellack in eine kleine Petrischale geklebt, deren Boden vorher ausgestanzt worden war. Die PDMS-Formen mit dem eingepägten mikrofluiden Netzwerk wurden zwei Minuten im Sauerstoffplasma behandelt und direkt auf den Glaträger gesetzt. Die Kapillaren wurden mit $0.3 - 0.4\ \mu\text{L}$ Vesikelsuspension ($c = 0.25\ \text{mg/mL}$ in $20\ \text{mM Tris/HCl}$, $0.1\ \text{M NaCl}$, $1\ \text{mM CaCl}_2$, $1\ \text{mM DTT}$, $1\ \text{mM NaN}_3$, $\text{pH } 7.4$) befüllt und die Probe für 2 - 4 Minuten stengelassen. Anschließend wurde die Petrischale mit Puffer gefüllt, die PDMS-Form vorsichtig entfernt und die Oberfläche kräftig mit Puffer gespült.

3.9.3 Präparaton auf Siliziumträgern und Optislides für die bildgebende Ellipsometrie

Zur Erzeugung von mikrostrukturierten Lipidmembranen wurden die PDMS-Formen mit dem eingepägten mikrofluiden Netzwerk zwei Minuten im Sauerstoffplasma gereinigt und direkt auf die trockene, hydrophilisierte Substratoberfläche gesetzt. Die Kapillaren wurden mit Vesikelsuspension ($c = 0.25 \text{ mg/mL}$ in 20 mM Tris/HCl , 0.1 M NaCl , $\text{pH } 7.4$, bei späterer Proteinadsorption noch zusätzlich 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT und 1 mM NaN_3) befüllt und die Probe 5 – 10 Minuten stengelassen. Anschließend wurde die Substratoberfläche mit Puffer benetzt und die PDMS-Form entfernt. Es wurde ausreichend Puffer verwendet, dass ein Flüssigkeitsfilm stets die gesamte Probenoberfläche bedeckte. Um überschüssige Vesikel und sonstige Verunreinigungen zu entfernen wurde die Probe noch mehrmals mit Puffer gespült. Die Präparation von strukturierten DMPC und DMPC/Cholesterin – Membranen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei der Präparation von strukturierten Lipidmembranen aus den höherschmelzenden Lipiden diC_{15}PC und DPPC auf Si/SiO_2 wurden die oxidierten Siliziumträger zuerst auf $65 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach dem Aufsetzen der PDMS-Form wurde die Vesikelsuspension zugegeben und die gesamte Probe für 2 Minuten bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Danach wurde direkt mit warmem Puffer gespült um eine zu große Anhaftung der PDMS-Form zu verhindern. Die Probe wurde in die Flüssigkeitsmesszelle eingebaut und diese luftblasenfrei mit Puffer befüllt.

3.10 Adsorption von Annexin A1 und A2t

3.10.1 Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Erzeugung der strukturierten Lipidmembran wurde das Flüssigkeitsvolumen in der Petrischale auf etwa 2 mL reduziert. Anschließend erfolgte die Proteinzugabe, wobei eine Proteinkonzentration von $0.2 - 0.4 \text{ } \mu\text{M}$ erreicht wurde. Die Probe wurde 20 Minuten stehen gelassen und anschließend kräftig mit proteinfreiem Puffer gespült.

3.10.2 Quarzmikrowaage

Die Messzelle mit dem funktionalisierten Quarzkristall wurde in den Kreislauf eingebaut und luftblasenfrei befüllt. Anschließend wurde Puffer mit 0.35 ml/min durch die Messzelle gepumpt. Annexin A1 wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und die Proteinzugabe erfolgte durch Umschalten eines Ventils während der Messung. Nach einer gewünschten Inkubationszeit t_{Ink} wurde die Messzelle mit proteinfreiem Puffer gespült.

3.10.3 Rasterkraftmikroskopie

Die Flüssigkeit aus der Messzelle wurde weitestgehend abgenommen um das Probevolumen zu verringern. Dabei war zu beachten, dass die Substratoberfläche durchgehend von Flüssigkeit bedeckt war. Das Flüssigkeitsvolumen betrug danach etwa 1 – 1.5 mL. Anschließend erfolgte die Proteinzugabe und die Probe wurde mit der Pipette mehrmals durchmischt. Die resultierende Proteinkonzentration betrug 0.4 – 0.8 μM , die Reduzierung des Calciumgehalts durch EGTA aus den Proteinlösungen wurde durch Zugabe von CaCl_2 ausgeglichen. Die Proben wurden dann mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit viel proteinfreiem Puffer gespült.

3.10.4 Ellipsometrie

Nach Erzeugung der Lipidbilayer wurde das Protein im Kreislauf durch die Messzelle gepumpt. Die Proteinkonzentration betrug 0.4 - 0.6 μM . Die Proteinanbindung wurde direkt über die Veränderung der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi beobachtet. Sobald keine weitere Anbindung mehr stattfand, wurde gegebenenfalls mit proteinfreiem Puffer gespült, um eine Desorption des Proteins zu beobachten.

4 Adsorptionsverhalten von Annexin A1 und A2t

Das Adsorptionsverhalten von Annexin A1 und Annexin A2t wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der bildgebenden Ellipsometrie sowohl auf unstrukturierten als auch strukturierten POPC/POPS-Bilayern untersucht. Die laterale Organisation der adsorbierten Proteine auf der Oberfläche wurde durch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen aufgeklärt, da die Rasterkraftmikroskopie das größte laterale Auflösungsvermögen besitzt. Aus den gewonnenen Erkenntnissen wurde anschließend ein Modell der Proteinbindung auf einer heterogenen Oberfläche entwickelt und dieses in einem Simulationsprogramm implementiert. Durch das Anpassen der Simulationen an Proteinbindungskurven aus Quarzmikrowaage-Messungen konnten dann die kinetischen Parameter der teilweise reversiblen Adsorption ermittelt werden.

4.1 Einfluss der Vesikelladung auf den Spreitprozess

Die Darstellung unstrukturierter Lipidmembranen für die Untersuchung der Proteinbindung mittels der bildgebenden Ellipsometrie erfolgte durch die Vesikelspreittechnik auf einer Si/SiO₂-Oberfläche. Dabei sollte ein möglichst defektfreier Lipidbilayer auf der gesamten Probenoberfläche erreicht werden. Die Bildung der Lipidmembran wurde anhand der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi nach der Zugabe der Vesikelsuspension beobachtet. In Abbildung 4.1 sind exemplarisch die zeitlichen Verläufe von Delta und Psi nach der Zugabe von Vesikeln aus POPC/POPS (4:1) und (95:5) dargestellt. Delta sinkt um 3.3°, bzw. um 3.6°, was einer Bilayerschichtdicke von 3.6 - 3.8 nm entspricht. Die Adhäsion der Vesikel erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Vesikeln und der Oberfläche. POPS besitzt eine negativ geladene Kopfgruppe, so dass die Anbindung der Vesikel an das

negativ geladene Substrat nur in Anwesenheit von verbrückenden Kationen, wie Ca^{2+} stattfindet. Bei einem POPS-Gehalt von 20 % bildet sich der Bilayer daher sehr schnell aus (innerhalb von ca. 8 Minuten) während es bei 5 % POPS 30 Minuten dauert. Zusätzlich steigt der Winkel Psi während der Vesikeladsorption stärker an und fällt anschließend wieder ab. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Vesikel nach der Adhäsion längere Zeit in intaktem Zustand auf der Oberfläche befinden, bevor sie Aufreißen und einen Bilayer bilden. Dieses Verhalten wurde auch von Reimhult *et al.* mit Hilfe der QCM-D beobachtet.⁴

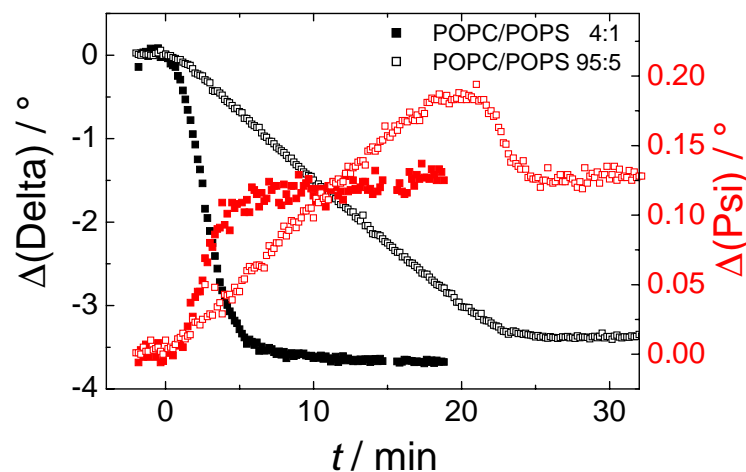


Abbildung 4.1: Zeitliche Verläufe der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi nach der Zugabe einer unilamellaren Vesikelsuspension (0.5 mg/mL) aus POPC/POPS mit unterschiedlichen POPS-Gehalten zu einer Si/SiO₂-Oberfläche.

4.2 Adsorption von Annexin A1

4.2.1 Visualisierung durch Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens von Annexin A1 an POPC/POPS-Lipidmembranen mit Hilfe der Quarzmikrowaage lieferte die Erkenntnis, dass in Gegenwart von Calcium die Bindung nur an Oberflächen erfolgte, die das Lipid POPS mit negativ geladener Kopfgruppe enthielten. Um dieses Verhalten zu überprüfen und zu visualisieren wurden mikrostrukturierte festkörperunterstützte Lipidmembranen mit unterschiedlicher Zusammensetzung auf einer Glasoberfläche präpariert. Dazu wurden Vesikel aus reinem POPC sowie aus einer Mischung von POPC/POPS (4:1) hergestellt, die zusätzlich mit

0.5 mol% Bodipy als Fluoreszenzfarbstoff versetzt wurden. Um die Proteinanbindung an die Lipidmembran sichtbar zu machen, wurde Annexin A1 am N-Terminus mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red markiert. Nach Erzeugung der strukturierten Membranen wurde mit 0.2 μM Annexin A1 für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde die Probe mit Puffer gespült und unter dem Fluoreszenzmikroskop abgebildet. Abbildung 4.2 A zeigt das Fluoreszenzbild bei Anregung des Bodipy-Farbstoffs mit 488 nm. Die zwei unteren Lipidstreifen bestehen aus POPC, die oberen beiden Lipidstreifen aus POPC/POPS (4:1). Abbildung 4.2 B zeigt den gleichen Bildausschnitt bei Anregung des Texas Red-Farbstoffs bei 543 nm. Die Bindung erfolgt ausschließlich auf der Lipidmembran mit 20 % POPS, während auf den Bereichen aus reinem POPC keine Proteinanbindung zu erkennen ist. Zwischen Bodipy und Texas Red tritt ein Energietransfer auf, so dass die Emission des Bodipy-Farbstoffs im grünen Wellenlängenbereich abgeschwächt wird. Daher zeigen die Bereiche in Abbildung 4.2 A, in denen Proteinbindung auftritt, auch Emission im roten Wellenlängenbereich. Die Glasoberfläche weist ebenfalls eine geringe Fluoreszenzintensität bei Anregung bei 543 nm auf. Dies lässt auf eine unspezifische Bindung von Annexin A1-Molekülen schließen.

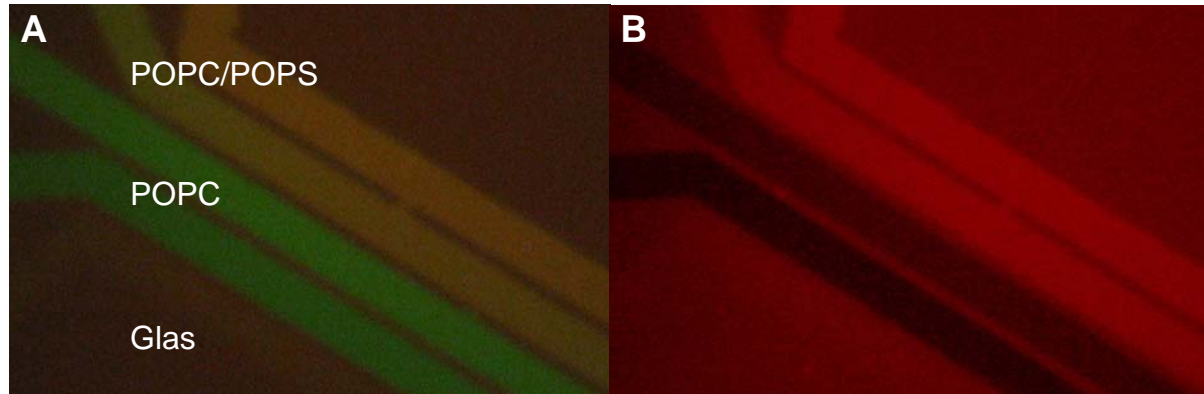


Abbildung 4.2: Fluoreszenzaufnahmen von mikrostrukturierten Lipidmembranen aus POPC und POPC/POPS (4:1) auf Glas nach Zugabe von 0.2 μM Texas Red-Annexin A1. Die Lipidmembranen waren mit 0.5 mol% Bodipy gelabelt. A) Anregung des Bodipy-Farbstoffs bei 488 nm zur Visualisierung der Lipidmembranen. B) Anregung des Texas Red-Farbstoffs bei 543 nm zur Visualisierung des gebundenen Annexin A1.

4.2.2 Ellipsometrie-Messungen

Die Bindung von Annexin A1 an festkörperunterstützte Lipidmembranen wurde mit Hilfe der Ellipsometrie in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration untersucht. Dazu wurden

POPC/POPS (4:1)-Vesikel hergestellt und in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} auf einer oxidierten Siliziumoberfläche gespreitet. Anschließend wurde mit Puffer (0.25 mM oder 1.0 mM Ca^{2+}) gespült und dann 0.4 μM Annexin A1 zugegeben. Eine Erniedrigung des Delta-Wertes zeigt die Proteinanbindung an und ermöglicht die Berechnung der mittleren Schichtdicke des Proteinlayers. Nach Erreichen eines Gleichgewichts wurde mit proteinfreiem Puffer gespült um reversibel gebundenes Annexin A1 zu entfernen. Abbildung 4.3 zeigt die Verläufe der mittleren Schichtdicke gegen die Zeit bei 0.25 mM und 1.0 mM Ca^{2+} . Etwa fünf Minuten nach der Zugabe wird das Maximum der Schichtdicke erreicht (2.2 nm bei 0.25 mM Ca^{2+} und 2.5 nm bei 1.0 mM Ca^{2+}) und der Wert bleibt bis zum Zeitpunkt des Spülens konstant. Nach dem Spülen mit proteinfreiem Puffer verändert sich die mittlere Schichtdicke nur bei 1.0 mM Ca^{2+} von 2.5 nm auf 2.1 nm bei 0.25 mM Ca^{2+} ist keine Veränderung zu beobachten. Es befand sich nur bei 1.0 mM Ca^{2+} ein geringer Teil reversibel gebundenes Annexin A1 auf der Oberfläche.

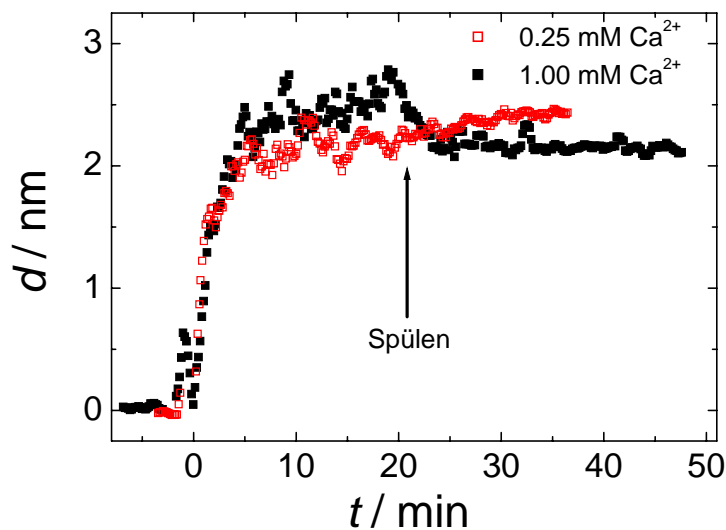


Abbildung 4.3: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke nach Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen auf Si/SiO_2 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Nach 20 Minuten wurde mit proteinfreiem Puffer gespült.

4.2.3 Quarzmikrowaage-Messungen

An der Universität Regensburg wurden von Katja Kastl zahlreiche QCM-Messungen zum Bindungsverhalten von Annexin A1 an POPC/POPS (4:1)-Membranen durchgeführt. Dabei wurden unter anderem die Abhängigkeiten von der Calciumkonzentration und von der

Inkubationszeit untersucht.⁷⁰ In Abbildung 4.4 sind exemplarisch die nach Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 erhaltenen Resonanzfrequenzänderungen mit der Zeit bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen dargestellt. Zehn Minuten nach der Zugabe wurde mit proteinfreiem Puffer gespült. Durch die Proteinadsorption erhält man eine Erniedrigung der Resonanzfrequenz, während nach dem Spülen ein Teil des gebundenen Materials desorbiert. Sowohl der maximale Frequenzshift vor dem Spülen als auch die Verschiebung, die nach dem Spülen im Gegensatz zur Resonanzfrequenz vor der Annexinzugabe erreicht wird, steigen mit zunehmendem Calciumgehalt. Der Frequenzanstieg nach dem Spülen ist für hohe Calciumkonzentrationen ebenfalls größer als bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen, die Abhängigkeit ist allerdings deutlich geringer als bei der maximalen Frequenzänderung.

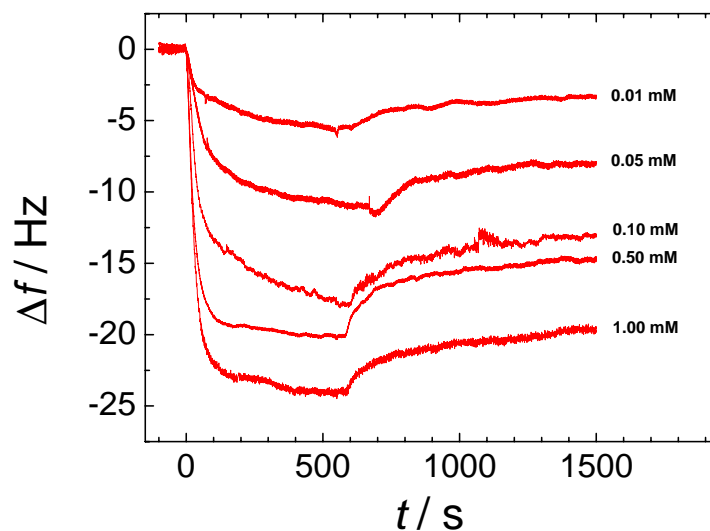


Abbildung 4.4: Zeitliche Resonanzfrequenzverläufe eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu einer POPC/POPS (4:1)-Membran bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Nach 10 Minuten (bei 0.05 mM Ca^{2+} nach 12 Minuten) wurde mit proteinfreiem Puffer gespült.

4.3 Adsorption von Annexin A2t

4.3.1 Visualisierung durch Fluoreszenzmikroskopie

Auch das Heterotetramer Annexin A2t zeigt in Gegenwart von Calciumionen irreversible Bindung an Membranen aus POPC und POPS.⁸⁹ Es erfolgt jedoch keine Bindung an reine

POPC-Bilayer.⁵¹ Zur Untersuchung und Visualisierung dieses Bindungsverhaltens wurden mikrostrukturierte Lipidbilayer aus reinem POPC und einem POPC/POPS (4:1) - Gemisch nebeneinander auf einem Glaträger präpariert. Die Lipidfilme wurden mit 0.5 mol% Bodipy versetzt um eine Abbildung mit dem Fluoreszenzmikroskop möglich zu machen. Die Probe wurde mit 0.2 μM Annexin A2t versetzt, dass am N-Terminus mit einem Texas Red-Farbstoff versehen war, und 30 Minuten inkubiert. Danach wurde mit proteinfreiem Puffer gespült. Abbildung 4.5 A zeigt eine Fluoreszenzaufnahme mit einer Anregungswellenlänge bei 488 nm. Es sind vier Lipidstreifen, die abwechselnd aus POPC mit POPS und ohne POPS bestehen, zu erkennen. Abbildung 4.5 B zeigt die Emission des Texas Red-Farbstoffs bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm und damit die Belegung der Oberfläche mit Annexin A2t. Es ist deutlich zu sehen, dass auf reinem POPC kein Annexin A2t angebunden ist. In den Bereichen, in denen POPS-Moleküle vorhanden sind, hat irreversible Bindung von Annexin A2t stattgefunden, allerdings ist die Intensität nur wenig höher, als auf dem Glaträger. Ein Großteil der Annexin-Moleküle hat unspezifisch an die Glasoberfläche gebunden.

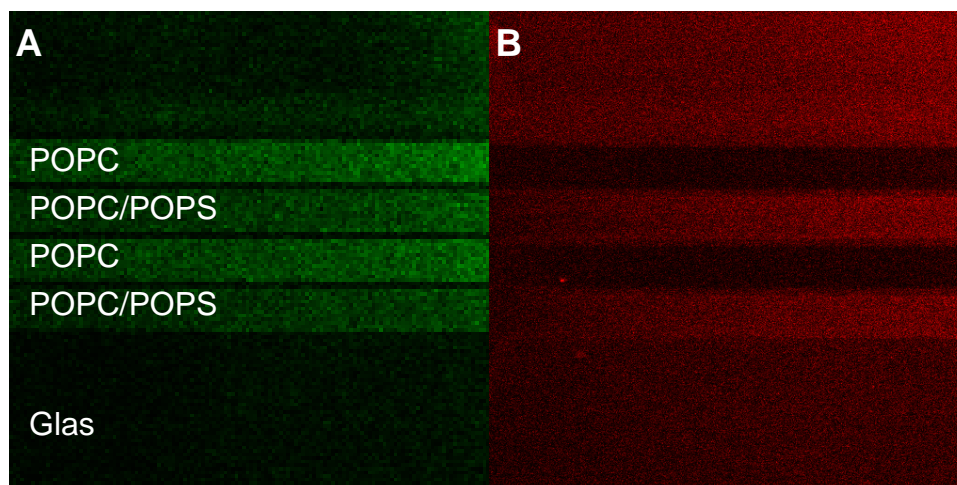


Abbildung 4.5: Fluoreszenzaufnahmen von mikrostrukturierten Lipidmembranen aus POPC und POPC/POPS (4:1) auf Glas nach Zugabe von 0.2 μM Texas Red-Annexin A2t. Die Lipidmembranen waren mit 0.5 mol% Bodipy gelabelt. A) Anregung des Bodipy-Farbstoffs bei 488 nm zur Visualisierung der Lipidmembranen. B) Anregung des Texas Red-Farbstoffs bei 543 nm zur Visualisierung des gebundenen Annexin A2t.

4.3.2 Ellipsometrie-Messungen

Um genauere Erkenntnisse zum Bindungsverhalten von Annexin A2t auf POPC/POPS-Membranen zu gewinnen, wurde die Bindung sowohl auf strukturierte als auch auf

unstrukturierte Lipidbilayer untersucht. Für die Experimente wurde eine Proteinkonzentration von $0.6 \mu\text{M}$ gewählt. Abbildung 4.6 zeigt die Verläufe der mittleren Schichtdicke mit der Zeit bei Zugabe von Annexin A2t zu einem strukturierten und einem unstrukturierten Bilayer aus POPC/POPS (4:1). Das Protein bindet kurz nach der Zugabe an und nach etwa zwei Minuten ist eine Gleichgewichtsbelegung erreicht, die mittlere Dicke des Proteinlayers beträgt 3.0 nm . Die Kinetik der Anbindung wird durch die Art der Lipidpräparation nicht beeinflusst. Beide Anbindungskurven verlaufen identisch und erreichen eine mittlere Proteinschichtdicke von 3.0 nm .

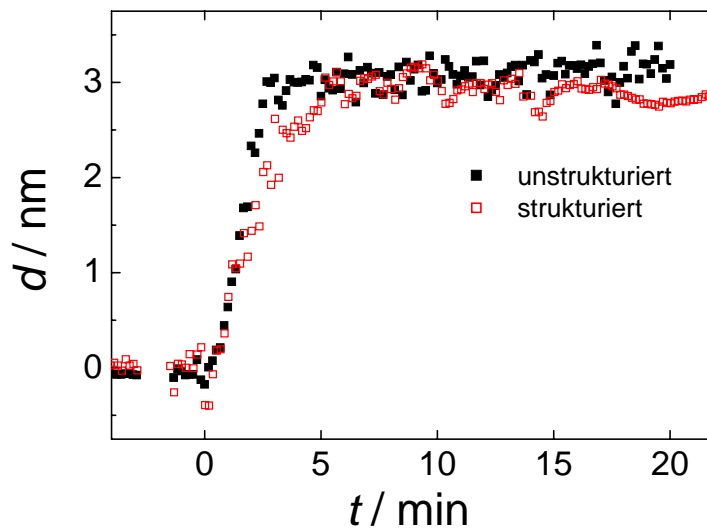


Abbildung 4.6: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke nach Zugabe von $0.6 \mu\text{M}$ Annexin A2t zu einer strukturierten und einer unstrukturierten POPC/POPS (4:1)-Membran auf Si/SiO_2 . Die Calciumkonzentration betrug in beiden Experimenten 1.0 mM .

4.3.2.1 Einfluss der Calciumkonzentration auf das Bindungsverhalten von Annexin A2t

Die Anbindung von Annexin A2t an strukturierte Lipidbilayer aus POPC/POPS (4:1) wurde mit Hilfe der bildgebenden Ellipsometrie bei verschiedenen Calciumkonzentrationen untersucht. Dazu wurde der Verlauf der Schichtdicke mit der Zeit nach Zugabe von $0.6 \mu\text{M}$ Annexin A2t aufgezeichnet. Nach Erreichen eines Gleichgewichts wurde mit proteinfreiem Puffer gespült, um den reversibel gebundenen Anteil an Protein zu ermitteln. Abbildung 4.7 zeigt die Verläufe der Schichtdicke bei 0.25 und 1.00 mM Ca^{2+} . Zwischen den beiden Kurven

ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Etwa fünf Minuten nach der Zugabe wird das Maximum der Schichtdicke von 3.0 nm erreicht und der Wert bleibt bis zum Zeitpunkt des Spülens konstant. Nach dem Spülen mit proteinfreiem Puffer reduziert sich die mittlere Schichtdicke innerhalb von 25 Minuten auf 2.5 nm durch das Entfernen von reversibel gebundenem Protein. Ungefähr 17 % des Annexin A2t waren reversibel gebunden, während 83 % irreversibel gebunden waren.

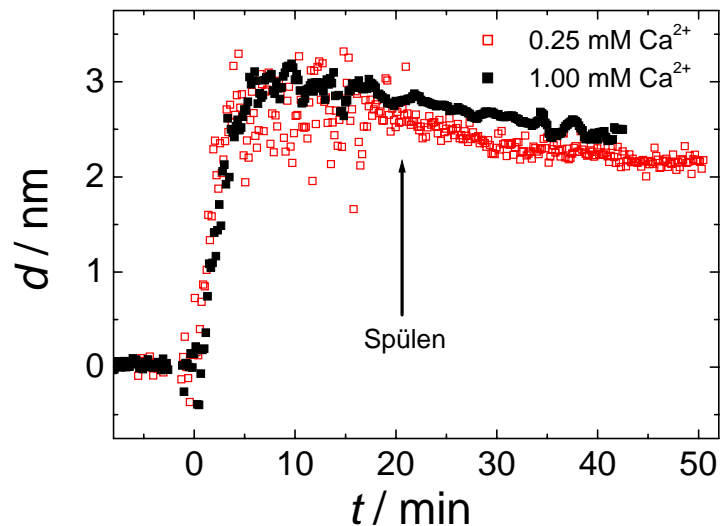


Abbildung 4.7: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke nach Zugabe von 0.6 μM Annexin A2t zu einer strukturierten POPC/POPS (4:1)-Membran auf Si/SiO₂ und nach dem Spülen mit proteinfreiem Puffer bei verschiedenen Calciumkonzentrationen.

4.3.2.2 Untersuchung der unspezifischen Proteinbindung auf dem Substrat

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Proteinadsorption auf strukturierteren Lipidbilayern legte die Vermutung nahe, dass ein nicht unerheblicher Teil den Annexin A2t unspezifisch auf der Glasoberfläche adsorbiert. Eine quantitative Untersuchung dieser unspezifischen Bindung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit dem bildgebenden Ellipsometer. Hier besteht die Möglichkeit, die Kinetik der Proteinadsorption gleichzeitig auf der Lipidmembran als auch auf dem Substrat, in diesem Falle SiO₂, zu verfolgen (s. Abbildung 2.11).

Der Vergleich der zeitlichen Verläufe der Schichtdicke auf dem Substrat und einer POPC/POPS (4:1) - Membran nach Zugabe von 0.6 μM Annexin A2t in Gegenwart von 1.0 mM Ca²⁺ ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Die Kinetiken der Adsorption sind nahezu

identisch. Etwa 5 Minuten nach der Proteinzugabe wird das Maximum der Schichtdicke erreicht, dass auf der Membran bei 3.0 nm liegt. Auf dem Substrat beträgt die mittlere Schichtdicke sogar 3.8 nm. Die Proteinbelegung auf dem Substrat ist sogar höher als auf der Membran. Nach dem Spülen mit proteinfreiem Puffer verringert sich sowohl auf dem Substrat als auch auf dem Bilayer die Schichtdicke um 0.5 nm. Die unspezifische Bindung besitzt ebenfalls einen teilweise reversiblen Charakter.

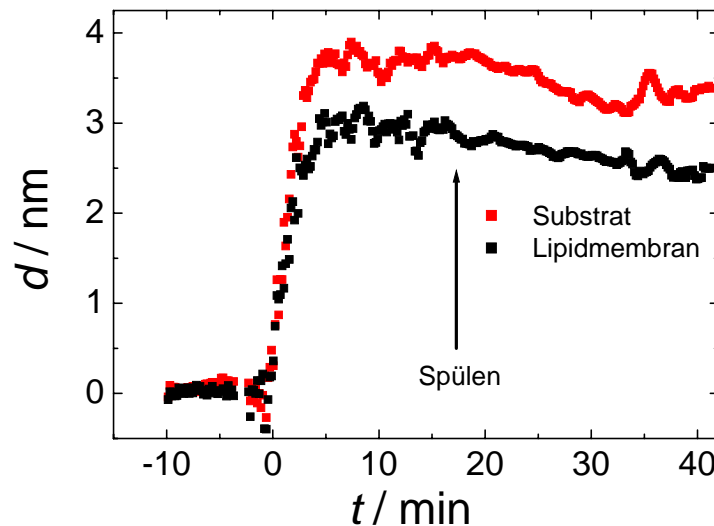


Abbildung 4.8: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke auf dem Substrat und der Membran nach Zugabe von 0.6 μM Annexin A2t zu einem strukturierten POPC/POPS (4:1)-Bilayer auf Si/SiO₂ und nach dem Spülen mit proteinfreiem Puffer in Gegenwart von 1.0 mM Ca²⁺.

Die unspezifische Bindung von Proteinen auf Substratoberflächen wird im Allgemeinen durch eine vorherige Adsorption von BSA (*bovine serum albumin*) unterbunden. Dieses Protein bindet unspezifisch mit hydrophilen Substraten, zeigt jedoch keine Wechselwirkung mit Lipidmembranen oder anderen Proteinen. Normalerweise wird diese Blockierung als vollständig angesehen. Mit Hilfe der bildgebende Ellipsometrie an mikrostrukturierten Bilayern lässt sich der Einfluss von BSA auf die unspezifische Bindung von Annexin A2t untersuchen. Dazu wurden mikrostrukturierte Lipidstreifen auf Si/SiO₂ präpariert und der zeitliche Verlauf der Schichtdicke nach Zugabe von 0.5 % BSA (w/w) aufgenommen (Abbildung 4.9). Das BSA bindet innerhalb von 35 Minuten ausschließlich an die SiO₂-Oberfläche und zeigt keine Wechselwirkung mit der Lipidmembran. Auf der SiO₂-Oberfläche erreicht man eine mittlere Schichtdicke von 2.3 nm, die jedoch nach dem Spülen mit BSA-freiem Puffer auf 1.8 nm reduziert wird. Nach der Zugabe von Annexin A2t bei 53 Minuten ist Proteinadsorption in beiden Bereichen der Probe zu erkennen. Auf beiden Oberflächen, der

Lipidmembran und dem Substrat mit adsorbiertem BSA bildet sich eine Annexin A2t-Schicht mit einer mittleren Dicke von 2.5 nm aus, was mit vorangegangenen Experimenten übereinstimmt. Nach dem Spülen der Probe mit proteinfreiem Puffer verringert sich die mittlere Schichtdicke auf beiden Oberflächen um 0.5 nm. Der reversible Charakter der Bindung sowohl auf der Membran als auch auf dem Substrat wird nicht durch die vorherige Adsorption von BSA beeinflusst.

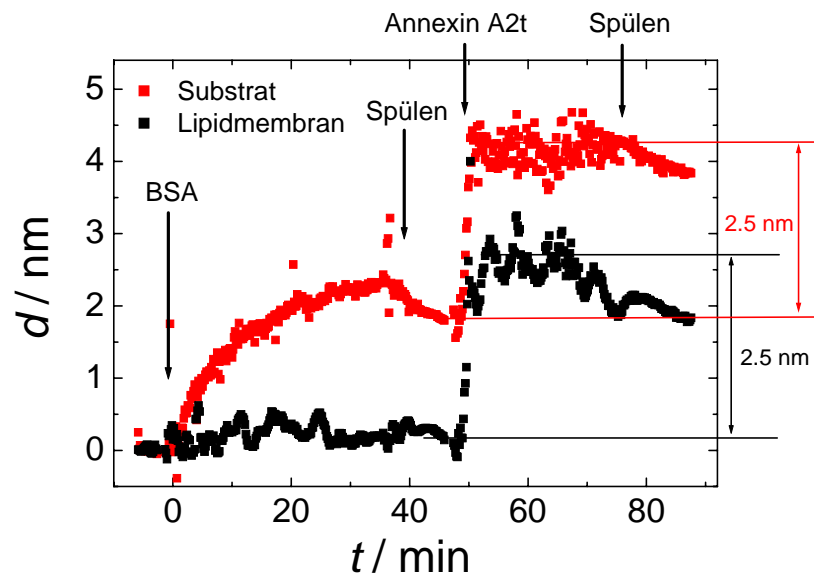


Abbildung 4.9: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke auf dem Substrat und der Lipidmembran nach Zugabe von zuerst 1 mg/mL BSA und anschließend 0.6 μ M Annexin A2t zu einem strukturierten POPC/POPS (4:1)-Bilayer. Bei 45 und 78 Minuten wurde mit proteinfreiem Puffer gespült. Die Calciumkonzentration betrug 1.0 mM.

4.4 Laterale Organisation von adsorbiertem Annexin A1 und A2t an POPC/POPS-Membranen

Zur Untersuchung des calciumvermittelten Bindungsverhaltens von Annexin A1 und A2t an POPC/POPS-Membranen und zur Visualisierung der Oberfläche wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen verwendet. Ein Vorteil dieser Methode ist das bessere laterale Auflösungsvermögen im Gegensatz zur bildgebenden Ellipsometrie oder der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie. Festkörperunterstützte Lipidmembranen aus POPC/POPS in verschiedenen Zusammensetzungen wurden mittels der Vesikelspreittechnik auf einem Siliziumsubstrat erzeugt, das vorher durch chemische Behandlung mit einem

dünnen Siliziumdioxid-Film überzogen wurde. Polierte Siliziumoberflächen weisen eine geringe Rauigkeit auf und sind für die Rasterkraftmikroskopie in Nanometerbereich geeignet. Siliziumdioxid besitzt hydrophile Eigenschaften und kann daher gut als Substrat für festkörperunterstützte Lipidbilayer verwendet werden. Häufig verwendete Glimmeroberflächen sind zwar deutlich glatter, haben jedoch einen großen Einfluss auf die Ladungsverteilung in Membranen mit geladenen Lipiden. Untersuchungen von Menke *et al.* und Janshoff *et al.* zeigten, dass gemischte PC/PS-Membranen in Gegenwart von Calcium eine Domänenstruktur ausbilden, in denen die negativ geladenen PS-Kopfgruppen durch Calciumionen an der Oberfläche verbrückt werden.^{89,90} Auf Glimmer ließen sich bei POPC/POPS-Gemischen Höhenunterschiede von 0.4 - 1.0 nm detektieren. Die Untersuchung der Bindung von Annexin A1 und A2t an POPC/POPS-Bilayer auf Glimmer zeigte jedoch nur eine geringe Belegung der Oberfläche, die nicht mit den erwarteten Werten aus korrespondierenden QCM-Messungen übereinstimmte.^{48,51} Dies ist darauf zurückzuführen, dass die geladenen Lipide aufgrund der Wechselwirkung mit der Glimmeroberfläche hauptsächlich im unteren Layer zu finden sind und damit nicht mehr als Bindungsplätze für Annexinmoleküle zur Verfügung stehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie die Bindung von Annexin A1 und A2t auf POPC/POPS-Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung und bei verschiedenen Calciumkonzentrationen untersucht.

Die Analyse der erhaltenen SFM-Bilder erfolgte mit der SPIP-Software. Zur Ermittlung der Proteinbelegung wurde eine so genannte *grain*-Analyse durchgeführt. Dazu wird der Lipidbilayer als Hintergrund definiert und die Stellen, die mit Protein belegt sind, werden als einzeln unterscheidbare Bereiche markiert. Dies ist exemplarisch in Abbildung 4.10 anhand zweier SFM-Aufnahmen dargestellt. In der Originalaufnahme (oben) werden die mit Protein belegten Bereiche identifiziert (Mitte) und der Belegungsgrad in einer Tabelle ausgegeben (unten). Zusätzlich zur Belegung erhält man Fläche, Volumen, mittlere Höhe, Länge, Breite und den Durchmesser jedes einzelnen Bereichs sowie die Mittelwerte über die gesamte Aufnahme.

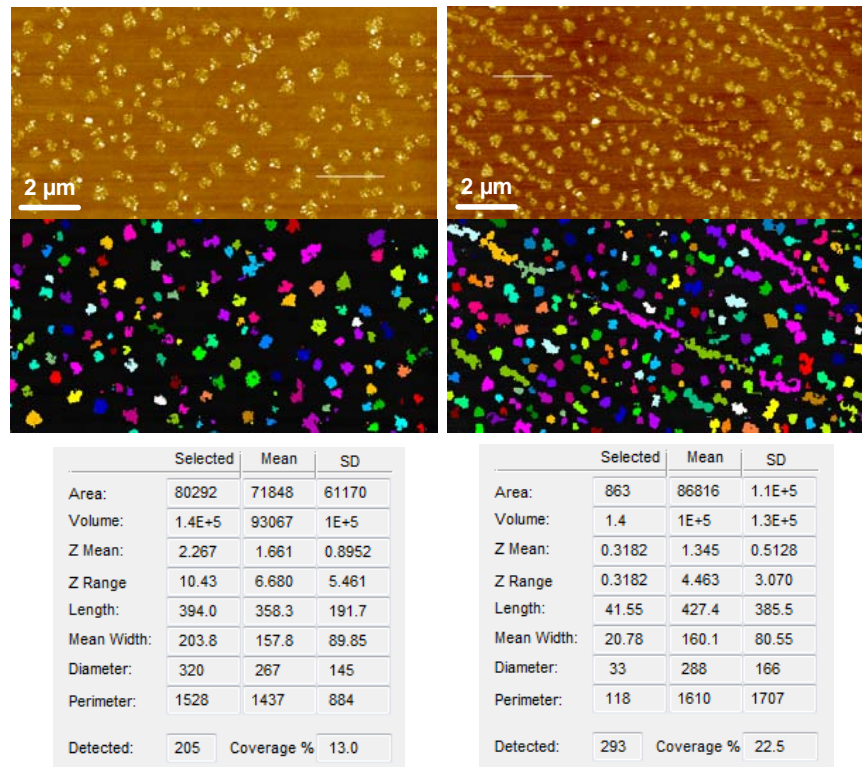


Abbildung 4.10: Mit Hilfe der SPIP-Software durchgeführte *grain*-Analysen von SFM-Aufnahmen von Annexin A1 auf POPC/POPS (95:5) auf Si/SiO₂ zur Ermittlung der mittleren Domänenradien und der Belegungsgrade. Aus den SFM-Aufnahmen (oben) werden die Domänen identifiziert (Mitte) und die Ergebnisse der Analyse in einer Tabelle ausgegeben (unten).

4.4.1 Annexin A1

Die Bindung von Annexin A1 wurde an festkörperunterstützten POPC/POPS-Membranen mit einem Anteil von 5 %, 10 % und 20 % POPS untersucht und es wurden Calciumkonzentrationen von 0.05 mM und 1.00 mM verwendet. Abbildung 4.11 A zeigt ein tapping-mode SFM-Bild von Annexin A1 gebunden an einen POPC/POPS (95:5) Bilayer in Anwesenheit von 1.0 mM Ca²⁺. Auf dem defektfreien Lipidbilayer sind deutlich voneinander separierte Bereiche mit einer Höhe von 2.5 bis 3.5 nm zu erkennen. Der Höhenunterschied weist darauf hin, dass eine Monolage von Annexin A1 vorhanden ist. Außerdem sind die Moleküle wie aus den Röntgenstrukturdaten zu erwarten mit der größten Fläche, an der sich die Calciumbindungsplätze befinden, in Richtung der Membranoberfläche orientiert. Die Höhe von 2.5 bis 3.5 nm stimmt daher sehr gut mit den erwarteten 3.3 nm aus der

Kristallstruktur überein. Der mittlere Domänenradius ließ sich durch eine *grain*-Analyse des gezeigten Bildes zu 145 nm bestimmen.

In Abbildung 4.11 und Abbildung 4.12 sind SFM-Bilder von Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung und bei verschiedenen Calciumkonzentrationen zusammengefasst. In allen Aufnahmen ist die Proteinbelegung mit einer Höhe von 2.5 bis 3.5 nm zu erkennen. Bei geringer Belegung (5 % POPS) zeigen sich einzelne, voneinander getrennte Domänen. Mit zunehmendem POPS-Gehalt steigt auch die Proteinbelegung. Dies geht mit einer Reduzierung der Domänengröße einher, wobei bei 20 % POPS die Oberfläche so dicht belegt ist, dass die einzelnen Domänen nicht mehr voneinander separiert werden können. Vergleicht man die Aufnahmen mit 5 % POPS bei 1.00 mM Ca^{2+} und 0.05 mM Ca^{2+} miteinander, so ist eine deutliche Verringerung der Belegung zu beobachten.

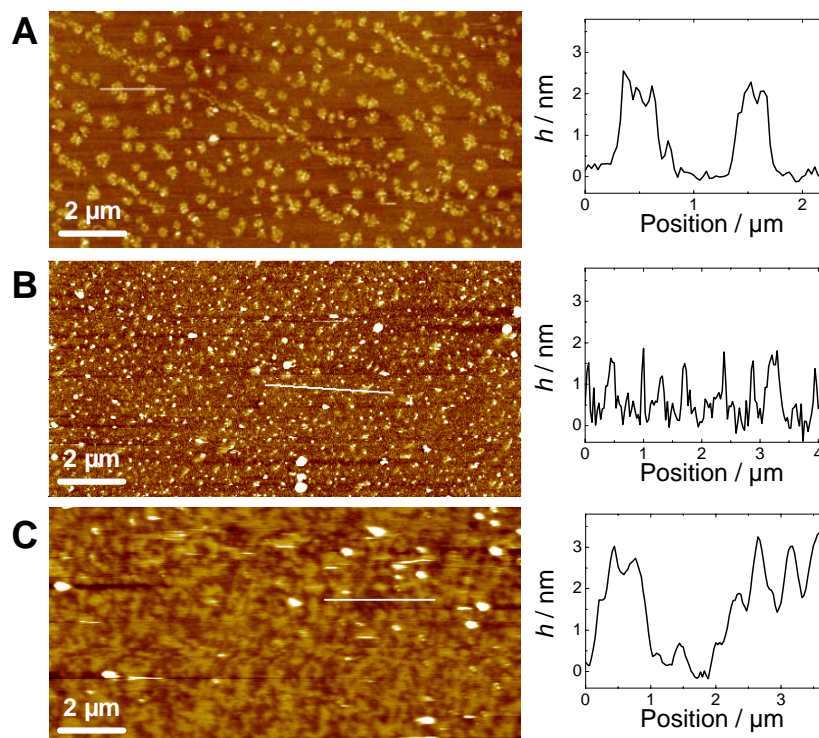


Abbildung 4.11: Tapping-Modus SFM-Aufnahmen von Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen. Der POPS-Anteil betrug A) 5 %, B) 10 %, C) 20 %. Die Calciumkonzentration betrug 1.0 mM.

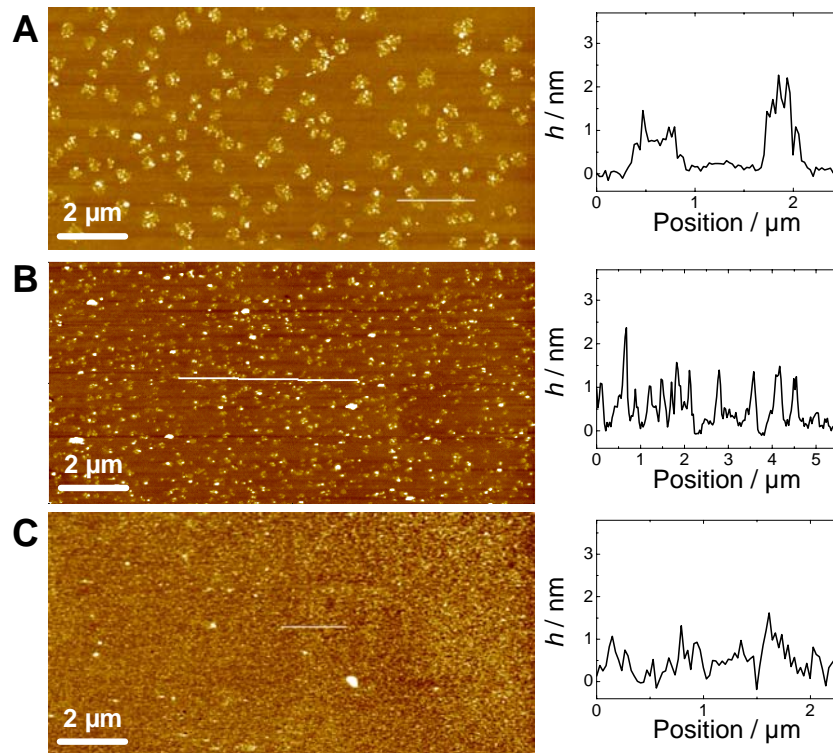


Abbildung 4.12: *Tapping-Modus* SFM-Aufnahmen von Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen. Der POPS-Anteil betrug A) 5 %, B) 10 %, C) 20 %. Die Calciumkonzentration betrug 0.05 mM.

Eine *grain*-Analyse ergab eine Reduzierung des Belegungsgrades von 20 % bei 1.0 mM Ca^{2+} auf 16 % bei 0.05 mM Ca^{2+} . Die mittlere Domänengröße bleibt jedoch annähernd gleich. Die Ergebnisse der *grain*-Analysen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Qualität der Bilder ließ jedoch nicht bei allen Aufnahmen eine Analyse zu.

Tabelle 4: Mittlere Domänenradien und mittlere Belegungsgrade mit Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen bei verschiedenen Zusammensetzungen und Calciumkonzentrationen

POPS / %	$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{mM}$	r / nm	Belegung
5	0.05	135 ± 70	0.13 ± 0.01
5	1.00	145 ± 80	0.22 ± 0.02
10	0.05	80 ± 45	
10	1.00		
20	0.05		0.12 ± 0.02
20	1.00		0.38 ± 0.05

4.4.2 Annexin A2t

Die Visualisierung von membrangebundenem Annexin A2t erfolgte auf POPC/POPS (95:5) Membranen bei 0.05 und 1.00 mM Ca^{2+} . In Abbildung 4.13 sind die entsprechenden rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Die Anbindung von Annexin A2t erzeugt auf der Oberfläche eine Struktur aus Proteindomänen mit einer Höhe von 5.0 nm. Dies weist darauf hin, dass beide Annexin A2 - Monomere an die Oberfläche binden und das p11 - Dimer nach oben orientiert ist. (Abbildung 1.7). Bei einer Calciumkonzentration von 1.00 mM besitzen die Domänen einen mittleren Radius von 155 nm und die Oberflächenbelegung beträgt 31 %. Eine Verringerung des Calciumgehalts resultiert in einer Reduzierung der Proteinbelegung auf 22 %. Gleichzeitig sinkt der mittlere Domänenradius auf 80 nm. Der erhöhte Belegungsgrad im Vergleich zu Annexin A1 lässt sich mit der größeren Proteingrundfläche erklären.

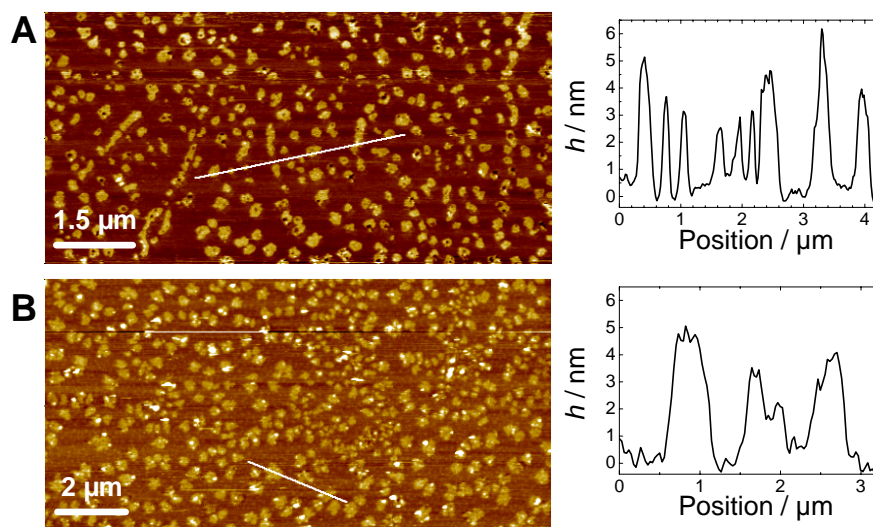


Abbildung 4.13: *Tapping*-Modus SFM-Aufnahmen von Annexin A2t auf POPC/POPS-Membranen mit einem POPS-Anteil von 5 %. Die Calciumkonzentration betrug A) 0.05 mM und B) 1.0 mM.

4.5 Ermittlung der kinetischen Adsorptionsparameter von Annexin A1 mit Hilfe von dynamischen Monte Carlo-Simulationen

4.5.1 Bestimmung der Transportrate

Für die korrekte Simulation des Adsorptionsverhaltens von Annexin A1 ist die Kenntnis des Massentransports zur Oberfläche bei der jeweiligen Methode von entscheidender Bedeutung. Die Flussgeschwindigkeit durch die Messzelle ist durch die Pumpgeschwindigkeit eingestellt und ist somit bekannt. Allerdings treten beim Transport zur Oberfläche hydrodynamische Effekte auf, die von der Geometrie der Messzelle bestimmt sind. Bei den QCM-Messungen wurde eine Messzelle mit zylindersymmetrischer Anordnung verwendet, die eine Staupunktströmung gewährleistet. Ein Schnitt durch die Messzelle ist in Abbildung 4.14 skizziert. Die Partikellösung strömt durch einen zentralen Zufluss mit Radius R in Richtung Oberfläche. Die Austrittsöffnung und die Probenoberfläche sind durch den Abstand h getrennt. Die Partikellösung fließt nach außen ab und über mehrere Auslässe zurück in den geschlossenen Kreislauf. Bei kleinen Reynoldszahlen, d. h. für kleine Flussgeschwindigkeiten erhält man in der Nähe der Oberfläche eine laminare Strömung.

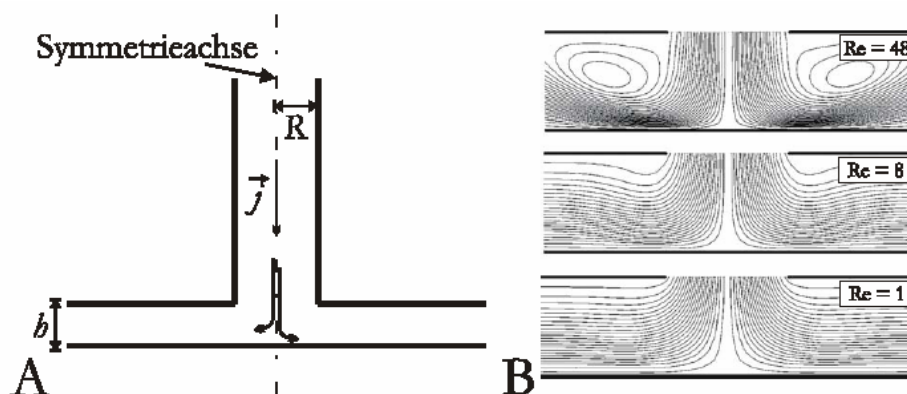


Abbildung 4.14: A) Geometrie der Staupunktströmung mit den für die Betrachtung relevanten Größen. Der Fluss der Lösung durch die Messzelle ist durch Pfeile, die den Partikelflussvektor \vec{j} repräsentieren, angedeutet. B) Stromlinien eines Fluids in Staupunktgeometrie für $h/R = 1.6$ für verschiedene Reynoldszahlen nach Adamczyk.⁹¹

Unter Vernachlässigung von spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Teilchen, sowie der Gravitation und hydrodynamischer Wandeffekte ergibt sich für die Ratenkonstante des Transports k_{tr} folgende Näherung:⁹¹

$$k_{tr} = 0.78 \left(\frac{\alpha_0 \nu D_\infty^2}{R^2} \right)^{1/3} \quad (4.1)$$

mit der mittleren Flussgeschwindigkeit ν und dem Radius des Zuflusses R . Der Diffusionskoeffizient D_∞ der Partikel in Lösung lässt sich mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung berechnen:

$$D_\infty = \frac{k_B T}{6\pi\eta \cdot r}. \quad (4.2)$$

Dabei sind k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, η die Viskosität des Lösungsmittels und r der Partikelradius. Der Faktor α_0 in Gleichung (4.1) ist abhängig von dem Verhältnis h/R und der Reynoldszahl $Re = R \cdot \nu / \nu$ mit der kinematischen Viskosität ν der Lösung. Für $h/R = 1.6$ und $Re < 10$ gilt näherungsweise die Beziehung:⁹¹

$$\alpha_0 = 1.78 + 0.186 Re + 0.034 Re^2 \quad (4.3)$$

Die bei den QCM-Messungen verwendete Messzelle weist ein Verhältnis von $h/R < 1.6$ auf. Dadurch wird α_0 zu etwas größeren Werten verschoben.⁹² Außerdem gilt Gleichung (4.1) nur für geringe Belegungen, so dass sie in dieser Arbeit nur zur Abschätzung einer maximalen Transportrate verwendet wird. Eine Betrachtung des Einflusses von k_{tr} auf die Adsorptionskinetik findet sich in Abschnitt 4.5.4.5.

4.5.2 Beschreibung des Modells

Die Kinetik einer reversiblen RSA in Abhängigkeit der Ratenkonstanten für Ad- und Desorption, k_{on} und k_{off} , wurde in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Für die dynamischen Monte Carlo-Simulationen der Bindung von Annexin A1 an gemischte Phospholipidbilayer aus POPC und POPS wurde jedoch keine homogene Oberfläche angenommen, sondern eine heterogene Oberfläche bestehend aus einer POPC-reichen Matrix und POPS-reichen Domänen. Wie mit Hilfe von QCM- und Fluoreszenzmessungen gezeigt werden konnte, ist

die Bindung von Annexin A1 an Membranen aus reinem POPC vollkommen reversibel, nur in der Gegenwart von POPS bleibt Protein irreversibel auf der Membran gebunden. Für die Simulationen wurde daher das in Abbildung 4.15 dargestellte Bindungsmodell angenommen. Die Bindung auf den POPS-reichen Domänen erfolgt irreversibel mit der Ratenkonstante für die irreversible Adsorption k_{irr} , die Bindung an die POPC-reiche Matrix erfolgt reversibel mit den Ratenkonstanten k_{on} und k_{off} .

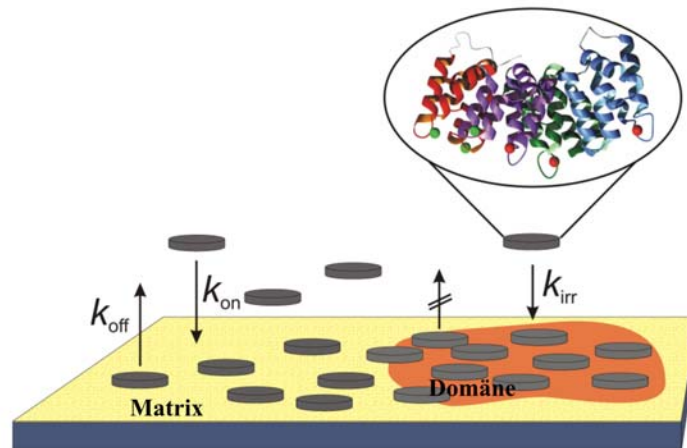


Abbildung 4.15: Bindungsmodell von Annexin A1 auf einer heterogenen Oberfläche. Nach dem Transport zur Oberfläche erfolgt reversible Bindung auf der POPC-reichen Matrix und irreversible Bindung auf den POPS-reichen Domänen.⁴⁸

Der Verlauf der Belegung mit der Zeit kann daher nicht mehr durch Gleichung (2.26) ausgedrückt werden. In den Monte Carlo-Simulationen wurden auf der Simulationsfläche keine festen Gitterplätze angenommen, d. h. es ist nicht möglich, reversible und irreversible Bindungsplätze strikt voneinander zu unterscheiden. Proteine, die am Rand einer Domäne adsorbieren, werden als irreversibel gebunden angesehen, reduzieren jedoch gleichzeitig die für eine reversible Bindung zur Verfügung stehende Fläche. In der Simulation müssen daher zwei voneinander abhängige ASF für die reversible und die irreversible Bindung definiert werden. Dies resultiert in zwei Ratengleichungen für die reversible Adsorption auf der Matrix:

$$\frac{d\Theta_1}{dt} = \frac{k_{\text{on}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} \cdot \Phi_1(\Theta_1) - k_{\text{off}} \Theta_1}{1 + \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{tr}}} \cdot \Phi_1(\Theta_1)} \quad (4.4)$$

und die irreversible Adsorption auf den Domänen:

$$\frac{d\Theta_2}{dt} = \frac{k_{\text{irr}} \pi a^2 \rho_{\text{bulk}} \cdot \Phi_2(\Theta_2)}{1 + \frac{k_{\text{irr}}}{k_{\text{tr}}} \cdot \Phi_2(\Theta_2)} \quad (4.5)$$

4.5.3 Beschreibung des Algorithmus

Für die dynamischen Monte Carlo Simulationen der Bindung von Annexin A1 an gemischte Phospholipidbilayer aus POPC und POPS wurde ein partiell reversibles RSA-Modell verwendet. Es wurde eine heterogene Oberfläche angenommen, die aus einer Domänenfläche und der umgebenden Fläche bestand. Auf den runden Domänen wurde irreversible Bindung angenommen, auf der umgebenden Fläche reversible Bindung. Die Gesamtsimulationsfläche wird mit A bezeichnet, die Domänenfläche aufgrund ihres irreversiblen Bindungscharakters A_{irr} mit der korrespondierenden Ratenkonstante k_{irr} für die irreversible Adsorption. Die umgebende Fläche ist A_{rev} mit der Ratenkonstante k_{on} . Allgemein gilt, dass einem zum Zeitpunkt t reversibel adsorbierenden Teilchen eine Desorptionszeit $t_{\text{des}} = -\frac{\ln(r)}{k_{\text{off}}}$ mit einer Zufallszahl $r \in]0..1]$ zugeordnet wird, so dass es zum Zeitpunkt $t + t_{\text{des}}$ wieder desorbiert. Die Informationen für jedes dieser Teilchen wird in Listen gespeichert.

1. Die Anzahl der Domänen und deren Anteil an der Gesamtfläche werden ausgewählt. Die Simulationsfläche wird generiert, indem für jede Domäne eine xy -Position als Mittelpunkt festgelegt wird. Die Größe der Domänen wird zufällig auf Basis einer Gleichverteilung gewählt (Abbildung 4.16 A).
2. Der Anfangszeitpunkt $t_0 = 0$ und der Endzeitpunkt t_{Ende} werden festgelegt. Der folgende Teil des Algorithmus wird wiederholt, bis die Simulationszeit t den Endzeitpunkt erreicht hat ($t = t_{\text{Ende}}$).
3. In der Liste L_{rev} wird überprüft, ob ein reversibel adsorbiertes Teilchen seine Desorptionszeit erreicht hat und die Desorption gegebenenfalls ausgeführt. Es ist zu beachten, dass dieses Teilchen in der Grenzschicht, d. h. in der Nähe der Oberfläche, verbleibt und somit direkt wieder für eine Adsorption zur Verfügung steht.
4. Eine beliebige xy -Position auf der Oberfläche wird ausgewählt. Falls die Oberfläche innerhalb eines Radius a des Partikels frei ist, so findet ein Adsorptionsereignis statt und das Partikel wird in einer Liste erfasst.

5. Eine irreversible Adsorption findet statt, falls die sich die gewählte xy -Position auf einer Domäne befindet und falls sich innerhalb eines Radius r um die gewählte Position eine Domäne befindet. Das bedeutet, dass auch Teilchen, die nur teilweise auf einer Domäne adsorbieren, als irreversibel adsorbiert gezählt werden. Dies ist anschaulich in Abbildung 4.16 B dargestellt.
6. Die Simulationszeit wird um $\Delta t = \frac{-\ln(r)}{A_{\text{rev}}\rho_{\text{bulk}}k_{\text{on}}}$ für eine reversible und um $\Delta t = \frac{-\ln(r)}{A_{\text{irr}}\rho_{\text{bulk}}k_{\text{irr}}}$ für eine irreversible Adsorption inkrementiert. Sofern noch ein Transport zur Oberfläche notwendig war, wird die Simulationszeit zusätzlich um $\Delta t = \frac{1}{A\rho_{\text{bulk}}k_{\text{tr}}}$ inkrementiert.
7. Der Algorithmus wird ab Schritt 3 wiederholt, bis das Simulationseende erreicht ist.

Das in den QCM-Experimenten durchgeführte Spülen mit proteinfreiem Puffer wird ebenfalls berücksichtigt. Sobald die Simulationszeit den vorher gewählten Zeitpunkt des Spülens erreicht hat ($t = t_{\text{Ink}}$, t_{Ink} = Inkubationszeit), wird die Teilchenkonzentration $\rho_{\text{bulk}} = 0$ gesetzt. Ab diesem Zeitpunkt sind nur noch Desorptionsereignisse möglich.

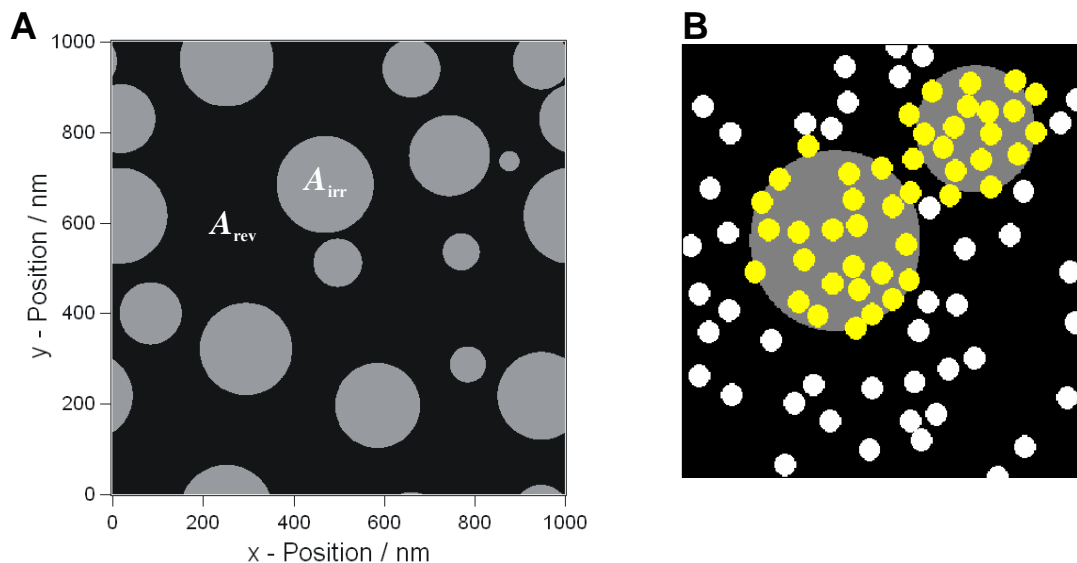


Abbildung 4.16: A) Darstellung einer Simulationsfläche mit 1 µm Kantenlänge und einer relativen Domänenfläche $A_{\text{irr}} = 0.3$. B) Vergrößerter Ausschnitt aus der Simulationsfläche mit reversibel gebundenen Teilchen (weiß) auf der Matrix (schwarz) und irreversibel gebundenen Teilchen (gelb) auf den Domänen (grau).

Das Flussdiagramm der verwendeten Simulation ist in Abbildung 4.17 gezeigt. Eine genaue Beschreibung dieses Flussdiagramms findet sich bei Kastl *et al.*⁴⁸ Eine detaillierte Beschreibung sowie ein Flussdiagramm des kompletten Simulationsprogramms inklusive der theoretischen Hintergründe befinden sich in der Dissertation von Eike Lütgens, der das in dieser Arbeit verwendete Programm VESAD entwickelt hat.⁷⁷

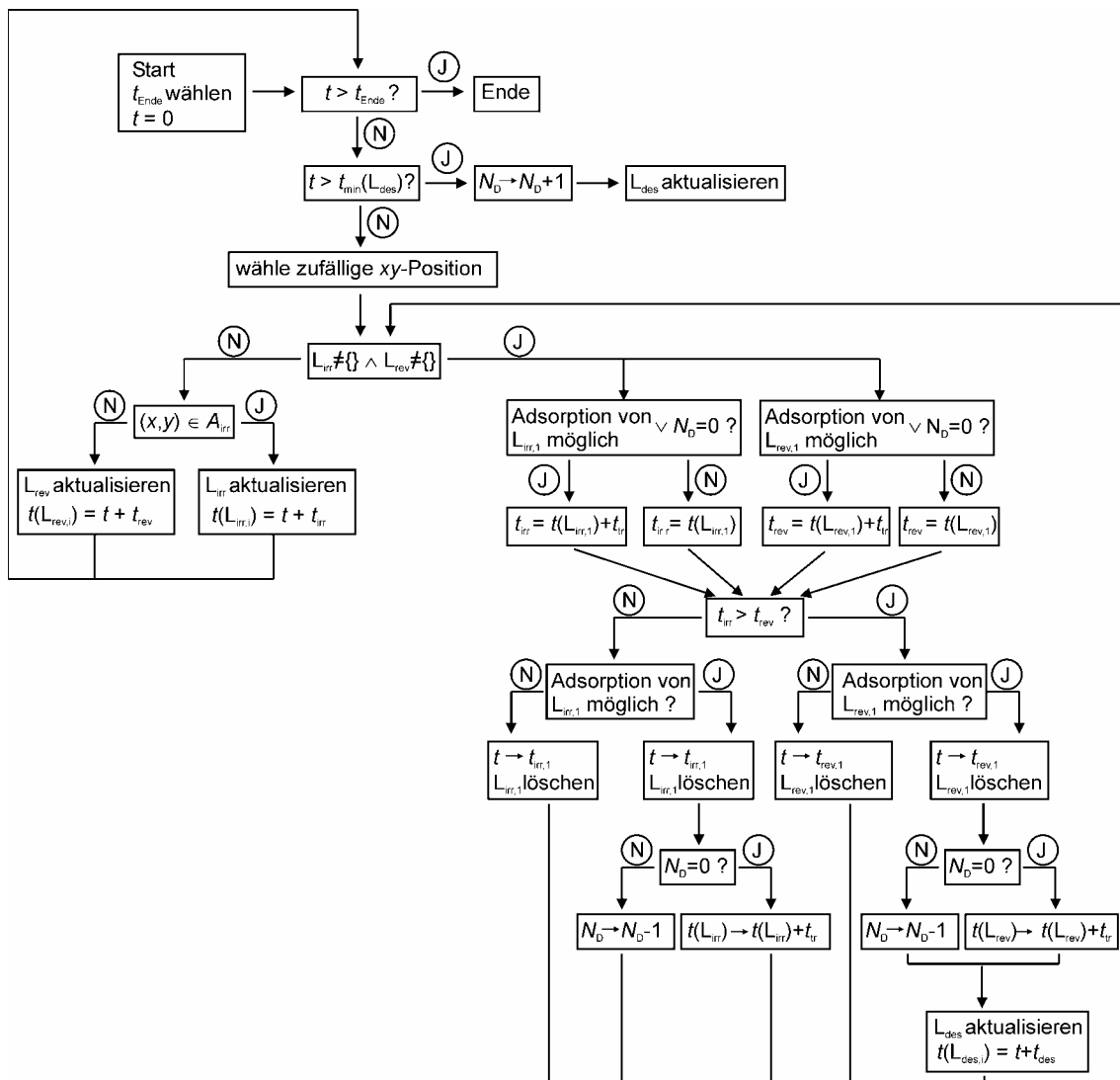


Abbildung 4.17: Flussdiagramm des Simulationsprogramms „VESAD“. Die Heterogenität der Oberfläche ist über reversible und irreversible Adsorptionsplätze (Domänen) im Diagramm berücksichtigt.⁷⁷

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von Annexin A1 an Phospholipidbilayer bestehend aus POPC und POPS wurden an der Universität Regensburg von Katja Kastl im Rahmen ihrer Doktorarbeit Quarzmikrowaage-Messungen durchgeführt.⁷⁰ Dazu wurde auf einem goldbedampften AT-cut Quarz mit der Resonanzfrequenz von 5 MHz zuerst eine Monolage aus Oktanthiol chemisorbiert. Auf diesen hydrophoben Layer wurden dann Vesikel aus POPC/POPS im molaren Verhältnis 4:1 gespreitet. Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung der Alkylketten mit den Acylketten der Phospholipide bildete sich ein Hybridbilayer aus Oktanthiol und Phospholipiden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass der Einfluss des Substrats auf die Zusammensetzung des oberen Monolayers eliminiert wird, die laterale Diffusion der Lipidmoleküle jedoch erhalten bleibt. Durch detaillierte Studien konnten Richter *et al.* zeigen, dass die Verfügbarkeit von geladenem Lipid in der der Flüssigkeit zugewandten Seite von gemischten Phospholipidmembranen stark vom Substrat abhängt. So ist bei festkörperunterstützten Membranen aus DOPC/DOPS (4:1) auf Glimmer nur ein Anteil von 7 % des geladenen Lipids im oberen Layer anzutreffen.²⁷

In den QCM-Messungen wurde der Einfluss der Calcium-Konzentration auf das Adsorptionsverhalten untersucht. Die Bindung von Annexin A1 an PS-Kopfgruppen wird durch Calcium vermittelt. Außerdem ist anzunehmen, dass Calcium auf die geladenen Serin-Gruppen eine verbrückende Wirkung ausübt und sich POPC- und POPS-Moleküle schon vor der Anbindung von Annexin A1 abhängig vom Calciumgehalt entmischen. Diese Überlegungen sowie die durchgeführten SFM-Messungen lassen daher eine Modellierung der Oberfläche durch eine POPC-reiche Matrix und POPS-reiche Domänen, wie in Kap. 4.5.2 beschrieben, zu.

4.5.4 Parameter der dynamischen Monte Carlo-Simulationen

Im Folgenden sollen die für die durchgeführten Computersimulationen relevanten Parameter erläutert und deren Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Bindungskurve diskutiert werden.

4.5.4.1 Partikelgröße

Die Größe eines Annexin A1-Moleküls wurde aus röntgenkristallographischen Daten abgeschätzt. Rosengarth kristallisierte vollständiges Annexin A1 sowohl ohne Calcium als auch in Gegenwart von 100 mM Calciumacetat.^{40,41} Calciumfreies Annexin A1 kristallisiert in einer rhombischen Raumgruppe mit den Zellparametern $a = 63.6 \text{ \AA}$, $b = 96.3 \text{ \AA}$, $c = 127.4 \text{ \AA}$ und $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. In der Einheitszelle befinden sich acht Moleküle. In Gegenwart von Calcium weitet sich die Kristallstruktur zu einer tetragonalen Einheitszelle mit den Parametern $a = b = 129.4 \text{ \AA}$ und $c = 66.6 \text{ \AA}$. Der vermehrte Platzbedarf ist leicht verständlich, da pro Molekül acht Calciumionen gebunden werden. Da das Annexin A1-Molekül eine trapezförmige Form besitzt und mit der großen Fläche an die Membran anbindet, lässt sich aus der kurzen Achse die Höhe eines Moleküls zu etwa 3.2 bis 3.3 nm abschätzen. Die Grundfläche beträgt etwa $6 \times 6 \text{ nm}^2$. Für die Simulationen wurde daher im Folgenden für die adsorbierenden Partikel ein Durchmesser von 6 nm angenommen.

4.5.4.2 Berechnung des Frequenzabfalls aus der Oberflächenbelegung

Die durchgeführten Monte Carlo-Simulationen liefern als Ergebnis den zeitabhängigen Belegungsgrad der Oberfläche, die QCM-Messungen jedoch den Abfall der Resonanzfrequenz aufgrund der gebundenen Masse. Damit die Computersimulationen mit den Daten aus den QCM-Messungen verglichen werden können, muss eine Beziehung zwischen diesen beiden Größen gefunden werden. Unter der Annahme, dass die Proteine nur eine Monolage bilden und aufgrund ihres kleinen Durchmessers als starr gebundene Partikel angesehen werden können, lässt sich somit eine lineare Proportionalität zwischen Belegung und Frequenzabfall ableiten. Der Proportionalitätsfaktor ergibt sich aus dem theoretischen Frequenzabfall bei einer hundertprozentigen Belegung. Allerdings lässt sich dieser Faktor nicht eindeutig bestimmen, da man aus geometrischen Gründen niemals eine vollständige Belegung mit runden oder konvexen Partikeln erreichen kann. In den nachfolgenden Simulationen wurde der Proportionalitätsfaktor durch Vergleich der irreversibel gebundenen Proteine auf einer festgelegten Domänenfläche mit dem entsprechenden Frequenzabfall ermittelt. Die Analyse der SFM-Aufnahmen einer POPC/POPS (4:1)-Oberfläche mit irreversibel gebundenem Annexin A1 bei 1 mM Ca^{2+} ergibt eine mittlere Belegung von 0.38.

Die absolute Belegung lässt sich daraus unter Berücksichtigung des *jamming limit* ($\Theta_{\text{jam}} = 0.547$) zu 0.208 berechnen. Die korrespondierende QCM-Messung weist einen Frequenzabfall von 19.5 Hz durch irreversibel gebundenes Protein auf. Der Proportionalitätsfaktor P ergibt sich dann zu:

$$P = \frac{\Delta f}{\Theta_{\text{abs}}} = \frac{-19.5}{0.208} = 94. \quad (4.6)$$

Zur besseren Übersicht werden alle im Folgenden gezeigten Simulationskurven als Frequenzverlauf dargestellt.

4.5.4.3 Größe A der Simulationsfläche

Zu Beginn muss die Größe der simulierten Fläche festgelegt werden. In Abbildung 4.18 sind simulierte Frequenzverläufe mit typischen Parametern bei verschiedenen Kantenlängen der Simulationsfläche dargestellt. Es wurde eine heterogene Oberfläche mit gleich bleibender Domänengröße angenommen. Man sieht deutlich, dass der grundlegende Kurvenverlauf unabhängig von der simulierten Fläche ist. Die Vergrößerung zeigt jedoch, dass bei kleinen Flächen das Rauschen groß ist und mit der Fläche sinkt. Eine Simulationsfläche von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ würde eine ausreichende Reproduzierbarkeit einzelner Simulationen gewährleisten. Allerdings steigt mit der Kantenlänge auch die Dauer für einen Simulationsdurchlauf (Abbildung 4.19).

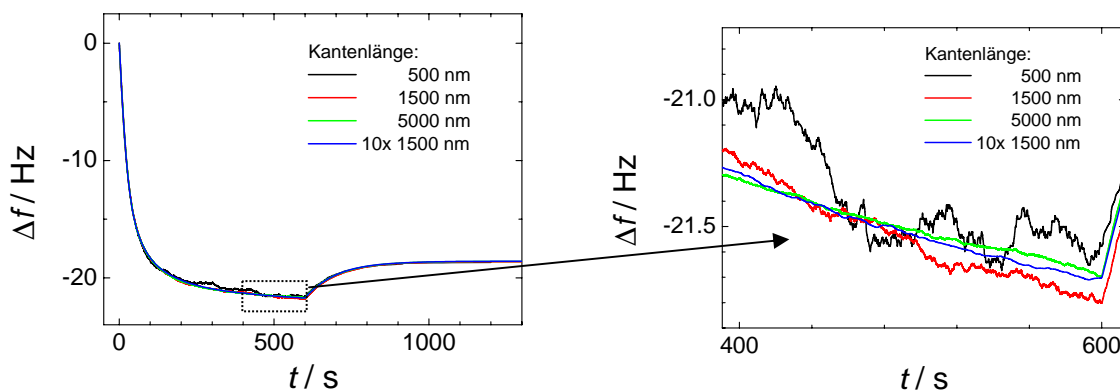


Abbildung 4.18: Simulierter Frequenzverlauf während der Proteinadsorption bei verschiedenen Kantenlängen der Simulationsfläche.

Da die Ratenkonstanten beim Anpassen der Simulation an die experimentellen Daten sehr oft verändert und daher sehr viele Simulationen durchgeführt werden mussten, wurde eine kleinere Simulationsfläche von $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ gewählt. Um die Reproduzierbarkeit zu testen und das Rauschen zu minimieren, wurden abschließend zehn Simulationen mit gleichen Parametern durchgeführt und gemittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Das mehrmalige Durchführen einer Simulation bei kleiner Simulationsfläche lieferte somit die gleichen Ergebnisse wie eine einzelne Simulation bei großer Fläche. Die benötigte Zeit ist jedoch wesentlich geringer.

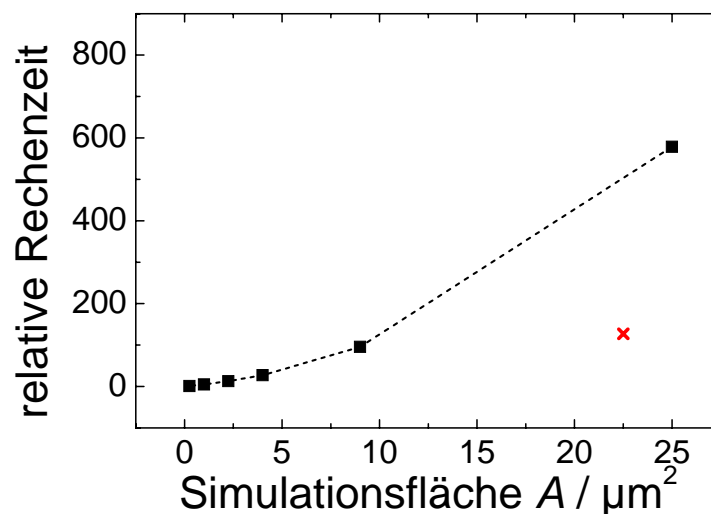


Abbildung 4.19: Relative Rechenzeit einer einzelnen (schwarz) Simulation in Abhängigkeit von der Simulationsfläche und Gesamtrechenzeit von zehn (rot) Simulationen.

Alle folgenden Simulationskurven zeigen den Mittelwert aus zehn Simulationen auf einer Simulationsfläche von $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$.

4.5.4.4 Einfluss der Teilchenzahldichte N_D

Für die QCM-Messungen wurde die Proteinkonzentration durch die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Das Gesamtvolumen setzt sich aus den Volumina der Schläuche, des Probengefäßes und der Messkammer zusammen und beträgt 2 mL. Die Konzentration von Annexin A1 im geschlossenen Kreislauf betrug $0.4 \mu\text{M}$, dies entspricht einer Teilchenzahldichte von $2.41 \cdot 10^{20} \text{ m}^{-3}$. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei der Monte Carlo-Simulation die Teilchenzahldichte ab dem Zeitpunkt $t = 0$ konstant bleibt und

dem angegebenen Wert entspricht (bei Vernachlässigung des Verlustes durch die Adsorption an der Oberfläche), während in den Experimenten ein gradueller Anstieg der Proteinkonzentration in der Messzelle anzunehmen ist. Das im Probengefäß vorgelegte Protein wird durch Schläuche zur Messzelle transportiert. Währenddessen kommt es zu Vermischung mit proteinfreiem Puffer, so dass es eine bestimmte Zeit dauert, bis die Proteinkonzentration konstant ist. Abbildung 4.20 zeigt, wie der Verlauf der Adsorptionskinetik bei typischen Simulationsparametern von der eingestellten Teilchenzahldichte abhängt. Im Anfangsbereich verlaufen die Kurven mit zunehmender Konzentration steiler. Außerdem wird bei kleinen Konzentrationen keine vollständige Belegung der Domänen erreicht. Bei hohen Teilchendichten ist der Einfluss auf den Kurvenverlauf nach dem Spülen geringer, d. h. die Domänen sind nahezu vollständig belegt, allerdings zeigt sich ein Unterschied vor dem Spülen durch mehr reversibel gebundene Partikel bei höherer Konzentration.

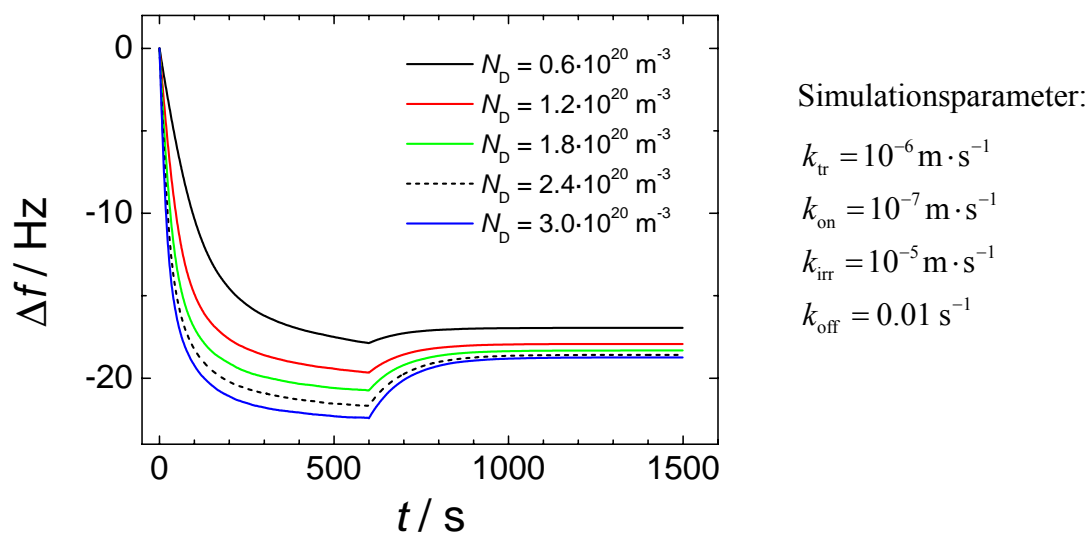


Abbildung 4.20: Simulierte Resonanzfrequenzverläufe bei unterschiedlichen Teilchenzahldichten N_D .

Für die Anpassung der Simulationen an die experimentellen Daten wurde bei langen Inkubationszeiten (Spülen nach mehr als 10 Minuten) eine Konzentration von $2.41 \cdot 10^{20} \text{ m}^{-3}$ angenommen, bei kürzeren Zeiten wurde eine mittlere Teilchendichte entsprechend Kapitel 4.5.5.2 (Gleichung (4.8)) verwendet.

4.5.4.5 Einfluss der Transportkonstante k_{tr}

Die Ratenkonstante des Transports, k_{tr} , kann nach Gl. (4.1) abgeschätzt werden. Der Einfluss von k_{tr} auf den simulierten Frequenzverlauf der Adsorption ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Analog zur Teilchenzahldichte beeinflusst die Transportkonstante die Anfangssteigung der Kurven. Eine höhere Transportkonstante resultiert in einer schnelleren Anbindung. Bei gegebener Teilchenzahldichte und einer starken irreversiblen Bindung kann die Transportkonstante durch Vergleich der Kurvenverläufe zu Beginn der Messung ermittelt werden. Sehr kleine Werte von k_{tr} verhindern eine vollständige Belegung der Domänen auch nach sehr langen Zeiten. Bei großen Werten von k_{tr} wird der Einfluss auf den Kurvenverlauf zunehmend geringer, da dann der Transport im Vergleich zur Anbindung nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

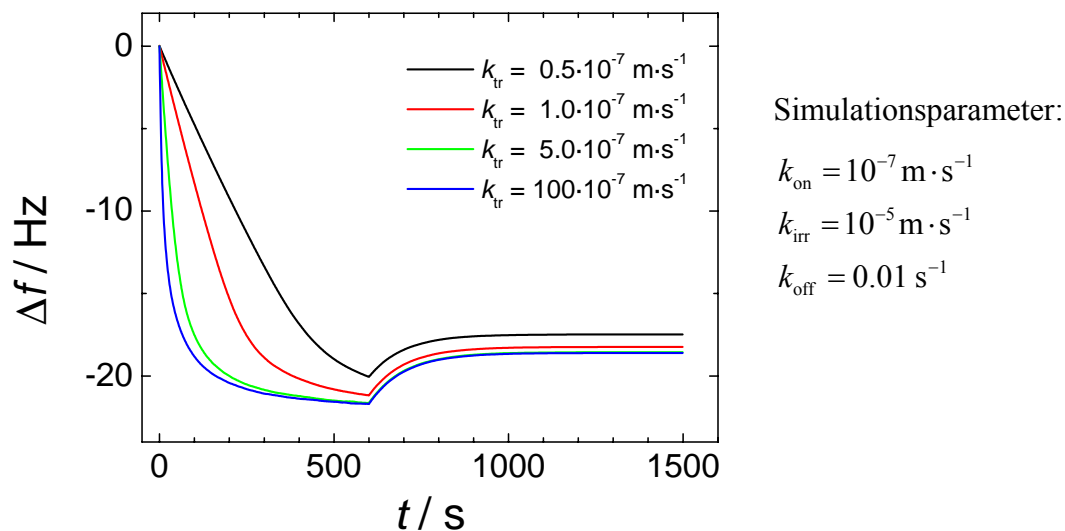


Abbildung 4.21: Simulierter Frequenzverlauf während einer Proteinadsorption bei verschiedenen Werten für k_{tr} .

4.5.4.6 Einfluss der kinetischen Ratenkonstanten k_{on} , k_{irr} und k_{off}

Der Einfluss der Ratenkonstanten für die reversible Adsorption (k_{on} , k_{off}) und die irreversible Adsorption (k_{irr}) soll im Folgenden anhand von Kurvenscharen mehrerer Computersimulationen erläutert werden. Ein Parameter wurde jeweils verändert, die anderen beiden konstant gehalten. Die Größen wurden in Bereichen variiert, die in den späteren Betrachtungen der Anbindung von Annexin A1 verwendet wurden.

Die Ratenkonstante k_{on} bestimmt hauptsächlich die Differenz der Frequenzänderung vor und nach dem Spülen. Eine starke reversible Anbindung vergrößert diese Differenz, kleine Werte bedeuten, dass die Frequenzänderung hauptsächlich von irreversibel gebundenen Partikeln hervorgerufen wird. Die Ratenkonstante der Desorption bestimmt einerseits den Verlauf der Kurve nach dem Spülen. Je größer k_{off} ist, desto steiler ist der Kurvenverlauf in diesem Bereich. Außerdem bestimmt k_{off} , wie lange reversibel gebundene Teilchen vor dem Spülen auf der Oberfläche verbleiben. Bei kleinen Werten ist die Desorption langsam und der Frequenzabfall ist größer, bei großen Werten verbleiben die reversibel adsorbierten Partikel nur kurz auf der Oberfläche, so dass der Frequenzabfall hauptsächlich durch irreversibel gebundene Partikel hervorgerufen wird.

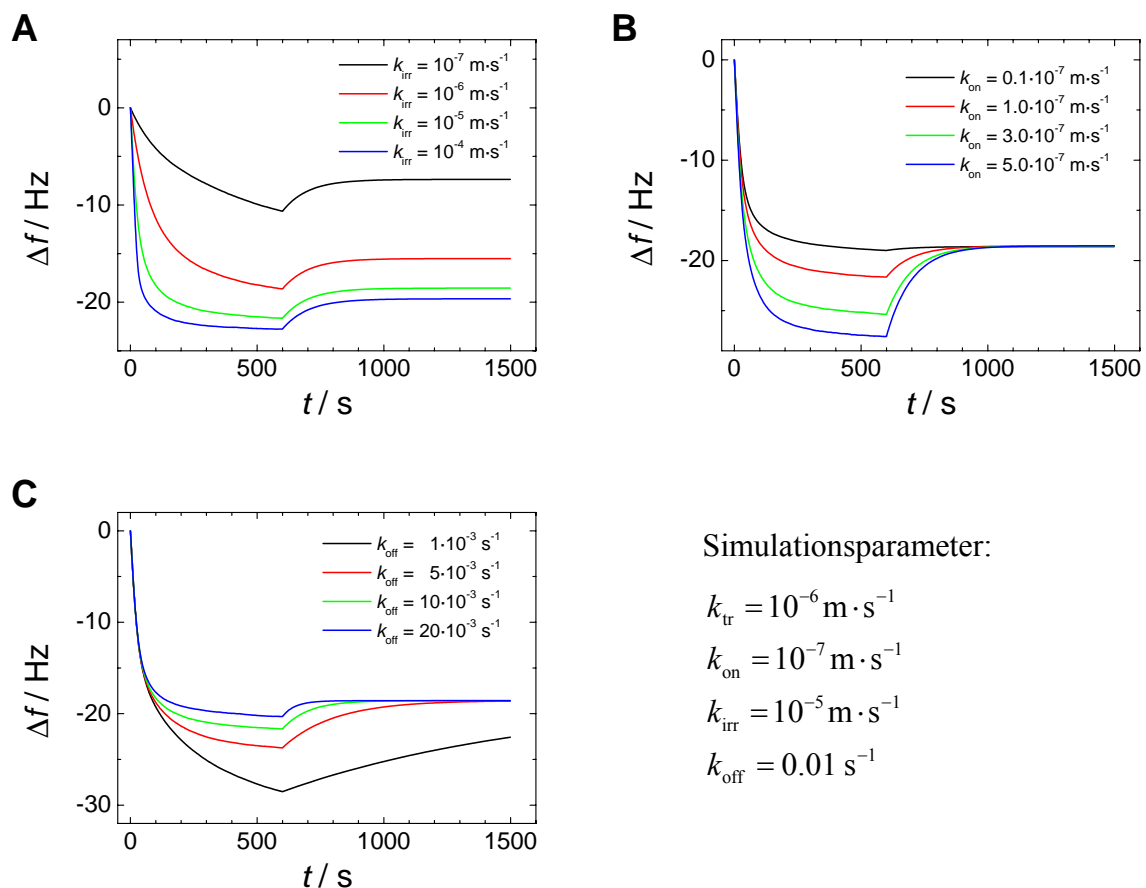


Abbildung 4.22: Simulierte Resonanzfrequenzverläufe für verschiedene Werte von A) k_{irr} , B) k_{on} , C) k_{off} .

Die irreversible Adsorption (k_{irr}) beeinflusst stark den Frequenzshift, der nach dem Spülen erreicht wird. Bei großen Werten von k_{irr} werden die Domänen schnell mit Partikeln belegt und abgesättigt. Es resultiert ein schneller Abfall der Resonanzfrequenz in den ersten Sekunden und es wird ein Gleichgewicht vor dem Spülen erreicht, wenn keine irreversible

Bindung aufgrund der hohen Belegung mehr möglich ist. Der Frequenzshift nach dem Spülen entspricht einer vollständigen Belegung der Domänen. Bei kleinen Werten von k_{irr} ist der Frequenzabfall zu Beginn der Simulation deutlich langsamer und es wird keine vollständige Belegung der Domänen erreicht. Der Frequenzshift nach dem Spülen entspricht dann einer unvollständigen Belegung der Domänen.

Der Frequenzverlauf nach dem Spülen wird ausschließlich durch k_{off} bestimmt, dies lässt sich sofort aus Gl. (4.4) ableiten, wenn die Teilchendichte $\rho_{\text{bulk}} = 0$ gesetzt wird. Es ergibt sich dann

$$\frac{d\Theta_1}{dt} = -k_{\text{off}}\Theta_1, \quad (4.7)$$

so dass sich k_{off} durch einen exponentiellen Fit an die Messdaten abschätzen lässt (Abbildung 4.23).

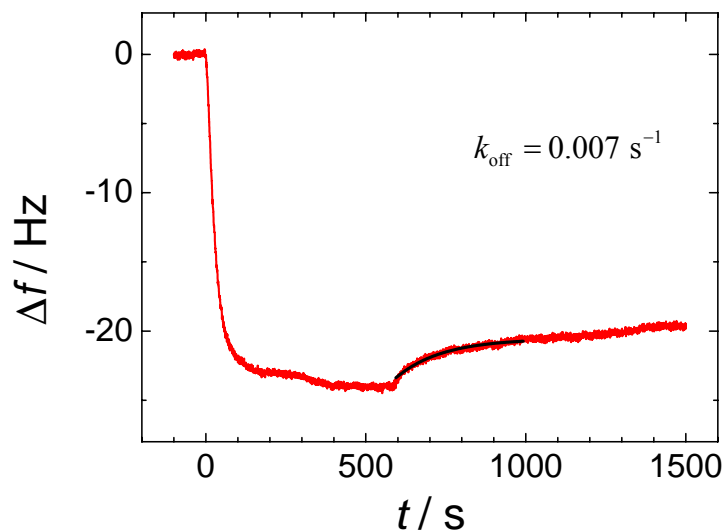


Abbildung 4.23: Exponentielle Anpassung des Resonanzfrequenzverlaufs nach dem Spülen zur Abschätzung von k_{off} .

4.5.4.7 Festlegung der Domänenfläche

Die in Kapitel 4.4 beschriebene *grain*-Analyse der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen ergab für 1.0 mM Ca^{2+} eine mittlere Belegung der Oberfläche mit irreversibel gebundenem Annexin A1 von 38 %. Durch die Berücksichtigung des *jamming limit* von 0.547 konnte die absolute Proteinbelegung zu 20.8 % berechnet werden. Die Festlegung der Domänenfläche

auf 38 % im Modell der RSA führt jedoch bei dem gewählten Domänenradius von 50 nm bei einer vollständigen Belegung der Domänen zu einer größeren Oberflächenbelegung, da die in Kap. 4.5.2 gezeigten Randeffekte irreversibel gebundene Teilchen zulassen, die teilweise außerhalb der Domänen liegen. Für einen Belegungsgrad von 20.8 % muss die Domänenfläche daher kleiner gewählt werden. Die Durchführung mehrerer Simulationen mit variierender Domänenfläche und anschließende Auswertung der Belegung mit irreversibel gebundenen Partikeln ergab, dass eine Domänenfläche von 33.5 % bei vollständiger irreversibler Belegung einen Gesamtbelegungsgrad von 20.8 % lieferte. Dieser Wert von 33.5 % wurde als Ausgangspunkt bei 1.0 mM Ca^{2+} gewählt.

4.5.4.8 Einfluss der Domänengröße

SFM-Aufnahmen von irreversibel adsorbierten Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen zeigten bei einem POPS-Anteil von 20 % und 1.0 mM Ca^{2+} einen mittleren Domänenradius von 50 nm. In den Computersimulationen besitzt der Domänenradius jedoch einen bedeutenden Einfluss auf den kinetischen Verlauf der Adsorption, da irreversible Adsorption auch im Randbereich der Domänen stattfinden kann.

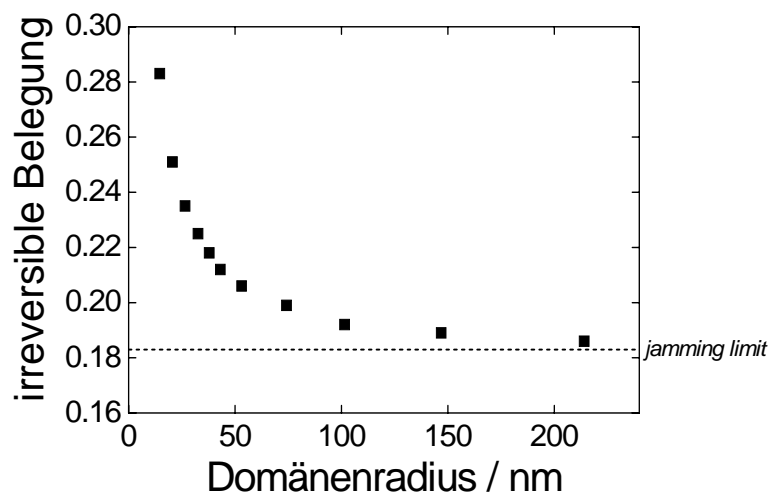
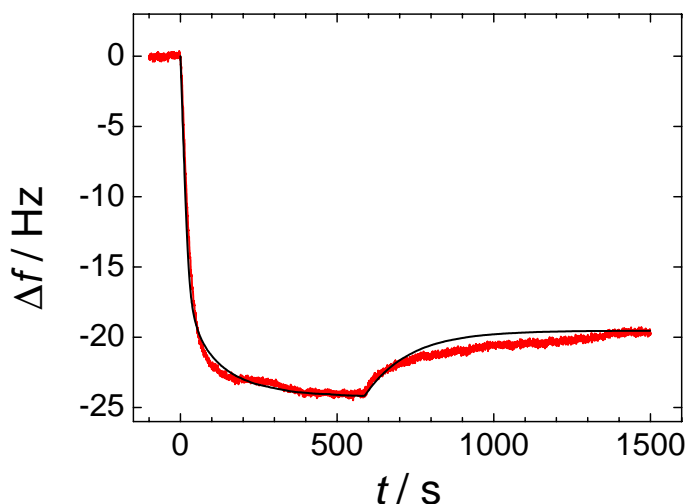


Abbildung 4.24: Abhängigkeit der irreversiblen Oberflächenbelegung vom mittleren Domänenradius bei gleich bleibender Gesamtdomänenfläche von 33.5 %. Eine steigende Domänengröße wird bei konstanter Simulationsfläche durch eine Erniedrigung der Domänenanzahl erreicht.

Je kleiner die Domänen sind, desto größer sind auch deren Randbereiche und damit die Fläche, die für irreversible Adsorption zur Verfügung steht. Mit steigendem Domänenradius nähert sich die irreversible Belegung immer mehr dem *jamming limit* an, während bei sehr kleinen Domänen eine deutlich höhere Belegung erzielt wird. Abbildung 4.24 zeigt die Abhängigkeit der irreversiblen Belegung der Simulationsfläche vom mittleren Domänenradius bei einer Gesamtdomänenfläche von 33.5 %. Auf einer $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ großen Simulationsfläche entspricht ein mittlerer Domänenradius von 15 nm fast 1000 Domänen, während bei nur 5 Domänen ein mittlerer Radius von 210 nm erhalten wird.

4.5.5 Anpassen der Simulationen an die QCM-Messungen in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration und der Inkubationszeit

Die QCM-Messungen umfassten die Bindungskurven von Annexin A1 an POPC/POPS (4:1) bei Calciumkonzentrationen von 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.5 mM und 1 mM. Eine komplette Messreihe bei allen Calciumkonzentrationen wurde nur mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten durchgeführt. Messungen mit Inkubationszeiten von 30 Minuten und von 30 bis 120 Sekunden lagen nicht für alle Calciumkonzentrationen vor.



Simulationsparameter:

$$N_D = 2.41 \cdot 10^{20} \text{ m}^{-3}$$

Domänenanzahl: 85

Anteil der Domänenfläche: 0.335

$$k_{\text{ir}} = 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{on}} = 1.2 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{irr}} = 7 \cdot 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{off}} = 0.007 \text{ s}^{-1}$$

Abbildung 4.25: Zeitlicher Resonanzfrequenzverlauf eines 5 MHz-Quarzes nach Zugabe von $0.4 \mu\text{M}$ Annexin A1 zu einer POPC/POPS (4:1)-Membran. Nach 600 s wurde mit proteinfreiem Puffer gespült. Die experimentellen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulation erhaltene Kurve in schwarz.

Ein Maximalwert für die Transportkonstante kann nach Gleichung (4.1) berechnet werden. Bei der verwendeten Pumpgeschwindigkeit von 0.35 mL/min ergibt sich damit $k_{tr} = 8 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Der Vergleich von simulierten Kurven mit den experimentellen Daten im Anfangsbereich der Adsorptionskurve zeigte jedoch eine bessere Übereinstimmung für $k_{tr} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Dieser Wert wurde für alle weiteren Simulationen verwendet.

4.5.5.1 Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration

A) Inkubationszeit $t_{\text{Ink}} = 10$ Minuten

Die Ergebnisse der Computersimulationen und der QCM-Messungen sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Alle experimentellen Kurven lassen sich hinreichend gut simulieren. Die Domänenfläche nimmt mit der Calciumkonzentration ab, dies war aus den Rasterkraftmikroskop-Aufnahmen zu erwarten. Die verwendeten Simulationsparameter sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

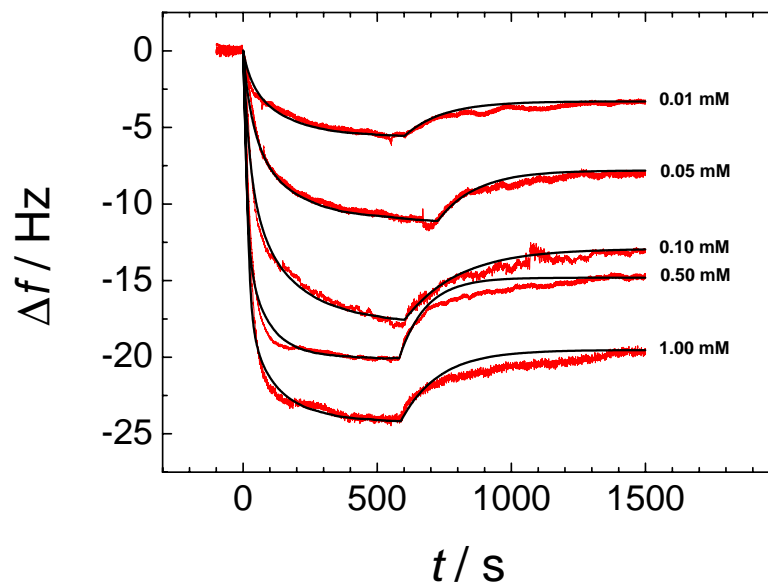


Abbildung 4.26: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz. Der mittlere Domänenradius betrug bei allen Simulationen 50 nm.

Der beobachtete Frequenzshift nach dem Spülen hängt stark von der Calciumkonzentration ab. Die irreversible Bindung erfolgt im Allgemeinen schneller als die reversible Bindung, so dass der Kurvenverlauf am Anfang hauptsächlich von k_{irr} beeinflusst wird. Die großen Werte von k_{irr} zeigen auch, dass auf den Domänen sehr schnell eine hohe Belegung erreicht wird. Ein Abnehmen der irreversiblen Belegung kann daher nur durch eine Verringerung der Domänenfläche simuliert werden. So sinkt der Anteil der Domänenfläche von 33.5 % bei 1.00 mM Ca^{2+} auf 6.5 % bei 0.01 mM Ca^{2+} . Damit ist eine Reduzierung der irreversibel belegten Fläche von 20.8 % auf 3.5 % verbunden. Die Belegungen von 20.8 % bei 1.00 mM Ca^{2+} und 8.3 % bei 0.05 mM Ca^{2+} stimmen sehr gut mit den aus den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen berechneten Belegungen überein. Die Anzahl der Domänen in der $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$ großen Simulationsfläche wurde im Vorfeld so gewählt, dass der mittlere Radius etwa 50 nm betrug.

Tabelle 5: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche für eine Inkubationszeit von 10 Minuten und konstantem mittlerem Domänenradius.

$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{mM}$	$k_{\text{on}} / 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$K / 10^{-6} \text{ m}$	$k_{\text{irr}} / 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	relative Domänenfläche	Domänenanzahl	mittlerer Radius / nm	belegte Fläche
0.01	3.0	0.007	4.3	2.0	0.065	17	49.6	0.035
0.05	5.2	0.007	7.4	2.5	0.150	37	51.1	0.083
0.10	7.0	0.005	14.0	5.0	0.240	61	50.1	0.137
0.50	16.8	0.010	16.8	60	0.255	64	50.3	0.158
1.00	12.0	0.007	17.1	70	0.335	85	50.3	0.208

Sowohl die Bindungskonstante $K = k_{\text{on}} / k_{\text{off}}$ der reversiblen Bindung als auch die irreversible Bindungskonstante k_{irr} nehmen mit steigendem Calciumgehalt zu. Die Simulationsparameter bei 0.5 mM und 1.0 mM Ca^{2+} weisen nur geringe Unterschiede auf. Die Änderung des Frequenzabfalls wird hier hauptsächlich durch die unterschiedliche Domänenfläche erreicht. Die QCM-Kurven bei diesen Ca^{2+} -Konzentrationen zeigen in den ersten 200 Sekunden einen deutlich steileren Frequenzabfall auf, als die Messungen bei kleineren Calciumkonzentrationen. Auffällig ist der Unterschied zwischen 0.1 und 0.5 mM Ca^{2+} , es wird annähernd der gleiche Frequenzshift nach dem Spülen erreicht, bei 0.1 mM Ca^{2+} erfolgt die Anbindung jedoch deutlich langsamer. In den Simulationsparametern zeigt sich dies in

einer ähnlichen Domänenfläche, während die irreversible Bindung bei 0.1 mM Ca^{2+} eine um den Faktor 12 verringerte Ratenkonstante aufweist. Ab 0.1 mM Ca^{2+} ergibt sich ein Frequenzshift vor und nach dem Spülen von 4.6 - 5.2 Hz. Dies macht sich einer geringen Veränderung der reversiblen Bindungskonstante K bemerkbar. Der auffallend große Wert für k_{off} bei 0.5 mM Ca^{2+} wird durch einen größeren Wert für k_{on} ausgeglichen. Bei 0.05 mM Ca^{2+} beträgt der Frequenzanstieg nach dem Spülen nur noch 3.3 Hz, bei 0.01 mM Ca^{2+} sogar nur noch 2.3 Hz. Dies führt wie erwartet zu einer deutlichen Verringerung von K . Da sich hier die Ratenkonstante der Desorption k_{off} mit der Calciumkonzentration nicht ändert, verringert sich k_{on} mit sinkendem Ca^{2+} -Gehalt.

Die irreversible Bindungskonstante k_{irr} weist zwischen 0.1 mM und 0.5 mM Ca^{2+} einen Sprung auf. Vergleicht man sowohl die Werte bei 0.01, 0.05 und 0.1 mM Ca^{2+} als auch die Werte bei 0.5 und 1.0 mM Ca^{2+} miteinander, so fällt auf, dass sich die k_{irr} -Werte jeweils nur wenig verändern. Die irreversible Bindung ist also bei kleinen Calciumgehalten stark verlangsamt.

Im Gegensatz zu den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen weisen die auf der Simulationsfläche generierten Domänen eine relativ breite Größenverteilung auf. Um den Einfluss der Domänengröße zu überprüfen wurden ein weiteres Mal Monte Carlo-Simulationen durchgeführt und an die in Abbildung 4.26 gezeigten Adsorptionskurven angepasst. Ausgehend von der Messung bei 1.0 mM Ca^{2+} wurde nun nicht die mittlere Domänengröße konstant gehalten, sondern deren Anzahl. Ein kleinerer Anteil der Domänenfläche resultierte somit in kleineren Domänen. Die Simulationskurven sowie die QCM-Messkurven sind in Abbildung 4.27 dargestellt und die dazugehörigen Simulationsparameter in Tabelle 6 zusammengefasst.

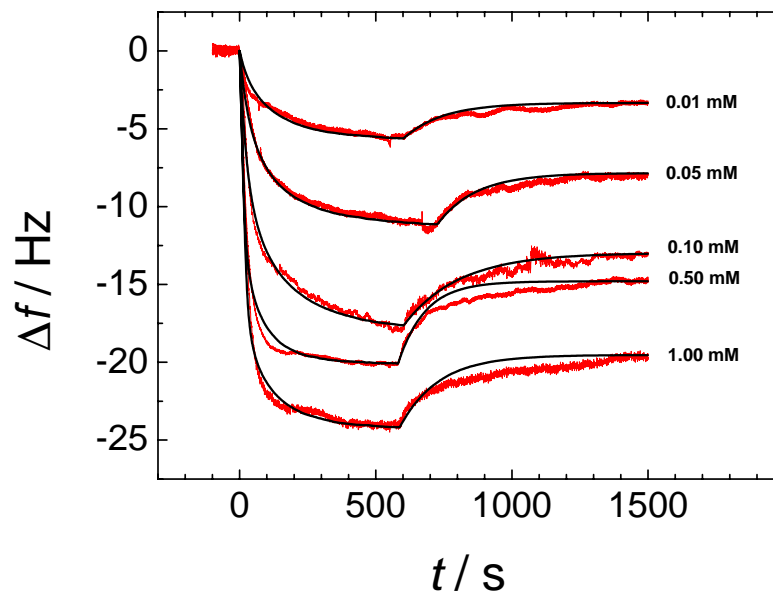


Abbildung 4.27: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von $0.4 \mu\text{M}$ Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz. Die Simulationen wurden mit gleich bleibender Domänenanzahl durchgeführt.

Tabelle 6: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche für eine Inkubationszeit von 10 Minuten und konstanter Domänenanzahl.

$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{mM}$	$k_{\text{on}} / 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$K / 10^{-6} \text{ m}$	$k_{\text{irr}} / 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	relative Domänenfläche	Domänenanzahl	mittlerer Radius / nm	belegte Fläche
0.01	3.0	0.007	4.3	2.0	0.055	85	20.2	0.036
0.05	5.2	0.007	7.4	2.5	0.140	85	32.2	0.084
0.10	7.0	0.005	14.0	5.0	0.235	85	42.0	0.138
0.50	16.8	0.010	16.8	50	0.250	85	43.0	0.157
1.00	12.0	0.007	17.1	70	0.335	85	50.3	0.208

B) Inkubationszeit 30 Minuten

Zusätzlich zu den bisher gezeigten Messungen wurden mit der QCM Bindungskurven auf einer längeren Zeitskala aufgenommen. Der Zeitpunkt des Spülens mit proteinfreiem Puffer wurde bei etwa 30 Minuten gewählt. Mit Hilfe dieser Experimente sollte untersucht werden,

ob sich die Reversibilität der Bindung bei langen Inkubationszeiten ändert. Die Ergebnisse der Computersimulationen und der QCM-Messungen sind in Abbildung 4.28 dargestellt und die verwendeten Simulationsparameter in Tabelle 7 zusammengefasst.

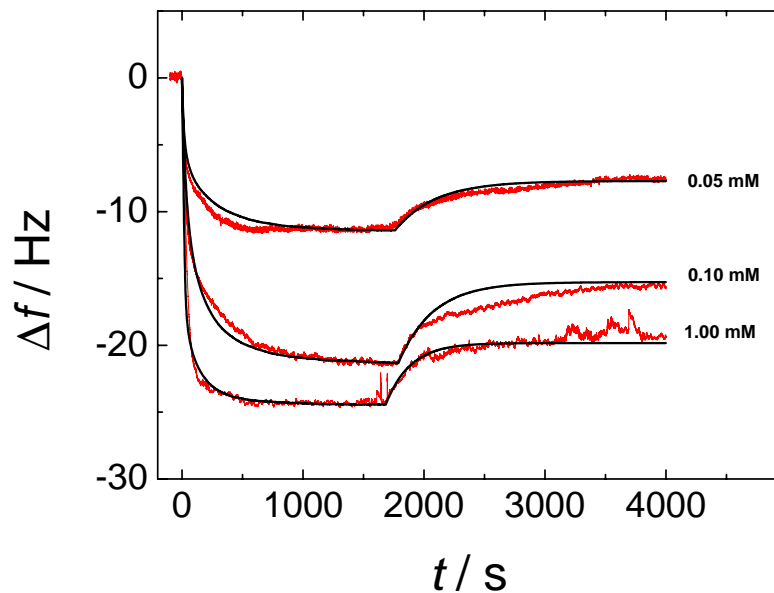


Abbildung 4.28: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von $0.4 \mu\text{M}$ Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und einer Inkubationszeit von 30 Minuten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz. Der mittlere Domänenradius betrug bei allen Simulationen 50 nm.

Mit zunehmendem Calciumgehalt steigt die gemessene Frequenzänderung und damit in den Simulationen die von den Domänen eingenommene Fläche. Als mittlerer Domänenradius wurde wieder 50 nm gewählt. Auch die kinetischen Parameter zeigen ein ähnliches Verhalten wie bei den Messungen, bei denen nach 10 Minuten gespült wurde. Die reversible Bindungskonstante K ist bei 0.05 mM Ca^{2+} deutlich kleiner als bei höheren Calciumgehalten, während k_{irr} bei 1.0 mM Ca^{2+} deutlich größer ist, als bei den beiden niedrigen Calciumkonzentrationen. Auffällig ist allerdings, dass für die Ratenkonstanten der reversiblen Bindung (k_{on} und k_{off}), verglichen mit den Messungen mit einer Inkubationszeit von 10 Minuten, kleinere Werte ermittelt werden. Die Werte von K liegen jedoch im gleichen Bereich. Nach dem Spülen mit proteinfreiem Puffer, wo nur Desorption stattfindet, ist der Frequenzanstieg flacher als bei kürzeren Inkubationszeiten. Die Reversibilität scheint nach längerer Adsorptionszeit eingeschränkt zu sein.

Tabelle 7: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche für eine Inkubationszeit von 30 Minuten und konstantem mittlerem Domänenradius.

$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{mM}$	$k_{\text{on}} / 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$K / 10^{-6} \text{ m}$	$k_{\text{irr}} / 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	relative Domänenfläche	Domänenanzahl
0.05	2.5	0.003	8.3	8.0	0.135	34
0.10	7.5	0.0035	21.4	3.5	0.275	70
1.00	8.5	0.005	17.0	80	0.335	85

4.5.5.2 Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Motiviert durch die Befunde, dass die Inkubationszeit Einfluss auf das Desorptionsverhalten von Annexin A1 auf POPC/POPS-Oberflächen besitzt, wurden zusätzlich QCM-Messungen durchgeführt, bei denen der Bindungsprozess sehr früh unterbrochen wurde. Es wurde schon nach 30 - 120 Sekunden mit proteinfreiem Puffer gespült. Dadurch sollte aufgeklärt werden, ob zu Beginn der Anbindung bereits Domänen vorhanden sind, auf denen irreversible Adsorption stattfinden kann, oder ob sich diese erst während des Bindungsprozesses ausbilden. Bei der Durchführung der Monte Carlo-Simulationen trat jedoch das Problem auf, dass die Proteinkonzentration nach der Zugabe nicht direkt ihren Endwert erreicht, sondern dass bei der Bewegung der Proteinlösung durch den Schlauch und in der Messzelle selbst eine Verdünnung auftritt. Daher müsste bei kurzen Messzeiten eine ansteigende Proteinkonzentration berücksichtigt werden. Das Simulationsprogramm bietet jedoch nicht diese Möglichkeit. Zur Quantifizierung dieses Problems wurde die Resonanzfrequenzänderung eines Quarzes nach Erhöhung der NaCl-Konzentration von 100 mM auf 150 mM gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.29 dargestellt. Die Änderung der Salzkonzentration resultiert in einer Resonanzfrequenzänderung von $\Delta f = -15 \text{ Hz}$. Die Änderung erfolgt zu Beginn annähernd linear und der Endwert ist nach etwa 60 Sekunden erreicht.

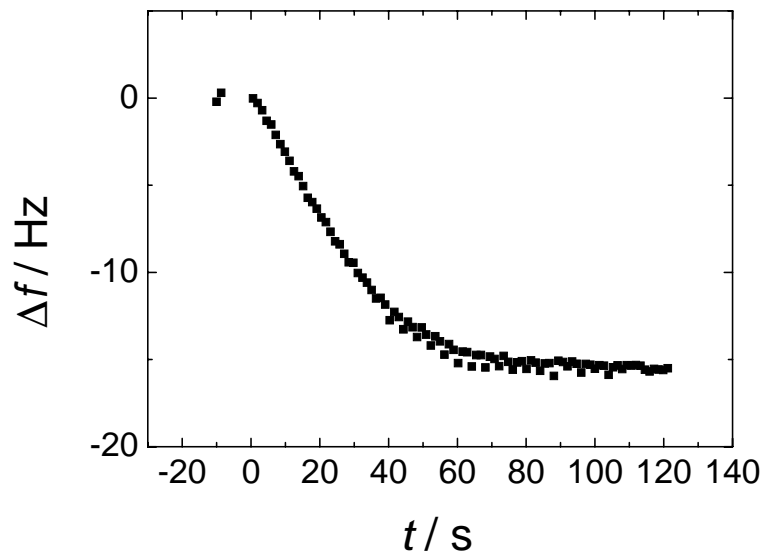


Abbildung 4.29: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach Erhöhung der NaCl-Konzentration von 100 mM auf 150 mM.

Um dieses Verhalten zu berücksichtigen wurde in den Simulationen mit kurzen Inkubationszeiten die Teilchenzahldichte angepasst. Dazu wurde angenommen, dass diese innerhalb der ersten 60 Sekunden im Mittel die Hälfte des Endwerts beträgt. Für kleine Inkubationszeiten t gilt somit für die mittlere Teilchenzahldichte N' :

$$\begin{aligned}
 N' &= \frac{1}{2} \frac{t}{60\text{s}} \cdot N && \text{für } t \leq 60\text{s} \\
 N' &= \left(\frac{1}{2} \frac{60\text{s}}{t} + \frac{t-60\text{s}}{t} \right) \cdot N && \text{für } t > 60\text{s}
 \end{aligned} \tag{4.8}$$

A) Calciumkonzentration $c(\text{Ca}^{2+}) = 1.0 \text{ mM}$

Bei einer Calciumkonzentration von 1.0 mM wurden QCM-Messungen durchgeführt, bei denen nach sehr kurzer Zeit (35 und 75 Sekunden) gespült wurde. Zu diesen Messungen wurden Simulationen durchgeführt, die auf den gleichen Parametern basierten, wie die bereits gezeigten Experimente mit langen Inkubationszeiten. Es wurden Domänen mit einem mittleren Radius von 50 nm angenommen, die 33.5 % der Simulationsfläche einnahmen. Die Frequenzverläufe der QCM-Messungen sowie die Ergebnisse der Simulationen sind in Abbildung 4.30 dargestellt und die Simulationsparameter in Tabelle 8 zusammengefasst.

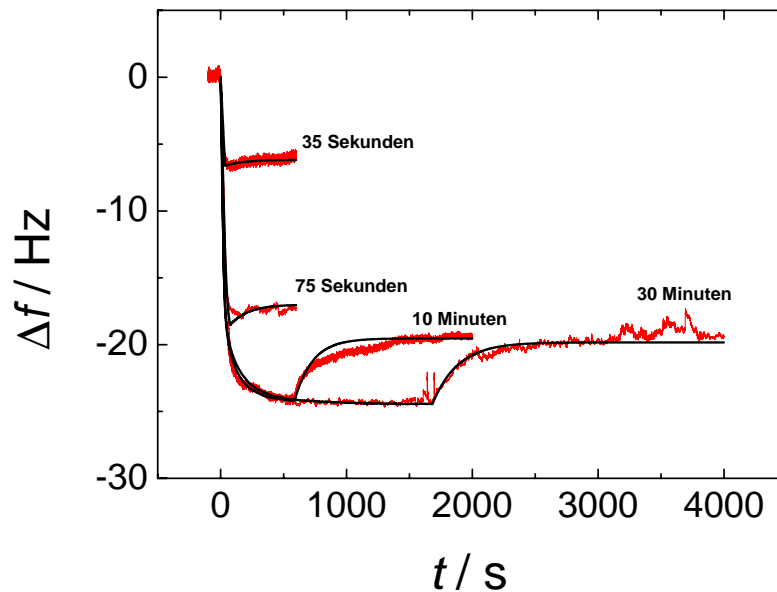


Abbildung 4.30: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von $0.4 \mu\text{M}$ Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei einer Calciumkonzentrationen von 1.0 mM und unterschiedlicher Inkubationszeit. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz. Der mittlere Domänenradius betrug bei allen Simulationen 50 nm .

Bei den kurzen Inkubationszeiten ist nach dem Spülen kein Frequenzanstieg zu erkennen, die Bindung ist innerhalb der ersten 75 Sekunden vollständig irreversibel. Die simulierten Kurven stimmen gut mit den experimentellen Daten überein, nur bei $t_{\text{Ink}} = 75 \text{ Sekunden}$ zeigt die Simulation schon einen geringen reversiblen Bindungscharakter. Die QCM-Kurven bis $t_{\text{Ink}} = 10 \text{ Minuten}$ konnten mit den gleichen kinetischen Parametern angepasst werden. Nur bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten zeigt sich eine kleine Abweichung in k_{irr} . Außerdem sind k_{on} und k_{off} etwas kleiner, die reversible Bindungskonstante K ist jedoch gleich.

Tabelle 8: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche bei einer Calciumkonzentration von 1.0 mM .

t_{Ink}	$k_{\text{on}} / 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$K / 10^{-6} \text{ m}$	$k_{\text{irr}} / 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	belegte Fläche
35 Sekunden	12.0	0.007	17.1	70	0.066
75 Sekunden	12.0	0.007	17.1	70	0.181
10 Minuten	12.0	0.007	17.1	70	0.208
30 Minuten	8.5	0.005	17.0	80	0.211

B) Calciumkonzentration $c(\text{Ca}^{2+}) = 0.5 \text{ mM}$

Bei einer Calciumkonzentration von 0.5 mM wurden Messungen mit Inkubationszeiten von 34 und 90 Sekunden, sowie 10 Minuten durchgeführt. Für die Computersimulationen wurden Domänen mit einem mittleren Radius von 50 nm angenommen, die 25.5 % der Simulationsfläche einnahmen. Die experimentellen und simulierten Frequenzverläufe sind in Abbildung 4.31 dargestellt und die Simulationsparameter in Tabelle 9 zusammengefasst.

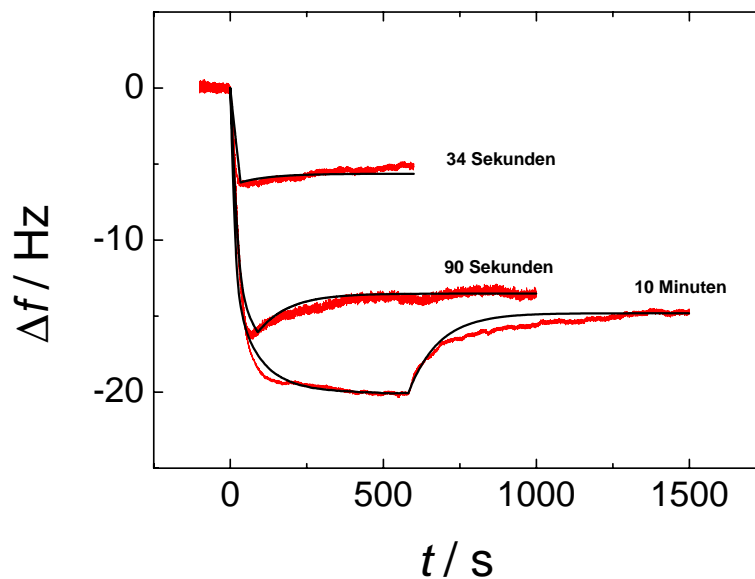


Abbildung 4.31: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von $0.4 \mu\text{M}$ Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei einer Calciumkonzentration von 0.5 mM und unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz.

Auch hier zeigt sich, dass die Bindung innerhalb der ersten 90 Sekunden fast vollständig irreversibel ist. Allerdings ist nach dem Spülen ein geringer Frequenzanstieg zu beobachten. Dies deutet im Vergleich zu den Messungen bei 1.0 mM Ca^{2+} darauf hin, dass die reversible Bindung eine etwas stärkere Bedeutung spielt. Alle drei Messkurven ließen sich mit den gleichen kinetischen Parametern mit guter Übereinstimmung simulieren.

Tabelle 9: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche bei einer Calciumkonzentration von 0.5 mM.

t_{Ink}	$k_{\text{on}} / 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$K / 10^{-6} \text{ m}$	$k_{\text{irr}} / 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	belegte Fläche
34 Sekunden	16.8	0.010	16.8	60	0.060
90 Sekunden	16.8	0.010	16.8	60	0.144
10 Minuten	16.8	0.010	16.8	60	0.158

C) Calciumkonzentration $c(\text{Ca}^{2+}) = 0.05 \text{ mM}$

Abbildung 4.32 zeigt die Ergebnisse der bei 0.05 mM Ca^{2+} durchgeführten QCM-Messungen und der entsprechenden Computersimulationen. Es wurden Domänen mit einem mittleren Radius von 50 nm angenommen, die 15.0 % der Simulationsfläche einnahmen. Die Simulationsparameter sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

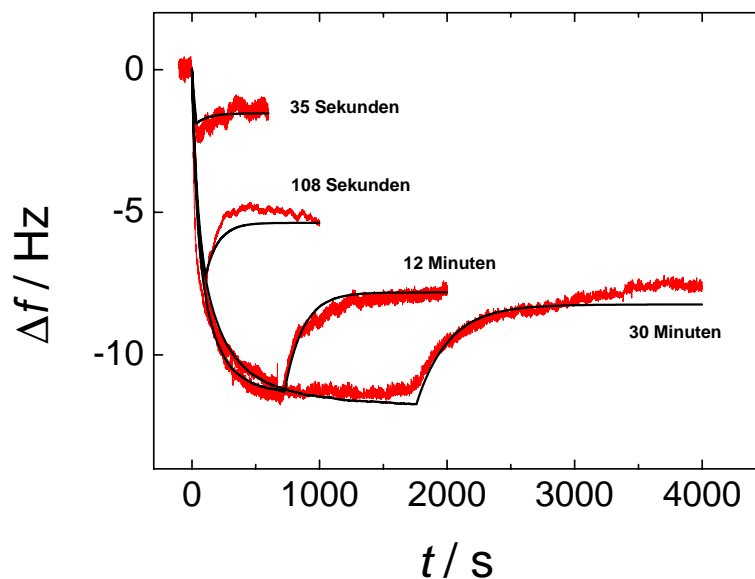


Abbildung 4.32: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen einer Calciumkonzentration von 0.05 mM und unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz.

Um eine gute Anpassung der simulierten Frequenzverläufe an die experimentellen Daten zu erreichen, mussten k_{on} und k_{off} mit der Inkubationszeit variiert werden. Die reversible Bindungskonstante K wurde jedoch konstant gehalten. Bei allen Simulationen wurde die

gleiche irreversible Bindungskonstante k_{irr} verwendet. Bei einer Inkubationszeit von 108 Sekunden ist ein deutlicher Frequenzanstieg nach dem Spülen zu beobachten. Der reversible Bindungscharakter ist bei 0.05 mM Ca^{2+} bei kurzen Inkubationszeiten stärker ausgeprägt als bei höheren Calciumkonzentrationen.

Tabelle 10: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche bei einer Calciumkonzentration von 0.05 mM.

t_{Ink}	$k_{\text{on}} / 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$K / 10^{-6} \text{ m}$	$k_{\text{irr}} / 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$	belegte Fläche
35 Sekunden	8.0	0.010	8.0	2.5	0.016
108 Sekunden	8.0	0.010	8.0	2.5	0.057
12 Minuten	5.6	0.007	8.0	2.5	0.083
30 Minuten	3.2	0.004	8.0	2.5	0.088

4.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die beiden untersuchten Annexine A1 und A2t binden calciumvermittelt an Phospholipidmembranen, die Serin-Kopfgruppen enthalten. Der reversible Bindungscharakter der Annexine A1 und A2t auf festkörperunterstützten POPC/POPS-Membranen wurde schon ausführlich von Kastl und Ross untersucht, es fehlte jedoch ein ausreichendes Bindungsmodell, welches das teilweise reversible Bindungsverhalten beschrieb.^{48-51,70} Sowohl Quarzmikrowaage-Messungen als auch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen auf Glimmer ließen den Schluss zu, dass sich eine heterogene Oberfläche mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften ausbildet. Allerdings konnten die SFM-Aufnahmen auf Glimmer aufgrund der geringen Proteinbelegung nicht die Ergebnisse der QCM-Messungen erklären, die auf eine wesentlich größere Belegung hindeuteten. Dies ist im Einfluss des Substrats auf die Verfügbarkeit von geladenen Lipidkopfgruppen an der Membranoberfläche begründet. In festkörperunterstützten Hybridmembranen, wie sie in den QCM-Experimenten verwendet wurden, hat das Substrat jedoch keinen Einfluss, da die Lipide keine *flip-flop* - Bewegung durchführen können. Im Gegensatz zu Glimmer ist der Einfluss einer Siliziumdioxid-Oberfläche auf die Ladungsverteilung im darüberliegenden Bilayer gering. Daher wurden in

dieser Arbeit Messmethoden wie Ellipsometrie und Rasterkraftmikroskopie eingesetzt, bei denen SiO₂-Oberflächen verwendet werden können.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Ellipsometrie-Messungen zur Untersuchung der Bindungskinetik von Annexin A1 und A2t auf festkörperunterstützten POPC/POPS-Membranen auf Si/SiO₂ ergaben jedoch keine neuen Erkenntnisse über die Bindungskinetik. Zwar konnte der Anbindungsprozess an die Membran gut beobachtet werden, dieser zeigte jedoch keine signifikante Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung (Annexin A1) und der Calciumkonzentration (A1 und A2t). Auch der Desorptionsprozess zeigte nicht das erwartete exponentielle Verhalten, wie bei den Experimenten mit der Quarzmikrowaage. Gründe dafür könnten einerseits die unterschiedliche Zellgeometrie sein, die in der Messzelle des Ellipsometers andere Strömungsverhältnisse bedingt als in der QCM-Messkammer. Im Gegensatz zur Quarzmikrowaagen-Technik, bei der Veränderungen auf der Oberfläche akustisch, d. h. über die Veränderung der Resonanzfrequenz, gemessen werden, ist die Ellipsometrie eine optische Methode. Man erhält eine gemittelte Schichtdicke basierend auf dem Modell eines homogenen Films. Kleinen Defekte in der Membran oder Proteinaggregate bewirken in den beiden Methoden unterschiedliche Antworten des Messsignals und können daher nicht ohne Einschränkungen miteinander verglichen werden. Die Untersuchungen auf den strukturierten Lipidstreifen zeigten außerdem, dass die unspezifische Proteinadsorption auf dem Substrat eine sehr große Rolle spielt. Ansatzweise war dies auch schon in den Fluoreszenzaufnahmen zu erkennen, überraschenderweise war die unspezifische Bindung von Annexin A2t auf SiO₂ noch stärker als die Bindung auf der Membran. Auch die vorherige Passivierung durch die Adsorption von BSA konnte die unspezifische Anbindung von Annexin A2t nicht vollständig unterdrücken.

Die laterale Organisation von Annexin A1 und A2t auf POPC/POPS-Membranen wurde mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie bei unterschiedlichen Membranzusammensetzungen und Calciumkonzentrationen untersucht. Dabei zeigte sich deutlich die vermutete Domänenstruktur auf der Oberfläche. Nach der Bindung beider Proteine zeigten sich größtenteils runde Bereiche (Domänen), in denen das Protein irreversibel gebunden war, während außerhalb dieser Bereiche (Matrix) keine Proteinanbindung zu sehen war. Bei der Adsorption von Annexin A1 stieg die irreversible Belegung mit steigendem POPS-Anteil von 0.22 bei 5 % POPS auf 0.38 bei 20 % POPS bei 1.0 mM Ca²⁺. Gleichzeitig sank die Belegung bei geringerem Calciumgehalt. Die mittlere Größe der Domänen nahm mit zunehmender Belegung ab und war bei der höchsten Belegung nicht mehr eindeutig zu bestimmen. Bei 5 % POPS-Anteil war jedoch kein signifikanter

Einfluss der Calciumkonzentration auf die Domänengröße (mittlerer Domänenradius 140 nm) festzustellen.

Die laterale Organisation von Annexin A2t wurde nur auf POPC/POPS (95:5)-Membranen untersucht, da auf diesen Proben die Belegung klein genug ist, um die Domänenstruktur ausreichend gut aufzulösen. Hier zeigte sich eine Verringerung der irreversiblen Belegung von 0.31 auf 0.22 bei Erniedrigung der Calciumkonzentration von 1.0 mM auf 0.05 mM. Gleichzeitig sank der mittlere Domänenradius von 155 nm auf 80 nm. Es ist möglich, dass bei Annexin A2t die Calciumionen einen zusätzlichen verbrückenden Effekt zwischen einzelnen Proteinmolekülen ausüben.

Auf Basis dieser Erkenntnisse über die laterale Organisation von Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen wurden zu den bereits vorliegenden QCM-Messungen dynamische Monte Carlo-Simulationen mit einem Algorithmus der zufälligen sequentiellen Adsorption (RSA) auf einer heterogenen Simulationsoberfläche durchgeführt. Diese bestand aus reversiblen Bindungsplätzen, der Matrix, und runden Domänen, auf denen irreversible Bindung möglich war. Aus der Anpassung der Simulationen an die experimentellen Daten ließen sich dann die kinetischen Ratenkonstanten der einzelnen Bindungsschritte ermitteln und Erkenntnisse über die Belegung der Oberfläche und die relative Domänenfläche in Abhängigkeit der Calciumkonzentration und der Inkubationszeit gewinnen.

Bei Inkubationszeiten von 10 und 30 Minuten wurde ein Gleichgewicht in der Belegung erreicht und die irreversibel belegte Fläche stieg von 3.5 % bei 0.01 mM Ca^{2+} auf 20.8 % bei 1.0 mM Ca^{2+} . Gleichzeitig stieg bei gleich bleibender Domänengröße deren Anteil an der Simulationsfläche von 6.5 % auf 33.5 %. Außerdem zeigten die Proteinbelegungen sehr gute Übereinstimmung mit den rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen. Ein Anteil der Domänenfläche von 33.5 % aus den Simulationen und der hohe Belegungsgrad von 38 % in den rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen bei einer Calciumkonzentration von 1.0 mM scheinen im Widerspruch mit der Membranzusammensetzung (POPC/POPS 4:1) zu stehen. Dies kann jedoch damit begründet werden, dass sich POPC und POPS-Moleküle in der Membran nicht vollständig entmischen. In den Domänen sind die POPS-Moleküle lediglich angereichert und es befindet sich noch ein kleiner Teil POPC in diesen Bereichen. Eine Domänenfläche von 35 % wurde auch schon von Janshoff *et al.* in DPPC/DPPS (4:1)-Membranen beobachtet.⁹⁰ Zusätzlich würde die Anwesenheit vereinzelter POPS-Moleküle in der Matrix das reversible Bindungsverhalten der Annexine erklären.

Die Simulationen mit calciumabhängiger Domänengröße lieferten insgesamt die gleichen Ergebnisse für die irreversibel belegte Fläche und die kinetischen Ratenkonstanten,

so dass eventuell ungenaue Annahmen der Domänengrößen aus den SFM-Aufnahmen keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Simulationen haben.

Bei der Betrachtung der kinetischen Ratenkonstanten in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten zeigt sich, dass sowohl die reversible Bindungskonstante K als auch die irreversible Bindungskonstante k_{irr} mit der Calciumkonzentration ansteigen. In der in Abbildung 4.33 dargestellten halblogarithmischen Auftragung dieser beiden Größen gegen die Calciumkonzentration sieht man jedoch deutlich, dass es jeweils zwei Bereiche gibt, in denen die Werte relativ ähnlich sind. So steigt K zwischen 0.01 mM und 0.05 mM Ca^{2+} nur leicht an (von 4.3 auf $7.4 \cdot 10^{-6}$ m) und macht bei einer Erhöhung auf 0.1 mM Ca^{2+} einen Sprung auf $14.0 \cdot 10^{-6}$ m. Eine weitere Erhöhung des Calciumgehalts bewirkt danach lediglich eine Steigerung von K auf $17.1 \cdot 10^{-6}$ m. Die irreversible Bindungskonstante k_{irr} zeigt diesen Sprung zwischen 0.1 und 0.5 mM Ca^{2+} . Hier steigt sie von 5.0 auf $60 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ an.

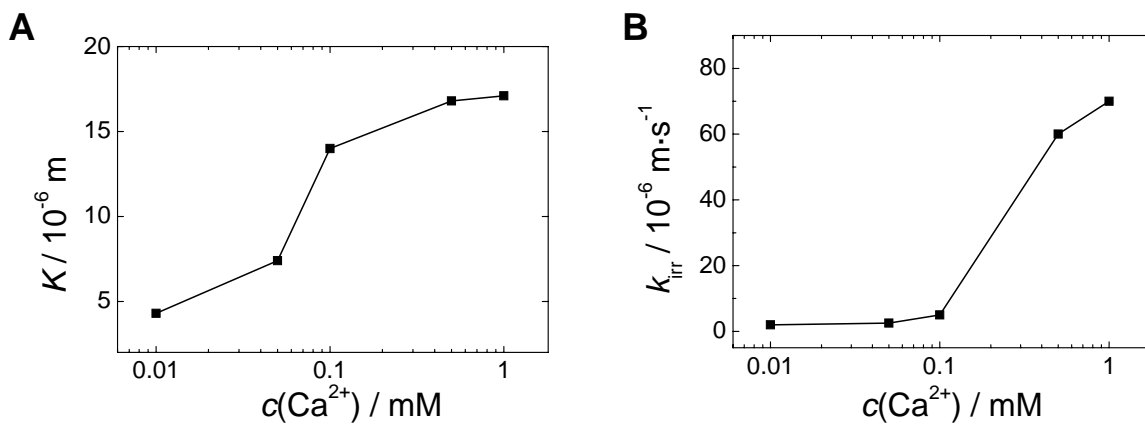


Abbildung 4.33: Abhängigkeit der Bindungskonstanten K (A) und k_{irr} (B) von der Calciumkonzentration in halblogarithmischer Auftragung bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten.

Bei der Bindung von Annexin A1 an die Phospholipidmembran fungieren Calciumionen als Vermittler zwischen negativ geladenen Bindungsstellen am Annexin und den negativ geladenen Serin-Kopfgruppen. Das Annexin A1 besitzt insgesamt acht Bindungsstellen an der membranzugewandten Seite und bindet aufgrund seiner Größe an mehrere Serine gleichzeitig. Die drastische Erhöhung der irreversiblen Bindungskonstante könnte damit zusammenhängen, dass bei kleinen Calciumkonzentrationen nicht alle Bindungsstellen am Annexin A1 belegt sind und die Bindung daher etwas schwächer ist. Dieser Effekt hätte einen kleineren Einfluss auf die reversible Bindung, da hier keine oder nur einzelne Serin-Gruppen an der Bindung beteiligt sind. Insgesamt wird die reversible Bindungskonstante schwächer

von der Calciumkonzentration beeinflusst als die irreversible, da die Bindung nicht so stark ist und die Verbrückung durch die Calciumionen im gesamten Konzentrationsbereich eine geringere Rolle spielt.

Aus den Simulationen zu den QCM-Messungen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigt sich, dass sowohl die reversible und die irreversible Bindung, als auch die Domänenstruktur unabhängig von der Inkubationszeit sind. Die Domänen müssen also schon vor der Proteinzugabe vorhanden sein und wurden auch durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen auf Glimmer nachgewiesen.⁸⁹ Bei den in dieser Arbeit untersuchten Lipidmembranen auf Si/SiO₂ lassen sich diese Domänen aufgrund des geringen Höhenunterschieds von 0.4 nm nicht beobachten, da die Rauigkeit des Substrats wesentlich größer ist als die einer Glimmeroberfläche. Bei der Betrachtung der reversiblen Ratenkonstanten k_{on} und k_{off} fällt jedoch ein Zusammenhang mit der Inkubationszeit auf. Bei langen Inkubationszeiten ab 10 Minuten sinkt die Desorptionsrate, während die reversible Bindungskonstante K gleich bleiben muss, da der Kurvenverlauf der Resonanzfrequenzänderung unabhängig von der Inkubationszeit ist. Einzelne Proteine, die zu Beginn reversibel gebunden sind, scheinen bei langer Inkubationszeit stärker gebunden zu werden, so dass sie beim Spülen mit proteinfreiem Puffer langsamer von der Oberfläche desorbieren. Allerdings bleiben sie isoliert auf der Matrix und gehen nicht in einen irreversibel gebundenen Zustand über, da der irreversible Bindungsanteil sich zwischen 10 Minuten und 30 Minuten nicht mehr ändert.

Das Adsorptionsverhalten bei kurzen Inkubationszeiten unterhalb von 2 Minuten zeigt jedoch eine Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Bei hohen Ca²⁺-Gehalten (0.5 und 1.0 mM) tritt innerhalb der ersten 90 Sekunden ausschließlich irreversible Bindung auf, während bei 0.05 mM Ca²⁺ nach 108 Sekunden schon ein deutlicher reversibler Bindungsanteil zu beobachten ist. Grundsätzlich findet in den ersten Sekunden jedoch ausschließlich irreversible Bindung statt. Bei niedrigen Calciumkonzentrationen ist die Domänenfläche mit 15 % bei 0.05 mM Ca²⁺ jedoch deutlich geringer, so dass die reversible Bindung hier schon nach kurzer Zeit einen größeren Einfluss auf die Adsorptionskurve hat, als bei höheren Calciumkonzentrationen mit Domänenflächen von 33.5 % bei 1.0 mM Ca²⁺.

5 Thermotropes Phasenverhalten von festkörperunterstützten Lipidmembranen

In diesem Kapitel wird das thermotrope Phasenverhalten von mikrostrukturierten festkörperunterstützten Lipidmembranen beschrieben. Als Grundlage dienen Messungen mit einem bildgebenden Ellipsometer, so dass sowohl die Änderung der Membrandicke, als auch die der Membranfläche, als Messgrößen vorliegen. Die Vorteile zu bisher durchgeführten Untersuchungen mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie sind ein geringerer Zeitaufwand für die einzelnen Messungen sowie der nichtinvasive Charakter der ellipsometrischen Untersuchung. Die vertikale Auflösung des Ellipsometers ist mit der eines Rasterkraftmikroskops vergleichbar, die laterale Auflösung mit etwa $1\ \mu\text{m}$ jedoch deutlich geringer. Die verwendeten Membranstrukturen weisen eine Breite von $15\ \mu\text{m}$ und eine Länge von etwa $1\ \text{mm}$ auf, so dass das laterale Auflösungsvermögen für die Auswertung ausreichend ist. Außerdem kann ein $200 \times 300\ \mu\text{m}^2$ großer Bildausschnitt untersucht werden, der damit deutlich größer ist als ein Bildausschnitt eines herkömmlichen Rasterkraftmikroskops.

In den folgenden Kapiteln wird das thermotrope Phasenverhalten von DMPC auf Silizium/Siliziumdioxid diskutiert. Anschließend werden die Abhängigkeiten von dem verwendeten Substrat und der Kettenlänge der Lipidacylketten untersucht und die kooperativen Eigenschaften der Hauptphasenumwandlung sowie die Bestimmung eines Kooperativitätsparameters vorgestellt. Weiterhin wird der Einfluss von Cholesterol auf den temperaturabhängigen Verlauf der Membrandicke und -fläche untersucht und abschließend soll die Bildung einer interdigitierten Phase in DMPC in Anwesenheit von Ethanol nachgewiesen werden.

Für eine Auswertung der ellipsometrischen Daten und die Ermittlung der korrekten Membrandicken ist die Kenntnis der Brechungsindizes im verwendeten System nötig. Daher

wurde im Rahmen dieser Arbeit der Brechungsindex einer festkörperunterstützten mikrostrukturierten DMPC-Membran explizit bestimmt.

5.1 Kooperativität der Hauptphasenumwandlung

Die Hauptphasenumwandlung von der Gelphase zur fluiden Phase in Lipidmembranen weist normalerweise einen mehr oder weniger breiten Übergangsbereich auf und keine fest definierte Temperatur. Die Breite dieses Übergangsbereichs wird durch die Kooperativität der Phasenumwandlung bestimmt. Kooperativität bedeutet, dass der Phasenübergang eines einzelnen Lipids durch den Übergang der benachbarten Moleküle beeinflusst wird. Während der Phasenumwandlung bilden sich zusammenhängende Bereiche in der Membran, in denen alle Moleküle gleichzeitig in die fluide Phase übergehen, während in anderen Bereichen die Lipide noch mit geordneten Ketten vorliegen. Für hochreines DPPC wurden mit hochsensitiver DSC Kooperativitätszellen von mehr als 1000 Molekülen gefunden.⁹³ Marsh *et al.* entwickelten 1976 ein Modell für diesen kooperativen Übergang auf Basis der Zimm-Bragg Theorie für den kooperativen Helix-Knäuel-Übergang.⁹⁴ Dies ermöglicht die Berechnung der Anzahl von Molekülen in den verschiedenen Zuständen im Verlauf des Phasenübergangs. Diese Berechnung wird durch einen Kooperativitätsparameter charakterisiert, der aus der Grenzflächenenergie zwischen den fluiden und den geordneten Bereichen innerhalb eines Phospholipidbilayers resultiert. Er ist außerdem ein Maß für die Breite des Übergangs und die effektive Größe einer Kooperativitätszelle. In diesem Modell werden drei Zustände angenommen, in denen sich ein Lipidmolekül während des Phasenübergangs befinden kann. Der geordnete oder feste Zustand s (solid), der fluide Zustand f und ein Zustand i für Moleküle, die sich gerade im Phasenübergang befinden. Die freien Energien der Lipide in den verschiedenen Zuständen setzt sich aus der inneren Energie eines Moleküls, den intermolekularen van der Waals-Kräften zwischen den Ketten, der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den polaren Kopfgruppen und der Konfigurationsenergie innerhalb einer Kette zusammen. In der Grenzfläche zwischen geordneten und fluiden Bereichen besitzen die Moleküle aufgrund von Packungsfehlstellen eine erhöhte innere Energie, so dass dieser Zustand energetisch ungünstiger ist. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Abnahme der attraktiven van der Waals-Kräfte nicht durch den Gewinn an Konfigurationsentropie kompensierbar ist. Diese Grenzflächenenergie bewirkt daher eine Reduzierung der Anzahl an Lipiden in der Grenzfläche und führt somit zur Kooperativität.

Anwendung der statistischen Mechanik für Kettenmoleküle nach Flory⁹⁵ führt zur Definition des Kooperativitätsparameters σ als

$$\sigma = \exp(-F_i / RT) \quad (5.1)$$

mit der Grenzflächenenergie F_i und dem statistischen Gewicht von Molekülen in der fluiden Phase, die auch ausschließlich von fluiden Molekülen umgeben sind

$$\phi = \exp(-F_f / RT) \quad (5.2)$$

mit deren freier Energie F_f bezogen auf die freie Energie der Moleküle im geordneten Zustand. Der Anteil an Molekülen θ in der fluiden Phase kann ausgedrückt werden als

$$\theta = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{\phi - 1}{\sqrt{(\phi - 1)^2 + 4\sigma\phi}} \right]. \quad (5.3)$$

Der Mittelpunkt des Phasenübergangs ist dann durch $\theta = 0.5$ definiert, außerdem gilt noch $\phi = 1$. Im Bereich um diesen Mittelpunkt kann die Temperaturabhängigkeit von ϕ in einer Taylorreihe entwickelt werden, so dass für $\phi = 1$ gilt:

$$\phi = 1 + \frac{\Delta H_{\text{cal}}}{RT_m^2} (T - T_m) \quad (5.4)$$

mit der molaren Phasenübergangsenthalpie ΔH_{cal} und der Phasenübergangstemperatur T_m . Die Breite der Phasenumwandlung kann aus (5.3) und (5.4) berechnet werden:

$$\Delta T_m = 2\sqrt{\sigma} \frac{RT_m^2}{|\Delta H_{\text{cal}}|}. \quad (5.5)$$

Aus Gleichung (5.5) ist deutlich ersichtlich, dass σ ein Parameter für die Kooperativität ist. Es gilt:

$\sigma < 1$: Kooperativität

$\sigma = 1$: keine Kooperativität

$\sigma > 1$: negative Kooperativität.

Je kleiner σ , desto größer ist die Kooperativität und desto schmaler der Phasenübergang. Unter der Annahme, dass der Übergang aus der Gelphase in die flüssige Phase eine Reaktion pseudo-erster Ordnung mit der Gleichgewichtskonstanten $K = \frac{\Theta}{(1-\Theta)}$ ist, kann Gleichung (5.5) in ihrer van't Hoff – Form dargestellt werden. Es ergibt sich dann folgender Zusammenhang:

$$\Delta H_{\text{vH}} = \frac{\Delta H_{\text{cal}}}{\sqrt{\sigma}}. \quad (5.6)$$

Die Temperaturabhängigkeit des Grades des Phasenübergangs ist dann gleichbedeutend mit einem gleichzeitigen Phasenübergang von $n = 1/\sqrt{\sigma}$ Molekülen. Die Größe $n = 1/\sqrt{\sigma}$ kann auch als die Anzahl der Moleküle in einer Kooperativitätszelle interpretiert werden und ist direkt mit der mittleren Größe der Bereiche im geordneten und fluiden Zustand korreliert.^{94,96} Nach Differenzierung von Gleichung (5.3) unter Verwendung von Gleichung (5.4) ergibt sich im Bereich der Phasenumwandlung:

$$\left. \frac{d\theta}{dT} \right|_{T_m} = \frac{1}{4\sqrt{\sigma}} \cdot \frac{\Delta H_{\text{cal}}}{RT_m^2}. \quad (5.7)$$

Durch Auftragung von θ gegen $1/T$ ergibt sich um den Mittelpunkt der Phasenumwandlung ein linearer Verlauf mit der Steigung

$$m = -\frac{\Delta H_{\text{cal}}}{4R \cdot \sqrt{\sigma}}. \quad (5.8)$$

Aus experimentellen Daten lässt sich dann bei bekannter Phasenumwandlungsenthalpie der Kooperativitätsparameter σ bestimmen.

5.2 Bestimmung des Brechungsindex eines mikrostrukturierten festkörperunterstützten DMPC-Bilayers

In der Literatur findet man für die Bestimmung der Brechungsindizes von Lipidlayern eine Vielzahl von Methoden, die außerdem unterschiedliche Ergebnisse liefern. Untersuchungen von Lipidmonolagen an der Wasser-Luft-Grenzfläche mit Hilfe der Null-Ellipsometrie und

der Brewsterwinkel-Mikroskopie wurden ebenso durchgeführt wie ATIR-Messungen an Luft und in wässrigem Medium.^{57,58,97-99} Eine neuere Methode ist die optische Lichtleiter-Spektroskopie (OWLS und CPWR), die unter anderem zur Untersuchung der optischen Anisotropie in Lipidmembranen verwendet wurde.^{100,101} Die untersuchten Systeme weisen jedoch Unterschiede in der Präparation und der Hydratation der Lipidlayer auf, wodurch auch die vielfältigen Ergebnisse erklärt werden können. So findet man in der Literatur Werte zwischen 1.4 und 1.5 für die Brechungsindizes von Lipidmembranen.^{97,102} Die spezielle Präparationsart des Vesikelspreitens in Kapillaren zur Erzeugung mikrostrukturierter Lipidmembranen weist jedoch einige Besonderheiten auf, die eine getrennte Bestimmung des Brechungsindex nahe legen. Außerdem sind eine Reihe von SFM - Messungen vorhanden, die als Höhenstandard für die Brechungsindex-Bestimmung verwendet werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der spektroskopischen Ellipsometrie verwendet, um den Brechungsindex von mikrostrukturierten DMPC - Bilayern auf einer Siliziumdioxid - Oberfläche zu bestimmen. Dazu wurde eine Probe im Wellenlängenbereich von 480 - 580 nm untersucht und die erhaltenen Verläufe von Delta und Psi mit zwei unterschiedlichen Modellen analysiert. Der Brechungsindex wurde einmal als unabhängig und einmal abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichts angenommen. Für die Wellenlängenabhängigkeit wurde das Cauchy-Modell bis n_2 (s. Gleichung (2.9)) gewählt:

$$n(\lambda) = n_1 + \frac{n_2}{\lambda^2}. \quad (5.9)$$

Da Brechungsindex und Schichtdicke stark korreliert sind, wurde für die Schichtdicke ein durch SFM - Messungen bestimmter Wert von 4.3 nm angenommen. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Die Anpassung der Modelle an die experimentellen Daten liefert $n = 1.533 \pm 0.008$ für das wellenlängenunabhängige Modell und $n_1 = 1.518 \pm 0.010$ und $n_2 = 4050 \pm 1080 \text{ nm}^2$ für das Cauchy-Modell. Für das Cauchy-Modell ergibt sich damit ein Brechungsindex bei der verwendeten Laserwellenlänge von 532 nm $n_{532 \text{ nm}} = 1.532 \pm 0.010$. Man erhält somit für beide Modelle das gleiche Ergebnis für den Brechungsindex.

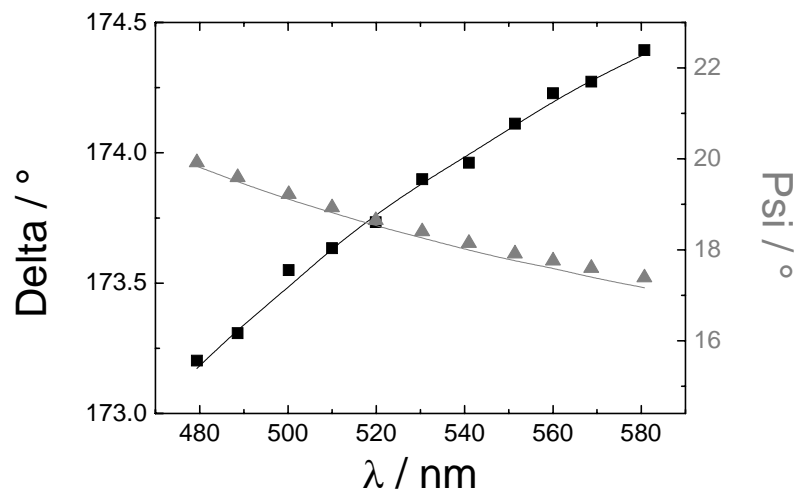


Abbildung 5.1: Verlauf der ellipsometrischen Winkel Delta (■) und Psi (▲) in Abhängigkeit von der Wellenlänge für mikrostrukturierte DMPC-Bilayer mit der entsprechenden Anpassung nach Cauchy.

5.3 Untersuchung des thermotropen Phasenverhaltens von DMPC

Die Hauptphasenumwandlung ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) von DMPC wird in der Literatur mit $T_m = 23.6 \pm 1.5$ °C und einer Phasenumwandlungsenthalpie von $\Delta H_{cal} = 6.0 \pm 2.4$ $\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ angegeben.⁸⁵ Die Hauptphasenumwandlung einer Lipidmembran ist verbunden mit einer Schichtdickenerniedrigung um 0.5 - 1.1 nm und einer lateralen Flächenausdehnung um 24 %.^{100,103} Mit Hilfe der bildgebenden Ellipsometrie können diese beiden Effekte simultan in einem einzelnen Experiment untersucht werden. Dazu wurde ein einzelner Lipidstreifen auf einem Si/SiO₂ - Substrat präpariert und die Schichtdicke sowie die relative Fläche dieses Lipidstreifens in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Abbildung 5.2 zeigt die aus den aufgenommenen „Delta-Maps“ berechneten Schichtdickenbilder bei verschiedenen Temperaturen. Die obere Reihe wurde während des Heizprozesses aufgenommen, die untere Reihe stellt die gleiche Probe während des Abkühlens dar. Bei 14.1 °C ist ein scharf abgegrenzter Lipidstreifen mit einer Breite von 15 μm und einer mittleren Höhe von 4.5 nm zu erkennen. Mit zunehmender Temperatur sinkt die Bilayerdicke und die Breite des Lipidstreifens steigt auf etwa 20 μm . Außerdem sind ab 37.5 °C Unregelmäßigkeiten an den

Rändern der Membran zu erkennen, der Bilayer dehnt sich also nicht vollkommen gleichmäßig aus. Beim Abkühlen der Probe steigt die Schichtdicke wieder an und die Membran zieht sich wieder zusammen, so dass bei 13.1 °C der Ausgangszustand wieder hergestellt ist. Außerdem ist zu erkennen, dass die Form des Lipidstreifens nach dem Aufheizen und Abkühlen und dem damit verbundenen Übergang der Lipide aus der Gelphase in die fluide Phase und zurück in die Gelphase nicht verändert wird. Der Bereich des ursprünglichen Streifens scheint somit ein bevorzugter Aufenthaltsort der Lipidmoleküle zu sein. Dies lässt sich durch den Einfluss von geringen Unterschieden in der Oberflächenbeschaffenheit erklären.

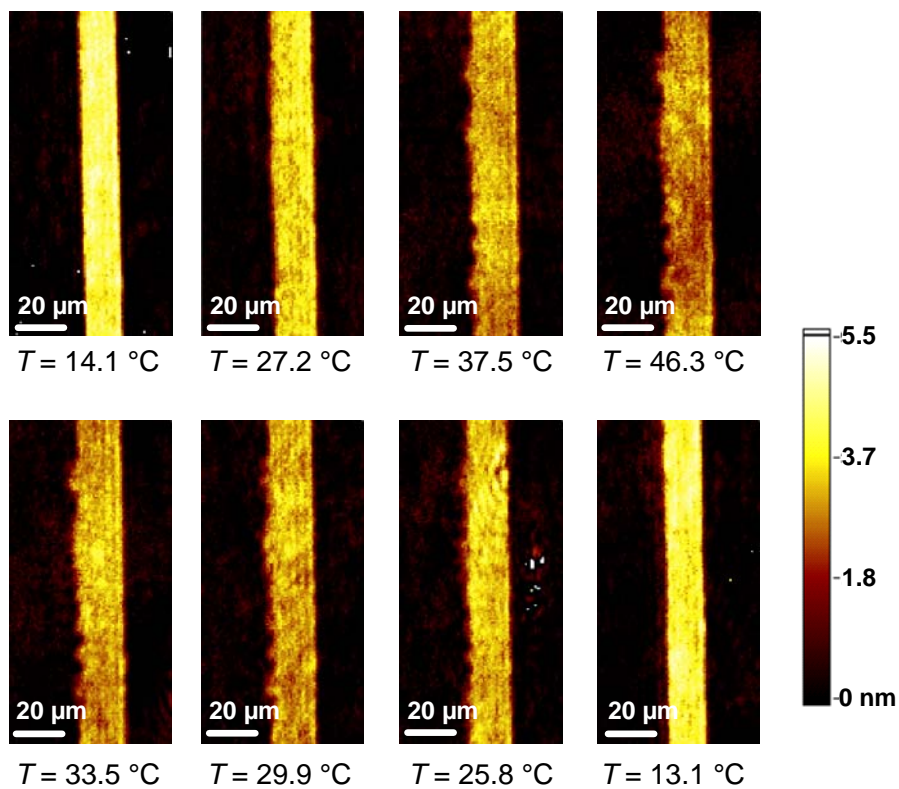


Abbildung 5.2: Ortsaufgelöste Schichtdickeninformation eines DMPC-Streifens auf Si/SiO₂ bei verschiedenen Temperaturen. Die Größe der Bilder beträgt 70×140 µm².

In Abbildung 5.3 sind die typischen Verläufe der Schichtdicke und der relativen Flächenänderung mit der Temperatur dargestellt. Die vollen Symbole zeigen jeweils den Heizzyklus und die offenen Symbole den Abkühlprozess. Die Werte für die Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m ergeben sich aus einem empirischen sigmoidalen Fit

nach Gleichung (5.10), der in den Abbildungen als durchgezogene, bzw. gestrichelte Linie dargestellt ist:

$$y(T) = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left(\frac{T - T_m}{dT}\right)}. \quad (5.10)$$

Hierbei bezeichnet y die Schichtdicke, bzw. den Flächenanteil der Membran, A_1 den Wert dieser Größe bei niedrigen und A_2 den Wert bei hohen Temperaturen. T_m ist die Temperatur im Mittelpunkt zwischen A_1 und A_2 und dT ist ein Maß für die Steilheit des Übergangs von A_1 nach A_2 . Die Schichtdicke d sinkt von 4.5 nm bei 12.4 °C auf 3.1 nm bei $T \geq 37.5$ °C. Dies entspricht einer Reduzierung um 31 %. Die Hauptphasenumwandlungstemperatur beträgt $T_m = 25.0 \pm 0.3$ °C. Beim Abkühlen der Probe steigt die Schichtdicke wieder auf 4.3 nm bei 10.0 °C an, der Prozess ist fast vollständig reversibel. Allerdings ist zwischen Heiz- und Kühlzyklus eine Hysterese zu beobachten. Für den Kühlzyklus wird $T_m = 22.9 \pm 0.6$ °C bestimmt, die Abkühlkurve ist um etwa 2 °C zu kleineren Temperaturen verschoben. Dieses Verhalten wurde auch bei Untersuchungen der thermotropen Phasenumwandlung mit Hilfe von temperaturkontrollierten SFM-Messungen gefunden.^{103,104} Auffällig ist der breite Temperaturbereich der Phasenumwandlung von 12 °C, der auf eine verringerte Kooperativität des Übergangs im Vergleich zu vesikulären Systemen schließen lässt (siehe Kapitel 5.1 und 5.9).

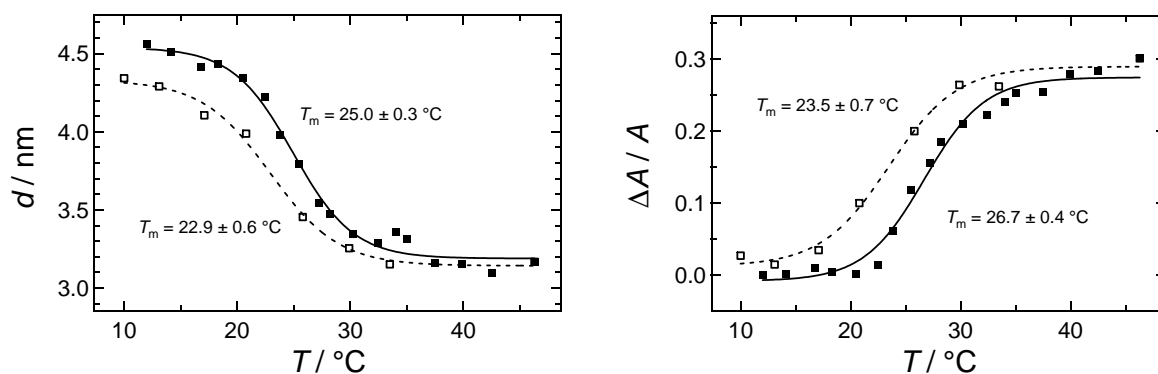


Abbildung 5.3: Verlauf der Schichtdicke d und der normierten Membranfläche $\Delta A/A$ eines strukturierten DMPC-Bilayers auf Si/SiO₂ mit steigender (■) und sinkender (□) Temperatur. Die angegebenen Phasenumwandlungstemperaturen sind Ergebnisse der sigmoidalen Anpassung.

Die relative Flächenänderung des Bilayers mit der Temperatur zeigt das gleiche Verhalten wie die Schichtdicke. Sie folgt ebenfalls einem sigmoidalen Verlauf und die Phasenumwandlungstemperatur lässt sich aus der Heizkurve zu $T_m = 26.7 \pm 0.4$ °C

bestimmen. Die Abkühlkurve ist um etwa 3 °C zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Die Flächenausdehnung beträgt nach dem Phasenübergang 30 % bei 46.3 °C und weist nach dem Abkühlen fast vollständig reversibles Verhalten auf, bei $T \leq 17.1$ °C weicht die Fläche nur um 3 % von der ursprünglichen Fläche zu Beginn des Experiments ab.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Messungen des thermotropen Phasenübergangsverhaltens von DMPC durchgeführt. Für die Auswertung wurden nur die Daten während des Aufheizens der Probe verwendet. Der Mittelwert der Hauptphasenumwandlungstemperatur beträgt aus 12 Messungen der Schichtdicke $T_m(\Delta d) = 26.2 \pm 1.6$ °C und aus 11 Messungen der Flächenänderung $T_m(\Delta A) = 27.0 \pm 2.3$ °C. Der Temperaturbereich der Phasenumwandlung beträgt $\Delta T_m = 11-15$ °C.

5.4 Abhängigkeit des Phasenverhaltens von der Oberfläche

Um zu überprüfen, ob das Phasenverhalten von festkörperunterstützten Lipidmembranen vom Substrat abhängig ist, wurden ergänzend zu den Messungen auf Si/SiO₂ spezielle Glasträger der Firma Nanofilm, so genannte Optislides, als Substrat verwendet. Diese bestehen aus einem Standard BK7-Objektträger, die mit einer hoch reflektierenden Schicht Ta₂O₅ und zusätzlich mit einer Schicht SiO₂ bedampft wurden. Der Aufbau ist in Abbildung 2.9 schematisch dargestellt.

5.4.1 Charakterisierung der Optislides

Die Charakterisierung des Optislides erfolgte durch winkelabhängige Messungen der ellipsometrischen Parameter Delta und Psi an Luft. Der Einfallswinkel wurde zwischen 50 ° und 70 ° variiert. Es wurden zwei Optislides untersucht. Optislide 1 wurde mit Isopropanol und viel Reinstwasser gespült, was dem Zustand vor der Hydrophilisierung entspricht, Optislide 2 wurde in NH₃:H₂O₂:H₂O (1:1:5) bei 70 °C behandelt. Diese Behandlung wurde

bei den für die Erzeugung mikrostrukturierter Lipidmembranen verwendeten Optislides durchgeführt.

Abbildung 5.4 A zeigt die Verläufe der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi in Abhängigkeit vom Einfallswinkel für ein Optislide vor (1) und nach (2) der Hydrophilisierung. Die Anpassung der Schichtdicken der beiden Layer an die experimentellen Daten ergab die in Abbildung 5.4 B zusammengefassten Ergebnisse.

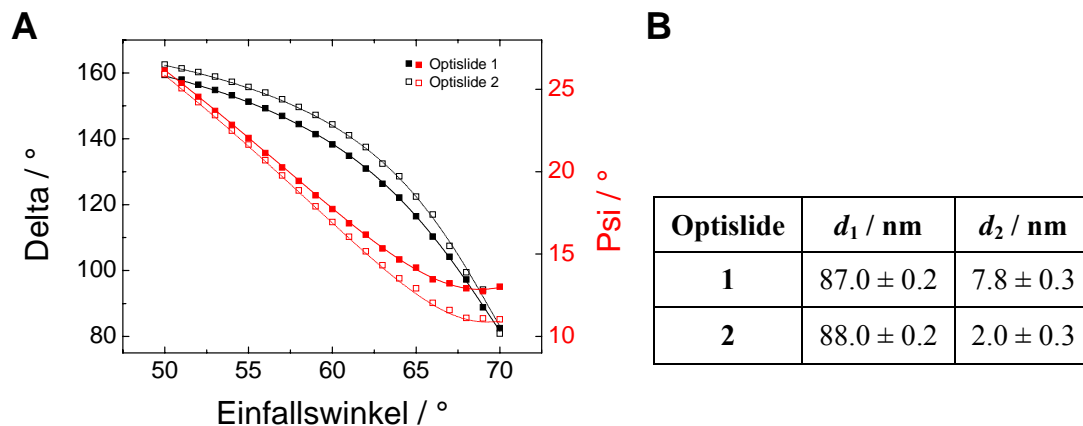


Abbildung 5.4: A) Abhängigkeit der ellipsometrischen Winkel Delta (■, □) und Psi (■, □) vom Einfallswinkel vor (Optislide 1) und nach (Optislide 2) der Hydrophilisierung der Oberfläche. Linien sind Ergebnisse der Anpassung des optischen Modells für variierende Schichtdicken d_1 und d_2 an die experimentellen Daten. B) Aus A) resultierende Schichtdicken für ein Optislide vor (1) und nach (2) der Hydrophilisierung.

Die innen liegende Ta₂O₅-Schicht wird durch die Oberflächenbehandlung nicht beeinflusst, die Schichtdicke liegt bei 87 – 88 nm. Allerdings wird die außen liegende SiO₂-Schicht durch die Hydrophilisierung von 7.8 nm auf 2.0 nm reduziert.

5.4.2 Untersuchung des Hauptphasenumwandlung von DMPC auf Optislides

In Abbildung 5.5 sind die Verläufe der Schichtdicke und der Flächenänderung eines DMPC-Lipidstreifens mit der Temperatur dargestellt. Die Messung auf einem Optislide zeigt sowohl in der Schichtdicke als auch der Flächenausdehnung einen sigmoidalen Verlauf mit einer Hauptphasenumwandlungstemperatur von $T_m = 25.2$ °C und einem Übergangsbereich von etwa 10 °C. Die Bilayerdicke sinkt um 33 %, während die Flächenausdehnung bei 33.7 °C

23 % beträgt. Der Vergleich mit einer Messung von DMPC auf Si/SiO₂ zeigt, dass sich Schichtdicke und Fläche unabhängig vom Substrat mit der Temperatur verändern.

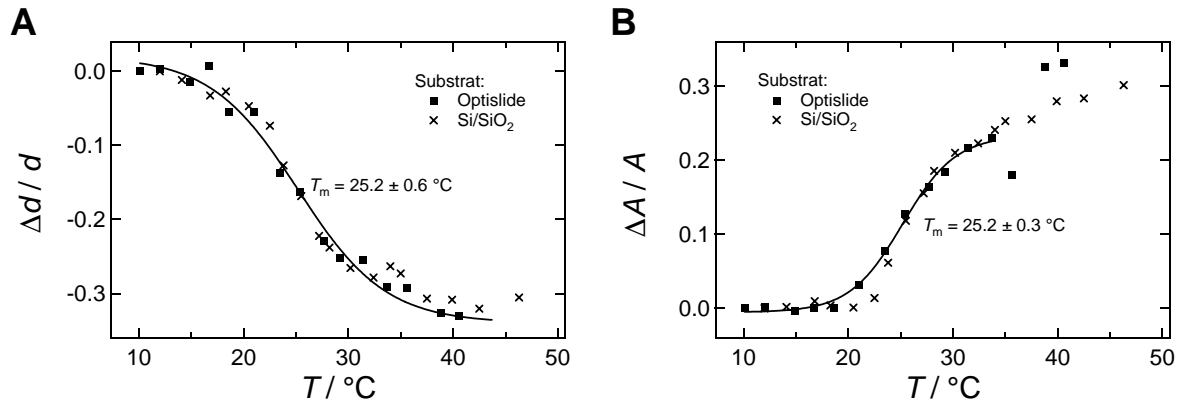


Abbildung 5.5: Vergleich der normierte Verläufe der Schichtdicke (A) und der Membranfläche (B) eines DMPC-Streifens mit der Temperatur auf einem Optislide mit einem Si/SiO₂-Substrat.

Der thermotrope Phasenübergang von DMPC wird somit nicht davon beeinflusst, ob die darunter liegende SiO₂-Schicht durch chemische Oxidation von Silizium oder durch Aufdampfen auf einen Ta₂O₅-Layer erzeugt wurde. Allerdings ist der Anwendungsbereich der Optislides beschränkt, da sich bei höheren Temperaturen (ab ca. 40 °C) Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche bildeten. Die „Delta-Map“ eines DMPC-Streifens bei 40.6 °C (Abbildung 5.6 B) zeigt starke Kontrastunterschiede auf dem Substrat, die eine korrekte Bestimmung der Membranschichtdicke und der Ausdehnung erschweren. Auch bei anschließender Erniedrigung der Temperatur bleiben diese Unregelmäßigkeiten erhalten. Ellipsometrie-Messungen auf herkömmlichen BK7-Glasträger sind im Allgemeinen sehr schwer durchzuführen, da die Reflektivität sehr gering ist und sich der Brechungsindex nur wenig von biologischen Materialien unterscheidet ($n_{\text{BK7}} = 1.528$). Eine Alternative bieten jedoch stärker brechende Glasarten, wie z. B. Schwerflint ($n_{\text{SF10}} = 1.73$).

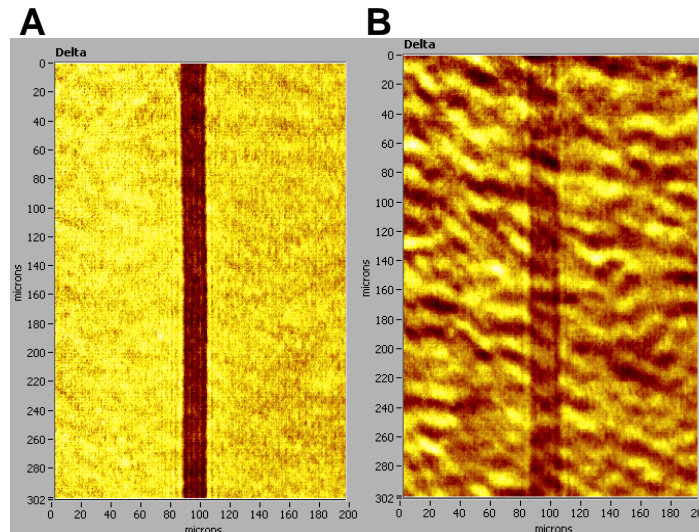


Abbildung 5.6: „Delta-Map“ eines DMPC-Lipidstreifens auf einem Optislide bei A) $T = 21.0\text{ °C}$, B) $T = 40.6\text{ °C}$.

5.5 Abhängigkeit des Phasenübergangsverhaltens von der Kettenlänge

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden außer DMPC noch festkörperunterstützte Bilayer aus diC₁₅PC und DPPC auf ihr thermotropes Phasenverhalten untersucht. Diese Lipide besitzen längere Kohlenwasserstoffketten und weisen daher eine höhere Phasenumwandlungstemperatur auf. In der Literatur findet man $T_m = 33.7 \pm 0.8\text{ °C}$ für diC₁₅PC und $T_m = 41.3 \pm 1.8\text{ °C}$ für DPPC. Der benötigte Temperaturbereich bis etwa 65 °C ist für die Methode der bildgebenden Ellipsometrie noch zugänglich.

Abbildung 5.7 zeigt die Verläufe der Schichtdicke sowie die normierte Schichtdicke und die Flächenausdehnung des untersuchten Lipidstreifens mit der Temperatur von DMPC, diC₁₅PC und DPPC. Unterhalb der Phasenumwandlung steigt die Schichtdicke mit der Kettenlänge von 4.5 nm für C₁₄ über 5.0 nm für C₁₅ auf 5.4 nm für C₁₆. Oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur weisen alle Lipidsysteme eine Schichtdicke von 3.1 - 3.4 nm auf. In der Gelphase erhöhen längeren Ketten aufgrund ihrer all-trans Konformation die Dicke des Bilayers. In der fluiden Phase wird der Einfluss der längeren Kohlenwasserstoffketten auf die Schichtdicke durch die erhöhte Mobilität der Ketten und die schnellere Isomerisierung der C-C-Bindungen eliminiert. Während sich die Schichtdicke bei DMPC um 31 % verringert, so beträgt dieser Wert für diC₁₅PC schon 35 % und für DPPC 40 % (Abbildung 5.7 B). Die

Phasenumwandlungstemperatur steigt wie erwartet mit der Kettenlänge von 25.0 °C für DMPC auf 37.4 °C für diC₁₅PC und 46.8 °C für DPPC. Der Übergangsbereich der Phasenumwandlung sinkt mit der Kettenlänge von 10 °C für DMPC auf etwa 7 °C für diC₁₅PC und etwa 4 °C für DPPC. Eine direkte Aussage über die Kooperativität lässt sich daraus jedoch nicht machen, da die Übergangsenthalpie ebenfalls von der Kettenlänge abhängt. Eine detaillierte Betrachtung der Kooperativität folgt in Kapitel 5.6. Die Analyse der Flächenausdehnung ergibt Phasenumwandlungstemperaturen von 26.7 °C für DMPC, 37.8 °C für diC₁₅PC und 46.1 °C für DPPC. Diese sind vergleichbar mit den Werten, die aus der Analyse der Schichtdickenänderung erhalten wurden. Die Flächenausdehnung zeigt jedoch eine geringe Abhängigkeit von der Kettenlänge der Lipide. Sie beträgt 30 % für DMPC, 37 % für diC₁₅PC und 33 % für DPPC. Die Analyse der Flächenausdehnung ist jedoch stärker fehlerbehaftet und kann durch das Vorhandensein von Restvesikeln auf dem Bilayer, die bei Temperaturerhöhung aufreißen und spreiten, verfälscht werden (s. Fehlerdiskussion). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse und ein Vergleich mit Literaturdaten folgen in Kap. 5.9.

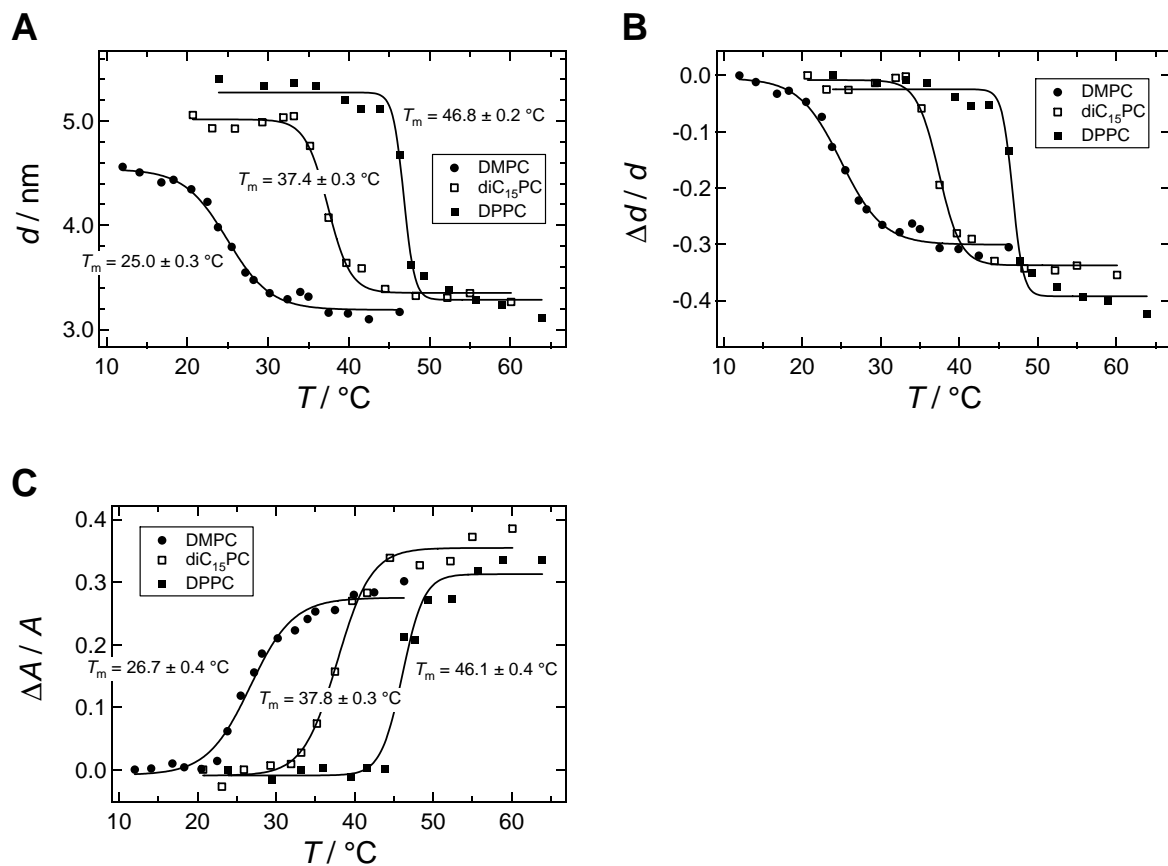


Abbildung 5.7: Vergleich der temperaturabhängigen Schichtdicke (A), der normierten Schichtdicke (B) und der Bilayerausdehnung (C) von DMPC (●), diC₁₅PC (□) und DPPC (■). Die angegebenen Phasenumwandlungstemperaturen sind die Ergebnisse der sigmoidalen Anpassungen (—).

5.6 Bestimmung der Kooperativität der Hauptphasenumwandlung

Der Kooperativitätsparameter σ kann nach Gleichung (5.7) ermittelt werden, wobei θ der Anteil der Moleküle in der fluiden Phase ist. Aus den durchgeführten Messungen mit dem bildgebenden Ellipsometer liegen die temperaturabhängigen Verläufe der Membrandicke und –fläche vor. Um aus diesen Größen den Kooperativitätsparameter σ und damit die Größe der Kooperativitätszelle n bestimmen zu können, wird davon ausgegangen, dass weit unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur keine Moleküle in der fluiden Phase vorliegen ($\theta=0$) und weit oberhalb sich alle Moleküle in der fluiden Phase befinden ($\theta=1$). Für die Auswertung wurden die experimentellen Daten für Schichtdicke und Membranfläche zwischen 0 und 1 normiert und gegen $1/T$ aufgetragen. Anschließend wurde bei $T = T_m$ die Steigung m ermittelt. Abbildung 5.8 zeigt die entsprechenden Kurven für die drei verwendeten Lipidsysteme und die lineare Anpassung im Bereich des Mittelpunkts der Phasenumwandlung T_m .

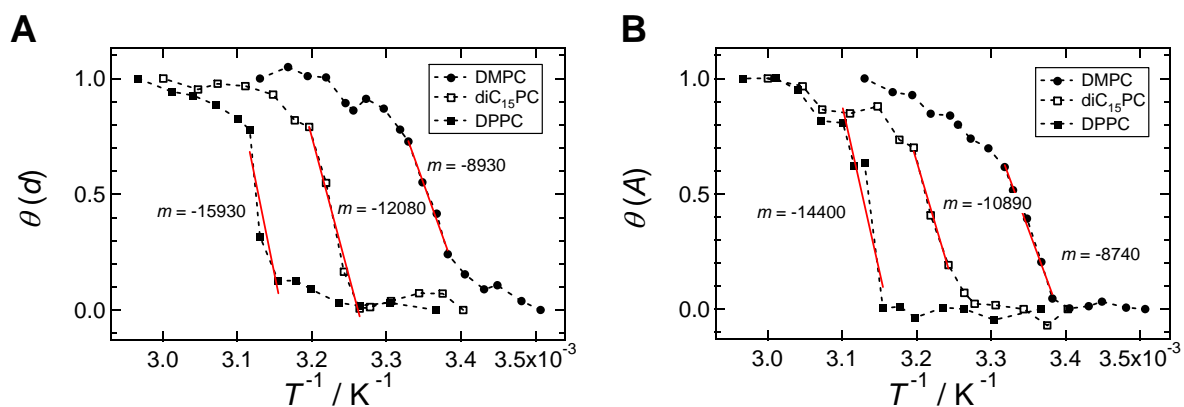


Abbildung 5.8: Anteil der Moleküle in der fluiden Phase während der Phasenumwandlung als Funktion von $1/T$ für DMPC (\bullet), diC₁₅PC (\square) und DPPC (\blacksquare). A) Auswertung der Membrandicke, B) Auswertung der Membranfläche. Die linearen Fits um T_m sind in rot dargestellt.

Der Kooperativitätsparameter σ ist nach Gleichung (5.8) gegeben durch:

$$\sigma = \left(-\frac{\Delta H_{\text{cal}}}{4R \cdot m} \right)^2 \quad (5.11)$$

und die Größe der kooperativen Einheitszelle ist gleich:

$$n = \frac{1}{\sqrt{\sigma}} = \frac{4R \cdot m}{\Delta H_{\text{cal}}} \quad (5.12)$$

Die Auswertung der durchgeführten Messungen führt zu den in Tabelle 11 zusammengefassten Ergebnissen für den Kooperativitätsparameter σ und die Größe der kooperativen Einheitszelle n .

Tabelle 11: Kooperativitätsparameter σ und Größe der kooperativen Einheitszelle n für DMPC, diC₁₅PC und DPPC.

	DMPC	diC₁₅PC	DPPC
Steigung m / K	-7390 ± 1860	-11950 ± 1270	-17160 ± 2490
ΔH_{cal} / kJ/mol⁸⁵	25.1 ± 10.0	31.8 ± 2.9	34.3 ± 5.9
σ	0.0104 ± 0.0098	0.0064 ± 0.0018	0.0036 ± 0.0016
n	10 ± 5	12 ± 2	17 ± 4

5.7 Phasenverhalten von DMPC/Cholesterol - Gemischen

5.7.1 Grundlagen

Neben den Phospholipiden sind Sterole ein wichtiger Baustein im Aufbau der Zellmembranen von Eukaryonten. Ihr Anteil beträgt in den Plasmamembranen 20 - 40 mol%, während Prokaryonten keinerlei Sterole in den Zellmembranen aufweisen. Für Säugetiere ist Cholesterol das wichtigste Sterol, während in Pflanzen das Phytosterol und in Pilzen Ergosterol vorkommt.

Cholesterol besitzt wie die Phospholipide einen amphiphilen Charakter. Das Gonan-Gerüst bildet zusammen mit mehreren Kohlenwasserstoffketten den hydrophoben Bereich, eine Hydroxyl-Gruppe den hydrophilen (Abbildung 5.9 A). Diese hydrophile Gruppe ist wesentlich kleiner als die polaren Kopfgruppen der Phospholipide. Daher sind Cholesterol-

Moleküle hauptsächlich im hydrophoben Innenbereich einer Phospholipidmembran positioniert (Abbildung 5.9 B).

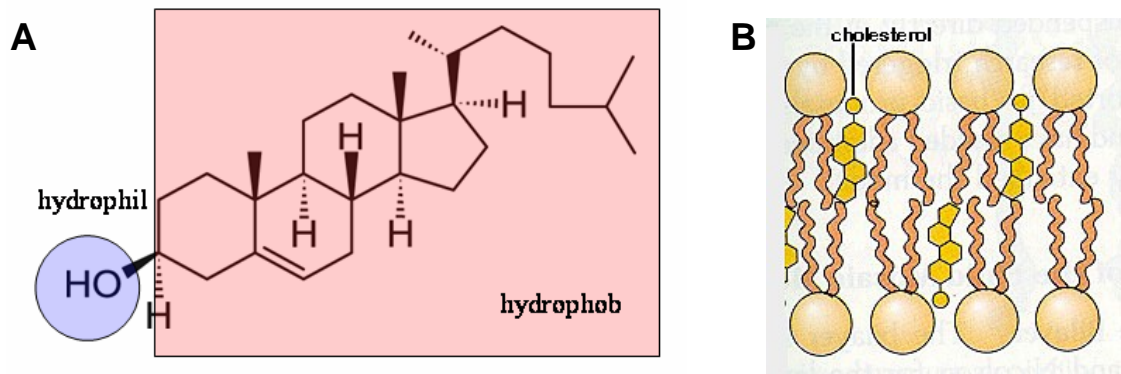


Abbildung 5.9: A) Strukturformel von Cholesterol mit hydrophilem und hydrophobem Bereich. B) Orientierung von Cholesterol in einer Lipidmembran.

Das allgemeine Phasendiagramm einer Phosphatidylcholin-Membran mit Cholesterol ist in Abbildung 5.10 dargestellt und weist einige bedeutende Eigenschaften auf.¹⁰⁵ Bei niedrigen Cholesterolgehalten zeigt sich eine geringe Gefrierpunktniedrigung, während bei hohen Cholesterolgehalten eine neue Phase auftritt, die erstmals von Ipsen *et al.* vorgeschlagen wurde.¹⁰⁶ Diese wird als geordnete fluide Phase bezeichnet, da sie einerseits Eigenschaften einer fluiden Phase aufweist (fehlende laterale Fernordnung und schnelle laterale Diffusion), sich andererseits durch eine hohe konformative Ordnung innerhalb der Kohlenwasserstoffketten auszeichnet (Abbildung 5.11).

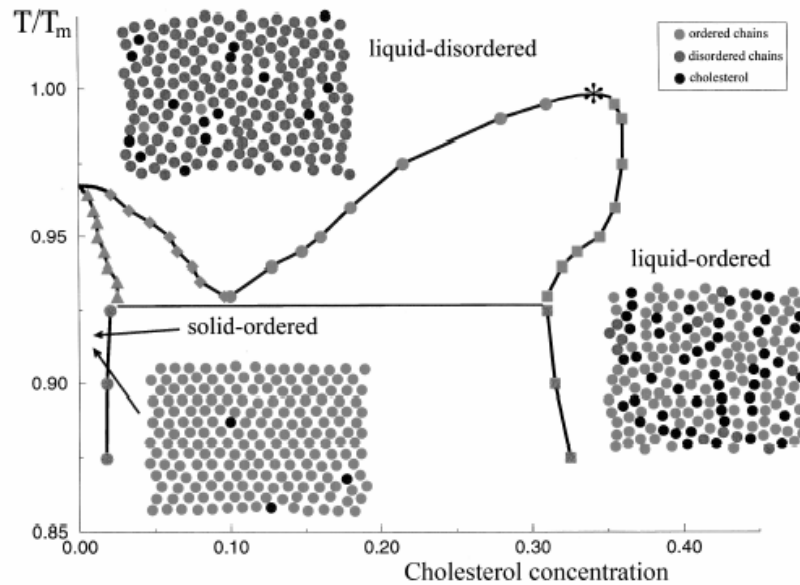


Abbildung 5.10: Allgemeines Phasendiagramm für Lipidmembranen aus Phosphatidylcholinen und Cholesterol. Die laterale Struktur und Organisation der Membranen bestehend aus geordneten und ungeordneten Lipidketten sowie Cholesterol ist schematisch dargestellt. Der kritische Punkt ist durch einen Stern markiert. Die Cholesterol-Konzentration ist in mol% angegeben. T = Temperatur, T_m = Phasenübergangstemperatur.¹⁰⁵

Dies ist einzigartig für Cholesterol und andere höhere Sterole und hat große Auswirkungen auf das Verhalten von Lipidmembranen beim Phasenübergang. Oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur resultiert die erhöhte Ordnung der Acylketten in einer Erhöhung der Membrandicke. Unterhalb der Phasenumwandlung ist der Effekt dieser ordnenden Eigenschaft jedoch gering, da die Ketten größtenteils all-trans Konformation aufweisen und daher schon stark geordnet sind. Durch die Inkorporation von Cholesterol in Lipidmembranen wird der Übergang von der Gelphase in die fluide Phase verbreitert und die Übergangsenthalpie reduziert. Bei 50 mol% Cholesterol ist das typische Phasenübergangsverhalten von Lipiden nicht mehr vorhanden. Zusätzlich wird die Querschnittsfläche der Lipidmoleküle in der fluiden Phase erniedrigt und in der Gelphase erhöht, so dass die Flächenausdehnung bei hohen Temperaturen vermindert wird.

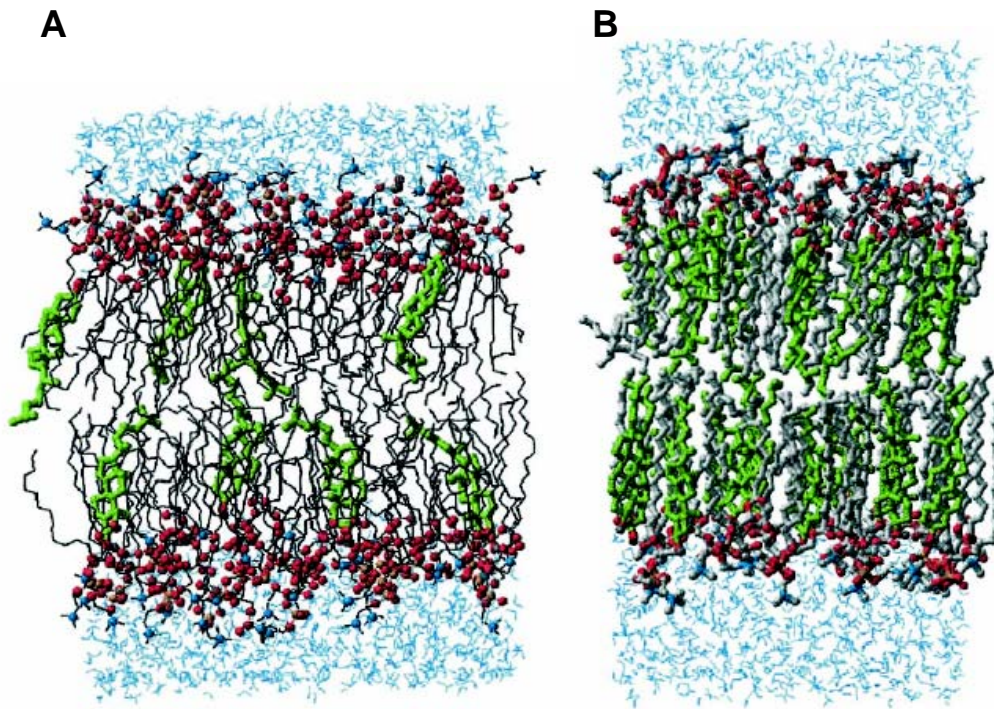


Abbildung 5.11: Ausschnitt aus einer DPPC-Membran mit A) 11 mol% Cholesterol und B) 50 mol% Cholesterol. Die Cholesterol-Moleküle sind in grün dargestellt.¹⁰⁷

5.7.2 Experimente

Zur Untersuchung des Phasenübergangsverhaltens von DMPC/Cholesterol - Gemischen mit Hilfe der bildgebenden Ellipsometrie wurden Proben auf Si/SiO₂ präpariert, die nebeneinander einen Lipidstreifen aus reinem DMPC und einen Lipidstreifen mit einem DMPC/Cholesterol - Gemisch enthielten. Anschließend wurden die Schichtdicke und die Membranfläche in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. In Abbildung 5.12 sind die Schichtdicken-Bilder zweier Lipidmembranstreifen aus DMPC mit 0 % (links) und 40 mol% Cholesterol (rechts) bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Alle Bilder sind 125×140 μm² groß, der weiße Strich bezeichnet die Stelle, an der die Profile aufgenommen wurden. Während mit steigender Temperatur die Schichtdicke der DMPC-Membran von 4.7 nm bei 15.6 °C auf 3.0 nm bei 51.1 °C stark abnimmt, verändert sich die Höhe des DMPC/Cholesterol - Bilayers nur leicht von 4.6 nm auf 4.1 nm. Bei $T = 29.4$ °C (C) sind bei der DMPC-Membran laterale Protrusionen zu erkennen, die sich mit steigender Temperatur weiter vergrößern. Außerdem erhöht sich die Breite des Streifens mit Temperatur von 15 μm auf 20 μm, während der DMPC/Cholesterol-Streifen nur eine sehr geringe Ausdehnung zeigt und in seiner Form stabil bleibt.

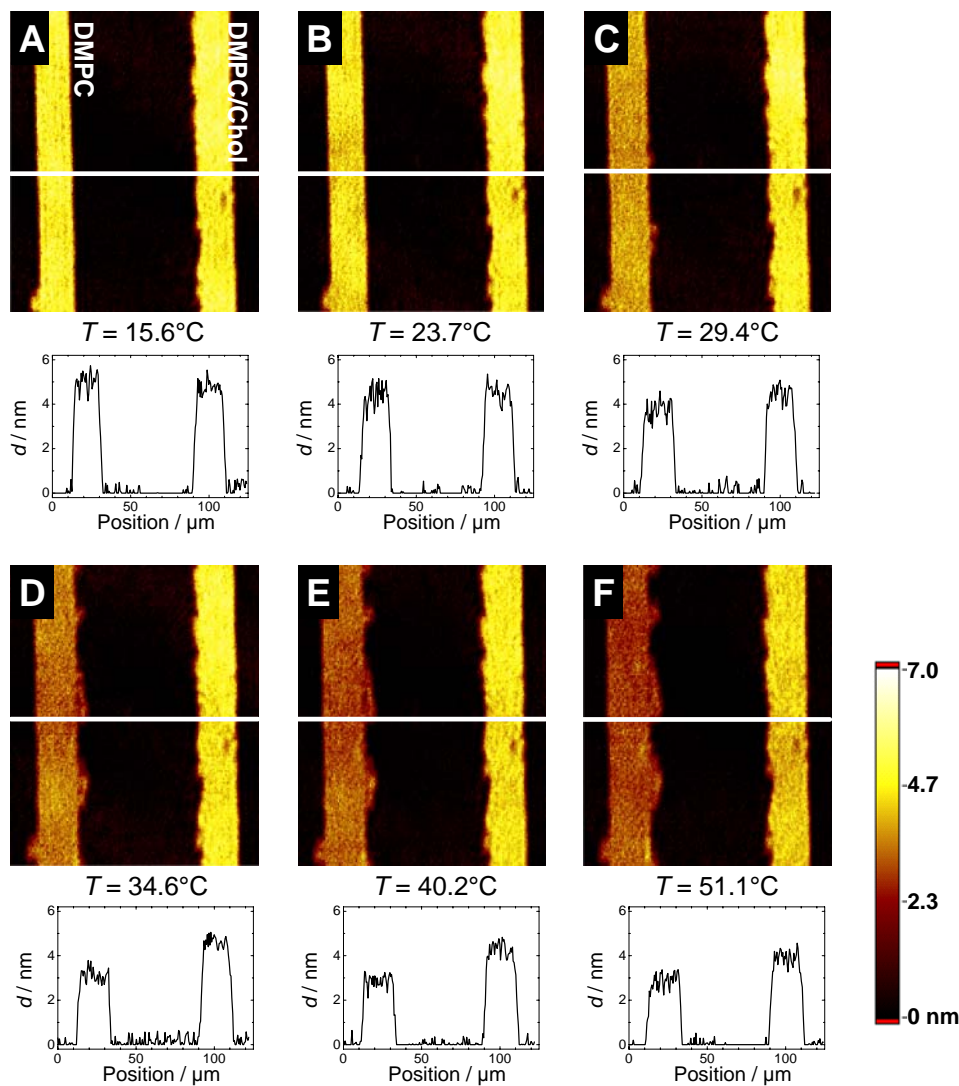


Abbildung 5.12: Ellipsometrische Schichtdickenaufnahmen von zwei mikrostrukturierten Lipidstreifen aus DMPC (links) und DMPC/Cholesterol (60:40, rechts) auf Si/SiO₂ bei verschiedenen Temperaturen. A) $T = 15.6\text{ °C}$, B) $T = 23.7\text{ °C}$, C) $T = 29.4\text{ °C}$, D) $T = 34.6\text{ °C}$, E) $T = 40.2\text{ °C}$, F) $T = 51.1\text{ °C}$. Alle Aufnahmen sind $125 \times 140\text{ }\mu\text{m}^2$ groß, der weiße Balken indiziert die Position der unter den Aufnahmen gezeigten Profile. Die Höhenskala ist für alle Aufnahmen gültig.

Die temperaturabhängigen Verläufe der Schichtdicke und der Flächenausdehnung für DMPC-Membranen mit 0 % bis 40 mol% Cholesterol sind in Abbildung 5.13 zusammengefasst. Um die Messungen besser vergleichen zu können, wurden nur die normierten Kurven dargestellt. Bis zu einer Konzentration von 10 mol% zeigt sich nur ein geringer Einfluss des Cholesterols auf die Schichtdickenänderung und die Flächenausdehnung während des Phasenübergangs. Ab 20 mol% Cholesterol zeigen die Lipidgemische eine deutlich reduzierte Änderung von Schichtdicke und Fläche und ab 30 mol% ist der typische sigmoidale Verlauf des Phasenübergangs nicht mehr vorhanden. Bis 10 mol% beträgt die Schichtdickenänderung

etwa 40 %, bei 20 mol% nur noch 29 % und bei einem Cholesterolgehalt von 40 mol% verringert sich die Dicke des Bilayers annähernd linear um insgesamt 11 %. Bei niedrigen Temperaturen ist der Verlauf der Schichtdicke mit der Temperatur unabhängig von der Cholesterolkonzentration. Dieses Verhalten lässt sich durch den geringeren Einfluss des Cholesterols auf die Ordnung der Lipidketten in der Gelphase erklären. Die Flächenausdehnung zeigt in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt das gleiche temperaturabhängige Verhalten wie die Schichtdicke. Bis 10 mol% erhält man einen sigmoidalen Verlauf während des Phasenübergangs mit einer maximalen relativen Flächenänderung von 43 % und mit steigendem Cholesterolgehalt sinkt die relative Flächenänderung bis auf 10 % bei 40 mol%.

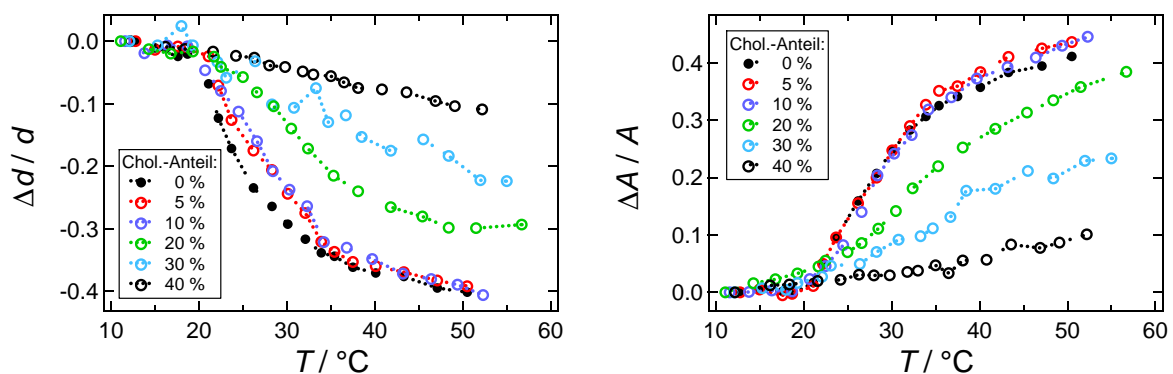


Abbildung 5.13: Verlauf der normierten Schichtdicke und der normierten Membranfläche mit der Temperatur für DMPC/Cholesterol - Gemische. Der Cholesterolgehalt beträgt zwischen 0 und 40 mol%.

Tabelle 12: Maximale relative Schichtdicken- ($\Delta d_{\text{norm}}^{\text{max}}$) und Flächenänderungen ($\Delta A_{\text{norm}}^{\text{max}}$) von DMPC/Cholesterol-Streifen auf Si/SiO₂.

% Cholesterol	$\Delta d_{\text{norm}}^{\text{max}}$	$\Delta A_{\text{norm}}^{\text{max}}$
0	0.40	0.41
5	0.38	0.44
10	0.39	0.43
20	0.29	0.37
30	0.22	0.23
40	0.11	0.10

5.8 Bildung einer interdigitierten Phase in DMPC in Gegenwart von Ethanol

5.8.1 Grundlagen

Die Bildung von interdigitierten Phasen in Membranen aus symmetrischen Phospholipiden in der Gelphase kann durch eine Vielzahl von Molekülen hervorgerufen werden. Trotz der großen Unterschiede zwischen diesen Molekülen, weisen sie bestimmte gemeinsame Eigenschaften auf. Sie müssen sich in den Grenzflächen des Bilayers aufhalten können, d. h. amphiphilen Charakter besitzen. Stark hydrophobe Moleküle, wie Alkane und Benzol, lagern sich aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen mit den Acylketten im Inneren der Membran an und können keine Interdigitation hervorrufen. Außerdem dürfen die Moleküle nicht zu groß sein, d. h. sie dürfen nicht zu weit in den hydrophoben Bereich der Membran hinein reichen. Cholesterol und langkettige Fettsäuren, die sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters an der Grenzfläche der Membran aufhalten, induzieren daher ebenfalls keine interdigitierte Phase. Als drittes muss das induzierende Molekül in der Lage sein, Wassermoleküle aus der Nähe der Kopfgruppen zu verdrängen und dadurch eine Vergrößerung der Kopfgruppenfläche hervorzurufen. Moleküle, die alle diese Eigenschaften besitzen, sind unverzweigte kurzkettige Alkohole, wie Methanol, Ethanol, bis n-Heptanol, verzweigte Alkohole, wie Isopropanol, Benzylalkohol und Phenylethanol, oder auch Anästhetika wie Chlorpromazin.^{93,108-113}

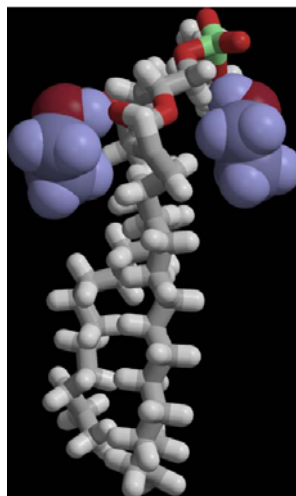


Abbildung 5.14: Ein DPPC-Molekül zusammen mit zwei Ethanol-Molekülen aus einer MD-Simulation einer voll hydratisierten Lipidmembran. Die Ethanol-Moleküle sind nahe an den Sauerstoff-Atomen des Phosphorsäureesters positioniert und es bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus.¹¹⁴

Die Bildung von interdigitierten Phasen in Membranen aus symmetrischen Phosphocholinen durch kurzkettige Alkohole wurde detailliert von Elizabeth Rowe untersucht.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Sie fand, dass bei niedrigen Alkoholgehalten die Phasenumwandlungstemperatur linear mit der Alkoholkonzentration sinkt. Ab einem bestimmten Grenzwert kehrt sich dieser Trend jedoch um, so dass die Phasenumwandlungstemperatur mit der Alkoholkonzentration wieder ansteigt. Dieses Verhalten wird als zweiphasiger Effekt bezeichnet, d. h. die Alkoholmoleküle wechselwirken auf zwei verschiedene Arten mit den Lipiden. In niedrigen Konzentrationen bindet der Alkohol bevorzugt an Lipide in der fluiden Phase, was analog zu den Wechselwirkungen verstanden werden kann, die für eine Gefrierpunktserniedrigung verantwortlich sind. Bei höherer Konzentration dominiert jedoch eine schwächere Wechselwirkung mit Lipiden in der Gelphase, was wiederum eine Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur zur Folge hat. Dieser Mechanismus beinhaltet eine Bindung von Alkohol an diskrete Bindungsplätze der Gelphasenlipide. Spätere Röntgendiffraktionsmessungen von Simon und McIntosh zeigten außerdem, dass dieses zweiphasige Verhalten von einer Änderung der Bilayerstruktur begleitet wird.¹¹² Durch die Vergrößerung der Kopfgruppenfläche können sich terminale Methylgruppen aus dem Membraninneren in die Nähe der Kopfgruppe verlagern, so dass eine interdigitierte Phase entsteht. Dadurch gibt es wiederum mehr Bindungsplätze für Alkoholmoleküle in diesem Bereich, d. h. Alkohol bindet verstärkt an diese interdigitierte Gelphase, so dass damit auch die Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur mit der Alkoholkonzentration erklärt werden kann. Die abstoßenden Wechselwirkungen zwischen den terminalen Methylgruppen und der wässrigen Phase wird gleichzeitig durch eine erhöhte van der Waals-Energie aufgrund der erhöhten Wechselwirkung der nun dichter gepackten Acylketten ausgeglichen.

Durch die Bildung einer interdigitierten Phase werden die biophysikalischen Eigenschaften einer Lipidmembran stark verändert.¹¹³ Ein großer Effekt ist die Änderung der Oberflächenladungsdichte, die hauptsächlich von der Ladung der Kopfgruppen abhängig ist. Da sich die Fläche um die Kopfgruppen durch die terminalen Methylgruppen und durch eingebaute Fremdmoleküle vergrößert, wird die Oberflächenladungsdichte erniedrigt. Dies kann Einfluss auf Membran-Membran-Wechselwirkungen haben und die Wirkung von fusogenen Moleküle, die häufig Interdigititation bewirken, erklären. Weiterhin sind die beiden Monolayer einer Membran im interdigitierten Zustand stärker miteinander verknüpft und die sonst gut definierte Mittelebene des Bilayers geht verloren. Transmembranproteine können dadurch in ihrer Wirkung beeinflusst werden, da sich Dichte und chemische Umgebung im Membraninneren ändern. Bestimmte Transmembranproteine, wie Gramicidin und Rhodopsin,

sind außerdem auf eine minimale Bilayerdicke angewiesen. Da sich diese aber in der interdigitierten Phase stark verringert, kann die Funktion dieser Proteine beeinflusst werden.¹¹³

5.8.2 Experimenteller Nachweis

Zum Nachweis einer interdigitierten Phase in Anwesenheit von Ethanol wurden mikrostrukturierte DMPC - Membranstreifen auf Si/SiO₂ erzeugt und mit dem Ellipsometer untersucht. Die Probe wurde dazu auf 40 °C geheizt und dann der Puffer gegen ein Puffer/Ethanol-Gemisch mit 20 vol% Ethanol ausgetauscht. Anschließend wurde die Probe wieder abgekühlt. Um zu untersuchen, ob der Prozess reversibel ist, wurde die Probe danach wieder bei 40 °C mit ethanolfreiem Puffer gespült. Abbildung 5.15 zeigt die aufgenommenen Schichtdicken-Bilder oberhalb und unterhalb der Phasenumwandlung in Puffer, bzw. einem Puffer/Ethanol-Gemisch. Die mittleren Bilayerdicken sind zusätzlich in Abbildung 5.16 dargestellt. Zu Beginn der Messung erkennt man fünf gut voneinander getrennte Lipidstreifen mit einer mittleren Höhe von 4.7 nm (A). Die Erhöhung der Temperatur auf 40 °C lässt die Lipide in die fluide Phase übergehen, so dass sich die Schichtdicke auf 3.1 nm verringert (B). Die gleichzeitige Ausdehnung der Lipidmembran hat zur Folge, dass die Streifen nicht mehr so deutlich voneinander separiert sind. Nach dem Austausch des Puffers durch ein Puffer/Ethanol-Gemisch verringert sich die mittlere Membrandicke bei 40 °C weiter auf 2.1 nm und die Lipidmembran dehnt sich stärker aus, so dass keine getrennten Streifen mehr zu erkennen sind (C). Nachdem die Probe auf 18 °C, d. h. unterhalb der Phasenumwandlung von DMPC, abgekühlt wurde, weist der Bilayer eine mittlere Höhe von 3.3 nm auf (D). Außerdem hat sich die Fläche verringert, so dass die ursprünglich präparierten Lipidstreifen wieder sichtbar werden. Allerdings ist die Schichtdicke deutlich geringer als bei 22 °C in ethanolfreiem Puffer. Der Vergleich der beiden Messungen A und D lässt auf das Vorhandensein einer interdigitierten Phase schließen. Um noch zu überprüfen, ob die Verringerung der Schichtdicke kein Effekt durch den Heiz- und Abkühlprozess war, wurde die Probe ein weiteres Mal auf 40 °C geheizt und 30 Minuten mit ethanolfreiem Puffer gespült (E). Die mittlere Membrandicke beträgt nach dem Spülen 3.2 nm und ist vergleichbar mit der Schichtdicke, die vor der Ethanolzugabe bei 40 °C gemessen wurde (B). Nach dem Abkühlen der Probe zeigen die jetzt wieder gut separierten Lipidstreifen eine mittlere Höhe

von 4.4 nm (F). Die Probe hat sich somit wieder in den Ausgangszustand zurückversetzen lassen. Auffällig ist, dass an den äußeren Rändern der Probe Materialrückstände vorhanden sind.

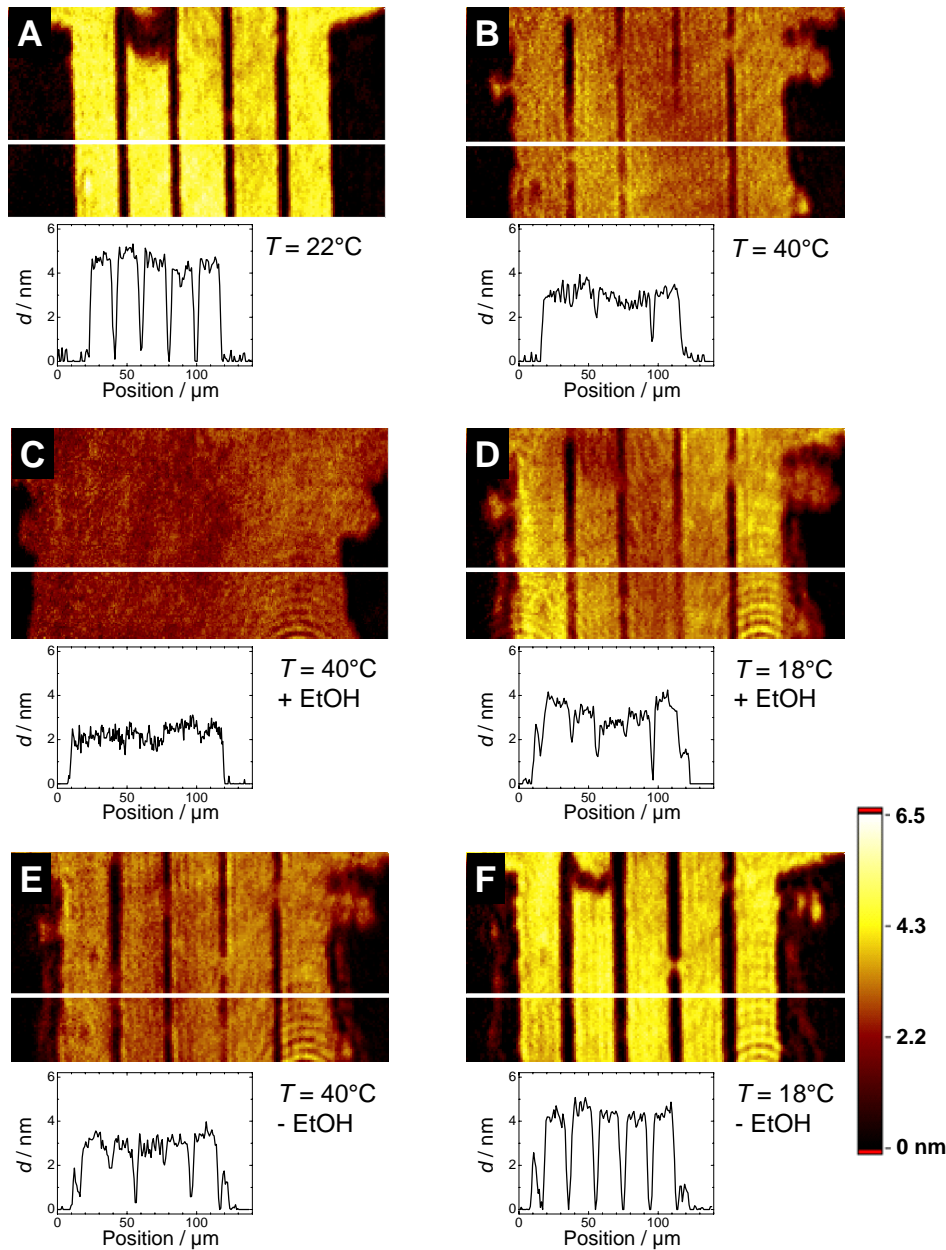


Abbildung 5.15: Ellipsometrische Schichtdickenbilder von strukturierten DMPC-Membranen auf Si/SiO₂. A) $T = 22\text{ °C}$, B) $T = 40\text{ °C}$, C) $T = 40\text{ °C}$, nach Zugabe von Ethanol, D) $T = 18\text{ °C}$, nach Zugabe von Ethanol, E) $T = 40\text{ °C}$, nach Spülen mit ethanolfreiem Puffer, F) $T = 18\text{ °C}$, nach Spülen mit ethanolfreiem Puffer. Alle Aufnahmen sind $140 \times 80\text{ }\mu\text{m}^2$ groß, der weiße Balken indiziert die Position der unter den Aufnahmen gezeigten Profile. Die Höhenskala ist für alle Aufnahmen gültig.

Die Lipidstreifen haben sich bei 40 °C mit Ethanol so stark ausgedehnt, dass die Lipidmembran an den äußeren Rändern nach dem Entfernen des Ethanols und dem Abkühlen nicht mehr vollständig in die ursprüngliche Struktur zurückfließen konnte. Außerdem ist

erstaunlich, dass der Defekt, der in (A) am oberen Rand der eines Lipidstreifens zu erkennen ist, in den Abbildungen (B) bis (E) verschwunden ist, in (F) wieder aufgetaucht ist, obwohl diese Stelle im Verlauf der Messung komplett mit einem Bilayer bedeckt war. Dies lässt darauf schließen, dass leichte Modifikationen an der Substratoberfläche einen großen Einfluss auf die Bildung einer Lipidmembran haben können.

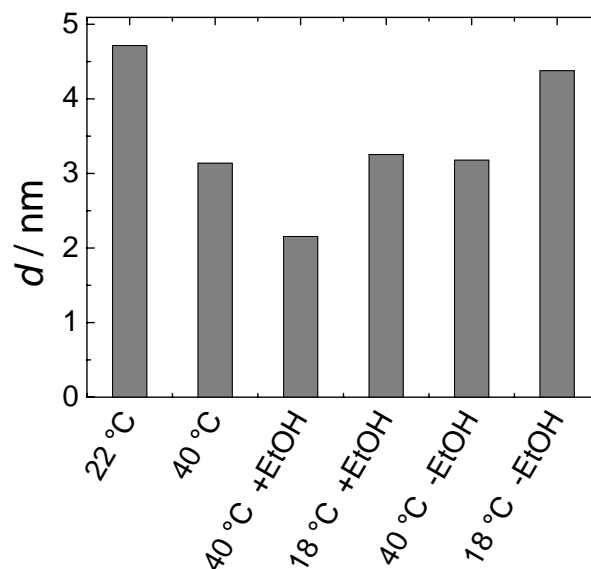


Abbildung 5.16: Mittlere Membranschichtdicken von DMPC bei unterschiedlichen Temperaturen mit und ohne Ethanol.

5.9 Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

Der mit Hilfe der spektroskopischen Ellipsometrie ermittelte für Brechungsindex für mikrostrukturierte DMPC-Bilayer von $n=1.533$ ist größer als die üblicherweise in der Literatur angegebenen Werte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Lipidmembran durch das Spreiten der Vesikel in den Kapillaren an der Grenzfläche Puffer/Luft/Substrat gebildet wird. Die hier auftretenden Kräfte sind größer als beim Vesikelspreiten an der Puffer/Substrat - Grenzfläche bei der Herstellung von unstrukturierten Bilayern, so dass eine dichtere Packung der Lipide erreicht wird. Ein Hinweis auf die größeren Kräfte ist die deutlich schnellere Bildung der strukturierten Membranen. Ein vollständiger Bilayer ist normalerweise

schon nach 20 bis 60 Sekunden zu beobachten, während dies bei unstrukturierten Membranen zwischen 5 und 10 Minuten dauern kann (s. Abbildung 4.1).^{4,115}

Die unter Berücksichtigung des Brechungsindizes $n = 1.533$ für Lipidmembranen gemessenen mittleren Schichtdicken von 4.5 nm für DMPC, 5.0 nm für diC₁₅PC und 5.4 nm für DPPC in der Gelphase stimmen sehr gut mit Ergebnissen aus SFM-Messungen überein. Hier findet man 4.3 - 4.7 nm für DMPC und 5.2 nm für DPPC in der Gelphase.^{71,116,117} Die Schichtdicke in der fluiden Phase beträgt für alle Lipide 3.1 - 3.4 nm. Auch dies stimmt gut mit Literaturwerten aus Röntgendiffraktions- und SFM-Messungen, die zwischen 3.4 - 3.6 nm liegen, überein.^{103,117,118}

Tabelle 13: Zusammenfassung der Werte für die Phasenumwandlungstemperatur T_m und die Größe der kooperativen Einheitszelle n für DMPC, diC₁₅PC und DPPC. Vergleich der mit Hilfe der bildgebenden Ellipsometrie (ELL) gemessenen Werte für festkörperunterstützte Membranen mit Literaturwerten für multilamellare Vesikel (MLV) und kleine unilamellare Vesikel (SUV).

	DMPC	diC ₁₅ PC	DPPC
$T_m / ^\circ\text{C}$ (MLV) ⁹⁶	23	34	41.5
$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$ (MLVs) ⁹⁶	0.1 – 1.0	-	0.3 – 1.0
n (MLVs) ⁹⁶	115 – 640	-	89 - 278
n (SUVs) ⁹⁶	13 - 596	-	24 - 169
$T_m / ^\circ\text{C}$ (ELL, Δd)	26.2 ± 1.6	36.8 ± 1.6	44.6 ± 1.8
$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$ (ELL, Δd)	11 - 14	8 - 10	6 - 8
$T_m / ^\circ\text{C}$ (ELL, ΔA)	27.0 ± 2.3	37.8 ± 1.6	44.7 ± 1.3
$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$ (ELL, ΔA)	11 - 15	10 - 12	8 - 10
$\Delta H_{\text{cal}} / \text{kJ/mol}$ ⁸⁵	25.1 ± 10.0	31.8 ± 2.9	34.3 ± 5.9
n (ELL)	10 ± 5	12 ± 2	17 ± 4

Die Hauptphasenumwandlungstemperaturen der reinen Lipide ließen sich mit gleichen Ergebnissen sowohl aus der Schichtdickenabnahme als auch der Flächenzunahme des Lipidstreifens ermitteln. Sie liegen 3 – 4 °C oberhalb der Literaturdaten für vesikuläre Systeme und etwa 2 °C niedriger im Vergleich zu dem von Steffen Schuy erhaltenen Wert von $T_m = 28.9$ °C, die er mit Hilfe von temperaturabhängigen SFM-Messungen von mikrostrukturierten DMPC-Membranen auf Glas erhielt.¹⁰³ Außerdem ist die Breite des Phasenübergangs mit 6 - 14 °C deutlich größer als bei Untersuchungen von multilamellaren Vesikeln (0.1 - 3 °C). Experimente mit kleinen unilamellaren Vesikeln, die besser den in dieser Arbeit verwendeten Lipidbilayern entsprechen, wiesen jedoch Übergangsbereiche von

2 - 7 °C auf. Dies zeigt, dass die zwischen den einzelnen Lipidlayern in multilamellaren Vesikeln starke Wechselwirkungen auftreten, die eine Erhöhung der Kooperativität beim Phasenübergang zur Folge haben. Außerdem ist die niedrige Kooperativität bei festkörperunterstützten Lipidmembranen durch die Wechselwirkung mit dem Substrat zu erklären.^{104,117,119,120} Eine Studie von Feng *et al.* mit Hilfe von temperaturkontrollierter Rasterkraftmikroskopie zeigte, dass die auftretenden Kräfte stark genug sind, dass ein asymmetrisches Schmelzen der beiden Lipidmonolagen beobachtet werden kann.¹²¹

Der Einfluss der Substratoberfläche zeigte sich auch bei den durchgeführten temperaturabhängigen Messungen von DMPC auf Si/SiO₂. Die ermittelte Phasenumwandlungstemperatur lag bei einzelnen Experimenten zwischen 24 °C und 29 °C, wobei sich Unterschiede in der Probenpräparation nicht immer systematisch auswirkten. Wurden Siliziumträger verwendet, die ein bis zwei Tage vor der Versuchsdurchführung oxidiert und anschließend in Reinstwasser aufbewahrt worden waren, so verschob sich die Phasenumwandlung zu etwas niedrigeren Temperaturen. Wurde jedoch eine Probe an zwei aufeinander folgenden Tagen untersucht, konnte die Phasenumwandlungstemperatur am zweiten Tag höher oder niedriger als am ersten Tag sein.

Dieser große Einfluss des Substrats auf das thermotrope Phasenverhalten der Lipidmembranen zeigt die Wichtigkeit eines internen Standards bei der Untersuchung neuer Probensysteme. Durch die Methode der bildgebenden Ellipsometrie an mikrostrukturierten Lipidbilayern kann zwar die Substratoberfläche selbst als Referenz genutzt werden, bei der Untersuchung von DMPC/Cholesterol-Gemischen wurde jedoch gleichzeitig ein Lipidstreifen aus reinem DMPC als Vergleich hinzu gezogen. Mehr als 10 mol% Cholesterol in der Lipidmembran zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Verläufe der Schichtdicke und der Membranfläche und bei 40 mol% ging der sigmoidale Verlauf bei der Phasenumwandlung in einen linearen Verlauf über. Dies ist gut mit der Entstehung einer geordneten flüssigen Phase bei hohen Cholesterolgehalten zu erklären.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass DMPC in Anwesenheit von Ethanol eine interdigitierte Phase ausbildet. Dies äußerte sich in einer Verringerung der Schichtdicke und einer Erhöhung der Membranfläche. Allerdings sind diese beiden Effekte nicht nur in der Gelphase zu beobachten, auch in der fluiden Phase bei 40 °C zeigte sich eine deutliche Verringerung der Schichtdicke von 3.1 auf etwa 2.2 nm. Außerdem konnte die Reversibilität der Interdigitation gezeigt werden, da die Lipidstreifen nach Entfernung des Ethanols die gleiche Schichtdicke aufwiesen wie vor der Bildung der interdigitierten Phase. Zugleich

wurde auch die Struktur der Lipidstreifen wieder hergestellt, was den Einfluss der Substratoberfläche auf die Lipidmembran verdeutlicht.

5.9.1 Fehlerdiskussion

Die Untersuchung an festkörperunterstützten strukturierten Lipidmembranen zeigt zwei unerwartete Eigenheiten. Die relative Flächenänderung liegt bei einzelnen Proben bei bis zu 45 %. Die Analyse kalorimetrischer Studien von Thomas Heimburg lieferte für DPPC-Vesikel eine relative Flächenänderung von nur 24.6 %.¹²² Der Grund für diese große Flächenausdehnung können winzige Defekte sein, die sich beim Aufheizen ausbilden. Das Auftreten dieser Defekte konnte in rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden (Abbildung 5.17). Ein mikrostrukturierter DMPC-Bilayer auf Glas, der in der Gelphase bei 23.0 °C noch vollkommen defektfrei war, zeigte in der fluiden Phase bei 29.0 °C im Randbereich durch die Ausdehnung der Membran kleine Defekte.¹⁰³ Da deren Größe jedoch unterhalb des lateralen Auflösungsvermögens des Ellipsometers liegt, werden sie in der Berechnung der Membranfläche aus einer „Delta-Map“ nicht berücksichtigt und führen daher zu einer Überschätzung der relativen Flächenänderung.

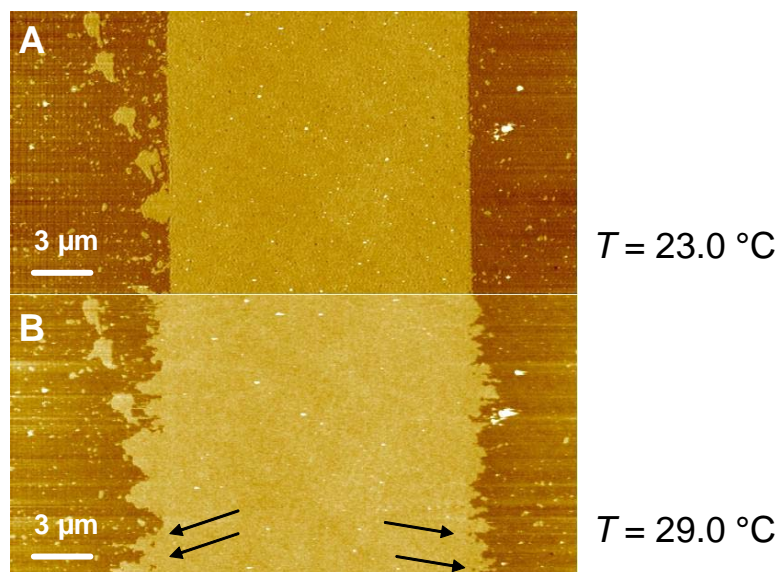


Abbildung 5.17: SFM-Aufnahmen eines mikrostrukturierten DMPC-Bilayers auf Glas bei A) $T = 23.0 \text{ °C}$ und B) $T = 29.0 \text{ °C}$. Bei der Ausdehnung der Membran auftretende Defekte sind durch Pfeile markiert.

Eine starke Flächenausdehnung kann jedoch auch durch Vesikel zustande kommen, die während der Präparation auf der Membran adhärirt bleiben. Sind diese genügend klein, so werden sie nicht detektiert. Sobald die Temperatur erhöht wird, reißen diese Vesikel auf und bilden ebenfalls einen Bilayer. Besonders groß ist dieser Effekt bei den höherschmelzenden Lipiden diC_{15}PC und DPPC. Wenn die Präparation nicht bei ausreichend hoher Temperatur stattfand, bildeten sich zwar strukturierte Membranstreifen aus, die gemessene Höhe konnte jedoch 10 – 12 nm betragen. Bei Erhöhung der Temperatur reduzierte sich die Schichtdicke bis auf 4.0 nm, was einem einzelnen Bilayer in der fluiden Phase entspricht. Allerdings betrug die Flächenänderung gleichzeitig mehr als 70 %. Ein Beispiel für dieses Verhalten ist in Abbildung 5.18 A dargestellt. Dies kann durch einen dichten Layer aus intakten Vesikeln erklärt werden, der aufgrund des mangelnden lateralen Auflösungsvermögens des Ellipsometers als geschlossene Schicht dargestellt wird. Bei steigender Temperatur ist gut zu erkennen, wie sich außerhalb der strukturierten Lipidstreifen ein Bilayer ausbildet, während gleichzeitig die Schichtdicke dieser Streifen stark abnimmt. Die Auswertung des temperaturabhängigen Verlaufs der Schichtdicke (Abbildung 5.18 B) führt zu einer Verschiebung der Phasenumwandlung zu größeren Temperaturen. Die Kooperativität des Übergangs wird dadurch jedoch nicht beeinflusst.

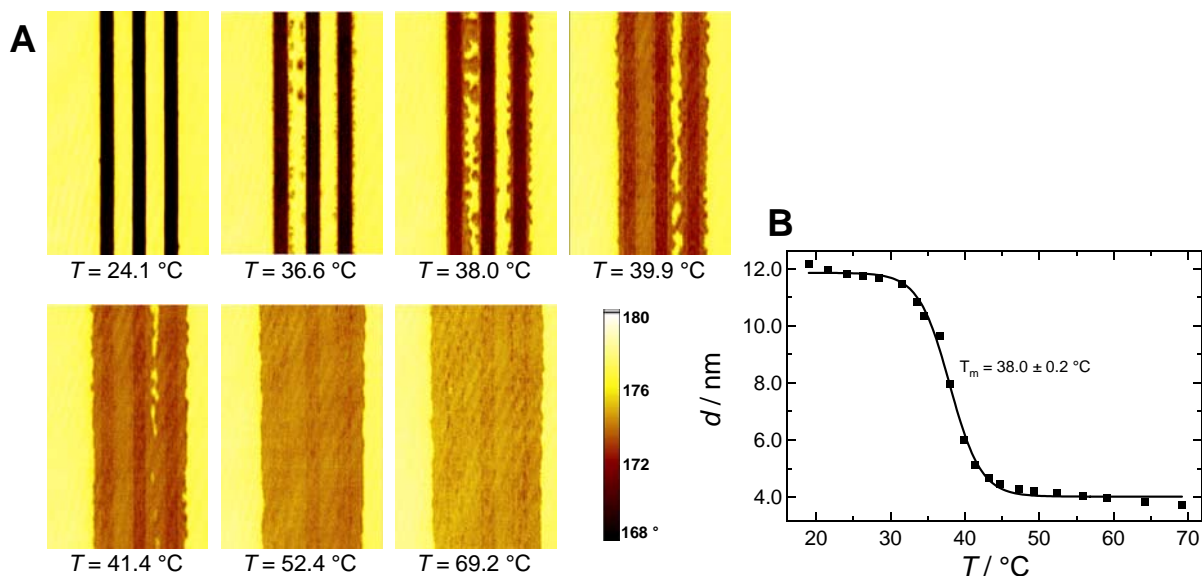


Abbildung 5.18: A) „Delta-Maps“ von mikrostrukturierten Lipidmembranen aus diC_{15}PC auf Si/SiO_2 bei verschiedenen Temperaturen. Die Größe der Bilder beträgt $200 \times 300\ \mu\text{m}^2$. B) Temperaturabhängiger Verlauf der berechneten Schichtdicke der Lipidmembran für die in A) gezeigte Probe.

Unterstützt wird diese Interpretation durch SFM-Aufnahmen von mikrostrukturierten Lipidmembranen auf Glas, die von Steffen Schuy durchgeführt wurden. Die Präparation von Lipidstreifen aus F₆-DPPC, einem fluorinierten DPPC-Molekül mit hohem Schmelzpunkt, führt bei Raumtemperatur zur Bildung eines Bilayers, auf dem eine große Anzahl intakter Vesikel adhärirt sind. Eine SFM-Aufnahme dieser Probe ist in Abbildung 5.19 A dargestellt. Nach Aufheizen der Probe auf 60 °C und anschließendem Abkühlen ist in Abbildung 5.19 C ein Lipidbilayer mit einzelnen intakten Vesikeln zu erkennen. Zusätzlich hat sich der Lipidstreifen in der Breite von 15 µm auf 20 - 25 µm ausgebreitet. Diese Beobachtung ist identisch mit den in Abbildung 5.18 gezeigten ellipsometrischen Aufnahmen.

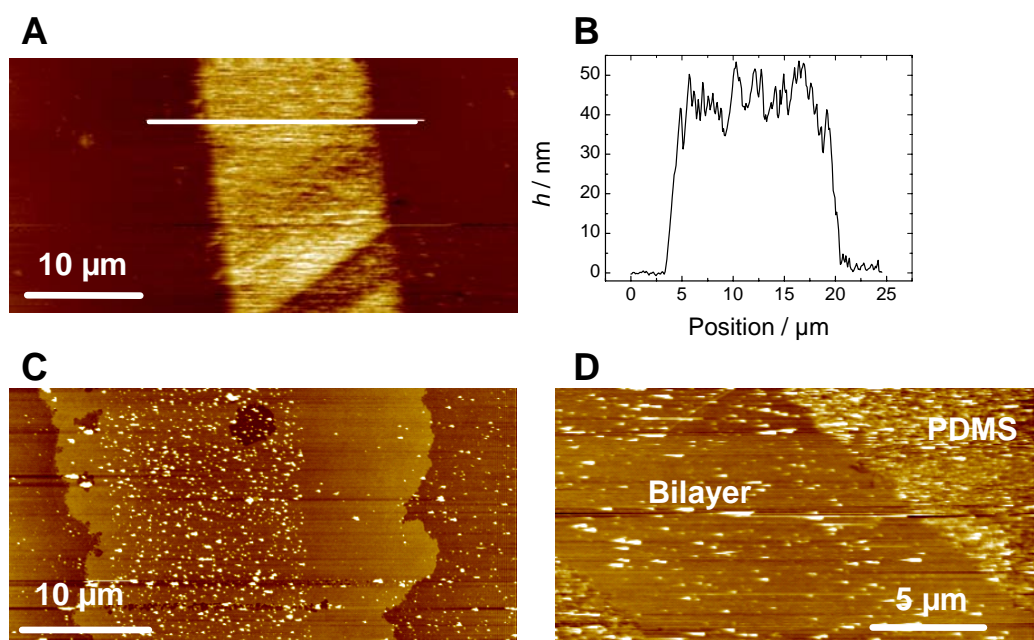


Abbildung 5.19: SFM-Aufnahmen von fluorinierten DPPC-Lipidstreifen. A) Bei Raumtemperatur durchgeführte Mikrostrukturierung führt zu einer Schicht aus intakten Vesikeln. B) Höhenprofil an der in A) eingezeichneten Linie. C) Nach Aufheizen und Abkühlen der in A) gezeigten Probe hat sich ein stark ausgedehnter Lipidstreifen gebildet, auf dem noch einzelne intakte Vesikel zu erkennen sind. D) Eine bei 65 °C durchgeführte Mikrostrukturierung führt zur direkten Bildung eines Lipidbilayers. Daneben ist die Oberfläche von PDMS-Resten bedeckt.

Messungen am Ellipsometer und mit dem Rasterkraftmikroskop zeigten außerdem, dass die Lipidstreifen sich nicht immer gleichmäßig ausdehnen, sondern dass sich Bereiche (Protrusionen) ausbilden, in denen sich der Lipidstreifen bevorzugt ausbreitet. Die Beschaffenheit der Oberfläche muss hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Einerseits können während der Präparation PDMS-Reste auf der Oberfläche zurückbleiben (s. Abbildung 5.19 D). Andererseits kann die Oberfläche auch eine gewisse Heterogenität aufweisen, die die Affinität beeinflusst, die der Lipidbilayer zu einem speziellen Bereich auf

der Oberfläche entwickelt. Dies zeigt sich in Abbildung 5.15 (A, B und F). Im oberen Bereich der Probe befindet sich ein großer Defekt, der während des Hochheizens verschwindet, nach dem Abkühlen jedoch an der gleichen Stelle wieder auftaucht. Die Wechselwirkung zwischen der Lipidmembran und der Oberfläche muss sich an dieser Stelle deutlich von den anderen Bereichen unterscheiden.

Ein weiterer Faktor, der bei der Bestimmung der Membranschichtdicken einen Fehler verursachen kann, ist der Brechungsindex. Speziell die Temperaturabhängigkeit der verwendeten Brechungsindizes und der Einfluss von Cholesterol auf den Brechungsindex der Lipidmembran müssen diskutiert werden. Im Allgemeinen sinkt der Brechungsindex eines Stoffes mit steigender Temperatur. So beträgt der Brechungsindex von Wasser bei 532 nm $n_{20\text{ °C}} = 1.3345$ und $n_{40\text{ °C}} = 1.3321$. Für das Substrat und das umgebende Medium ist diese Abhängigkeit bei der bildgebenden Ellipsometrie auf strukturierten Oberflächen jedoch nicht entscheidend, da die ellipsometrischen Winkel parallel auf der Probe und dem Substrat bestimmt werden. Diese Werte beinhalten auch das gleiche umgebende Medium und können somit als Referenz verwendet werden. Über die Temperaturabhängigkeit des Brechungsindex einer Phospholipidmembran lagen keine Literaturwerte vor. Jin *et al.* untersuchten jedoch diese Abhängigkeit an Lecithin-Membranen mittels der internen Reflektions-Spektroskopie.⁹⁹ Sie fanden eine Abnahme des Brechungsindex zwischen 20 °C und 60 °C um 0.005. Dieser Wert liegt innerhalb der Fehlergrenzen des in Kapitel 5.2 bestimmten Brechungsindex für einen strukturierten DMPC-Bilayer. Der Einfluss der Temperatur ist im betrachteten Temperaturbereich gering und kann daher vernachlässigt werden. In der gleichen Veröffentlichung wurde auch der Einfluss von Cholesterin auf eine Lecithin untersucht. Bei 25 °C und etwa 40 mol% Cholesterin erhöhte sich der Brechungsindex um 0.01, so dass auch diese Abhängigkeit in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt werden konnte.

6 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurde das Bindungsverhalten von Annexin A1 und Annexin A2t an festkörperunterstützte Lipidmembranen aus POPC und POPS untersucht. Für beide Proteine konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass irreversible Bindung nur in Anwesenheit von POPS auftritt. Durch rasterkraftmikroskopische Aufnahmen konnte die laterale Organisation der Annexine auf der Lipidmembran dargestellt werden. Beide Proteine lagern sich in Form lateraler Aggregate (zweidimensionale Domänen) auf der Oberfläche an, außerdem ist der Belegungsgrad und die Größe der Domänen von der Membranzusammensetzung und der Calciumkonzentration abhängig. Mit zunehmendem POPS-Gehalt und Calciumkonzentration steigt der Belegungsgrad an und der mittlere Domänenradius wird kleiner.

Diese Ergebnisse konnten in Verbindung mit detaillierten Bindungsstudien des Annexins A1 mit der Quarzmikrowaage verwendet werden, um ein Bindungsmodell auf Basis einer heterogenen Oberfläche zu entwickeln. Auf einer POPC-reichen Matrix findet reversible Adsorption statt und auf POPS-reichen Domänen irreversible Adsorption. Durch die Anpassung von dynamischen Monte Carlo-Simulationen basierend auf einer zweidimensionalen zufälligen sequentiellen Adsorption konnten Erkenntnisse über die Membranstruktur und die kinetischen Ratenkonstanten in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration und der Inkubationszeit des Proteins gewonnen werden. Die irreversible Bindung ist in allen Calciumkonzentrationsbereichen schneller als die reversible. Außerdem zeigt die irreversible Adsorption eine deutlich stärkere Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Ein kleinerer Belegungsgrad bei niedrigen Ca^{2+} -Gehalten ist hauptsächlich durch die Abnahme der verfügbaren Bindungsplätze auf der Oberfläche zu erklären.

Die gute Übereinstimmung der aus den Monte Carlo-Simulationen erhaltenen Domänenstrukturen mit den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen und die Tatsache, dass sich die simulierten Resonanzfrequenzverläufe problemlos an die experimentellen Kurven aus

den QCM-Messungen anpassen ließen, zeigt die gute Anwendbarkeit des entwickelten Simulationsprogramms auf die Adsorption von Annexin A1. Die Extraktion der kinetischen Parameter aus dem zweidimensionalen RSA-Modell ist mit Sicherheit einem einfachen Langmuir-Ansatz überlegen. Bei einem Langmuir-Modell erfolgt eine integrale Erfassung einer einzelnen makroskopischen Geschwindigkeitskonstante, während durch das RSA-Modell eine differenzierte Betrachtung des reversiblen und irreversiblen Bindungsprozesses möglich ist. Zusätzlich lassen sich mikroskopische Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit gewinnen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das thermotrope Phasenverhalten von festkörperunterstützten Phospholipidbilayern untersucht. Dazu wurden mikrostrukturierte, frei stehende Membranstreifen präpariert und mit Hilfe der bildgebenden Ellipsometrie untersucht. Dadurch konnten die temperaturabhängigen Verläufe der Schichtdicke und der lateralen Membranausdehnung parallel beobachtet werden. Die ermittelten Phasenübergangstemperaturen von DMPC, diC₁₅PC und DPPC lagen 2 - 3 °C oberhalb der Literaturwerte für vesikuläre Systeme. Außerdem wurde eine deutliche Verringerung der Kooperativität der Phasenumwandlung gefunden, was auf einen großen Einfluss des Substrats bei den festkörperunterstützten Lipidmembranen schließen lässt. Zusätzlich wurde ein nicht systematischer Zusammenhang der Ergebnisse von der Oberflächenpräparation gefunden, der es unabdingbar macht, bei Untersuchungen von festkörperunterstützten Substraten einen internen Standard einzuführen. Bei der Analyse des thermotropen Phasenübergangsverhaltens von DMPC/Cholesterol - Gemischen wurde daher die individuelle Adressierbarkeit der strukturierten Lipidmembranen ausgenutzt und ein Lipidstreifen aus reinem DMPC als Standard verwendet. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das für Phospholipide typische Phasenübergangsverhalten ab 30 mol% Cholesterol in der Membran nicht mehr vorhanden ist. Dies ist auf die Bildung einer nur durch höhere Sterole induzierten fluiden Phase mit hoch geordneten Acylketten zurückzuführen. Abschließend konnte durch die Zugabe von Ethanol zu einer mikrostrukturierten DMPC-Membran die Bildung eines interdigitierten Bilayers nachgewiesen werden.

Die bildgebende Ellipsometrie ist eine sehr gute Methode zur Untersuchung festkörperunterstützter Lipidmembranen, da sie über ein sehr gutes vertikales und ein ausreichendes laterales Auflösungsvermögen besitzt. Sie ist darin zwar einem Rasterkraftmikroskop noch unterlegen, besitzt dafür aber eine einfachere Handhabung beim Umgang mit Flüssigkeiten und in der Temperierung, eine schnellere Bildgebung und ist als optische Methode nicht-invasiv.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Tamm, L. K. und McConnell, H. M. (1985) Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 47, 105-113
- (2) Sackmann, E. (1996) Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science* 271, 43-48
- (3) Heyse, S., Stora, T., Schmid, E., Lakey, J. H. und Vogel, H. (1998) Emerging techniques for investigating molecular interactions at lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 319-338
- (4) Reimhult, E., Höök, F. und Kasemo, B. (2003) Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* 19, 1681-1691
- (5) Kalb, E., Frey, S. und Tamm, L. K. (1992) Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 307-316
- (6) Tamm, L. K. (1988) Lateral diffusion and fluorescence microscope studies on a monoclonal antibody specifically bound to supported phospholipid bilayers. *Biochem.* 27, 1450-1457
- (7) Delamarche, E., Bernard, A., Schmid, H., Bietzsch, A., Michel, B. und Biebuyck, H. A. (1998) Microfluidic networks for chemical patterning of substrates: design and application to bioassays. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 500-508
- (8) Xia, Y., Rogers, J. A., Paul, K. E. und Whitesides, G. M. (1999) Unconventional methods for fabricating and patterning nanostructures. *Chem. Rev.* 99, 1823-1848
- (9) Xia, Y. und Whitesides, G. M. (1998) Softlithographie. *Angew. Chem.* 110, 568-594
- (10) Xia, Y. und Whitesides, G. M. (1998) Soft lithography. *Ann. Rev. Mater. Sci.* 28, 153-184
- (11) Hovis, J. S. und Boxer, S. G. (2001) Patterning and composition arrays of supported lipid bilayers by microcontact printing. *Langmuir* 17, 3400-3405
- (12) Majd, S. und Mayer, M. (2005) Hydrogel stamping of arrays of supported lipid bilayers with various lipid compositions for the screening of drug-membrane and protein-membrane interactions. *Angew. Chem.* 117, 6855-6858
- (13) Künneke, S. und Janshoff, A. (2002) Visualization of molecular recognition events on microstructured lipid-membrane compartments by in situ scanning force microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 314-316
- (14) Schuy, S. und Janshoff, A. (2006) Microstructuring of phospholipid bilayers on gold surfaces by micromolding in capillaries. *J. Coll. Int. Sci.* 295, 93-99

- (15) Faiß, S., Schuy, S. und Janshoff, A. (2007) Phase transition of individually addressable microstructured membranes visualized by imaging ellipsometry. *J. Phys. Chem.* (to be published)
- (16) Janshoff, A., Galla, H.-J. und Steinem, C. (2000) Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik: Eine Alternative zu optischen Biosensoren? *Angew. Chem.* 4164-4195
- (17) Yee, C. K., Amweg, M. L. und Parikh, A. N. (2004) Direct photochemical patterning and refunctionalization of supported phospholipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 13962-13972
- (18) Howland, M. C., Szmodis, A. W., Sanii, B. und Parikh, A. N. (2007) Characterization of physical properties of supported phospholipid membranes using imaging ellipsometry at optical wavelengths. *Biophys. J.* 92, 1306-1317
- (19) Groves, J. T., Ulman, N. und Boxer, S. G. (1997) Micropatterning fluid lipid bilayers on solid supports. *Science* 275, 651-653
- (20) Orth, R. N., Kameoka, J., Zipfel, W. R., Ilic, B., Webb, W. W., Clark, T. G. und Craighead, H. G. (2003) Creating biological membranes on the micron scale: forming patterned lipid bilayers using a polymer lift-off technique. *Biophys. J.* 85, 3066-3073
- (21) Moran-Mirabal, J. M., Edel, J. B., Meyer, G. D., Throckmorton, D., Singh, A. K. und Craighead, H. G. (2005) Micrometer-sized supported lipid bilayer arrays for bacterial toxin binding studies through total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 89, 296-305
- (22) Morigaki, K., Baumgart, T., Offenhäusser, A. und Knoll, W. (2001) Patterning solid-supported lipid bilayer membranes by lithographic polymerization of a diacetylene lipid. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 172-174
- (23) Morigaki, K., Kiyosue, K. und Taguchi, T. (2004) Micropatterned composite membranes of polymerized and fluid lipid bilayers. *Langmuir* 20, 7729-7735
- (24) Lenhert, S., Sun, P., Wang, Y., Fuchs, H. und Mirkin, C. A. (2007) Massively parallel dip-pen nanolithography of heterogeneous supported phospholipid multilayer patterns. *Small* 3, 71-75
- (25) Lawrence Livermore National Laboratory
www.llnl.gov
- (26) Lecompte, M.-F., Rubinstein, I. und Miller, I. R. (1982) Adsorption kinetics of prothrombin. *J. Coll. Int. Sci.* 91, 12-19
- (27) Richter, R. P., Maury, N. und Brisson, A. (2005) On the effect of the solid support on the interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers. *Langmuir* 21, 299-304
- (28) Ramsden, J. J. (1995) Puzzles and paradoxes in protein adsorption. *Chem. Soc. Rev.* 24, 73-78
- (29) Feder, J. (1980) Random sequential adsorption. *J. Theor. Biol.* 87, 237-254

-
- (30) Swendsen, R. H. (1981) Dynamics of random sequential adsorption. *Phys. Rev. A* 24, 504-508
- (31) Schaaf, P. und Talbot, J. (1989) Surface exclusion effects in adsorption processes. *J. Chem. Phys.* 91, 4401-4409
- (32) Adamczyk, Z. (2000) Kinetics of diffusion-controlled adsorption of colloid particles and proteins. *J. Coll. Int. Sci.* 229, 477-489
- (33) Adamczyk, Z., Siwek, B. und Musial, E. (2003) Latex particle adsorption at heterogeneous surfaces. *Coll. Surf. A* 214, 219-229
- (34) Evans, J. W. (1993) Random and cooperative sequential adsorption. *Rev. Mod. Phys.* 65, 1281-1329
- (35) Zhdanov, V. P. und Kasemo, B. (1998) Kinetics of irreversible adsorption of deformable proteins. *J. Chem. Phys.* 109, 6497-6501
- (36) Crumpton, M. J. und Dedman, J. R. (1990) Protein terminology tangle. *Nature* 345, 212
- (37) Gerke, V. und Moss, S. E. (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 129-154
- (38) Gerke, V. und Moss, S. E. (2002) Annexins: From structure to function. *Physiol. Rev.* 82, 331-371
- (39) Liemann, S. und Lewit-Bentley, A. (1995) Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* 3, 233-237
- (40) Rosengarth, A., Gerke, V. und Luecke, H. (2001) X-ray structure of full-length Annexin A1 and implications for membrane aggregation. *J. Mol. Biol.* 306, 489-498
- (41) Rosengarth, A. und Luecke, H. (2003) A Calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of Annexin A1. *J. Mol. Biol.* 326, 1317-1325
- (42) Waisman, D. M. (1995) Annexin II tetramer: Structure and function. *Mol. Cell. Biochem.* 149/150, 301-322
- (43) Kastl, K., Herrig, A., Lüthgens, E., Janshoff, A. und Steinem, C. (2004) Scrutiny of Annexin A1 mediated membrane-membrane interaction by means of a thickness shear mode resonator and computer simulations. *Langmuir* 20, 7246-7253
- (44) Lambert, O., Gerke, V., Bader, M.-F., Porte, F. und Brisson, A. (1997) Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 272, 42-55

- (45) Schulz, D. M., Kalkhof, S., Schmidt, A., Ihling, C., Stingl, C., Mechtler, K., Zschörnig, O. und Sinz, A. (2007) Annexin A2/p11 interaction: New insights into annexin A2 tetramer structure by chemical crosslinking, high-resolution mass spectrometry, and computational modeling. *Proteins structure function bioinformatics* (in press)
- (46) Sopkova-de Oliveira Santos, J., Oling, F. K., Rety, S., Brisson, A., Smith, J. C. und Lewit-Bentley, A. (2000) S100 protein-annexin interactions: A model of the (Anx2-p11)₂ heterotetramer complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1498, 181-191
- (47) Schlaepfer, D. D. und Haigler, H. T. (1987) Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of Lipocortin I. *J. Biol. Chem.* 262, 6931-6937
- (48) Kastl, K., Menke, M., Lüthgens, E., Faiß, S., Gerke, V., Janshoff, A. und Steinem, C. (2006) Partially reversible adsorption of annexin A1 on POPC/POPS bilayers investigated by QCM measurements, SFM, and DMC simulations. *ChemBioChem* 7, 106-115
- (49) Kastl, K., Ross, M., Gerke, V. und Steinem, C. (2002) Kinetics and thermodynamics of Annexin A1 binding to solid-supported membranes: a QCM study. *Biochem.* 41, 10087-10094
- (50) Ross, M. (2003) Quantifizierung der Interaktion von Annexin A2t mit festkörperunterstützten Lipidmembranen. *Dissertation*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- (51) Ross, M., Gerke, V. und Steinem, C. (2003) Membrane composition affects the reversibility of Annexin A2t binding to solid supported membranes: a QCM study. *Biochem.* 42, 3131-3141
- (52) Rothen, A. (1945) The ellipsometer, an apparatus to measure thicknesses of thin surface films. *Rev. Sci. Instruments* 16, 26-30
- (53) Drude, P. (1891) Über die Reflexion und Brechung ebener Lichtwellen beim Durchgang durch eine mit Oberflächenschichten behaftete planparallele Platte. *Wied. Ann. Phys. Chem.* 43, 126-157
- (54) Drude, P. (1901) Theory of optics. Longmans, Green & Co., New York
- (55) Tompkins, H. C. (1993) A user's guide to Ellipsometry. Academic Press, Inc., San Diego
- (56) Albers, H., Van der Wal, W. J. J., Gijzeman, O. L. J. und Bootsma, G. A. (1978) Ellipsometry-LEED study of oxygen adsorption and the carbon monoxide-oxygen interaction on Ag(110). *Surface Sci.* 77, 1-13
- (57) Ducharme, D., Max, J.-J., Salesse, C. und Leblanc, R. M. (1990) Ellipsometric study of the physical states of phosphatidylcholines at the air-water interface. *J. Phys. Chem.* 94, 1925-1932

- (58) Petrov, J. G., Pfohl, T. und Möhwald, H. (1999) Ellipsometric chain length dependence of fatty acid langmuir monolayers. A heads-and-tails model. *J. Phys. Chem. B* 103, 3417-3424
- (59) Reimhult, E., Zäch, M., Höök, F. und Kasemo, B. (2006) A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂. *Langmuir* 22, 3313-3319
- (60) Cuypers, P. A., Corsel, J. W., Janssen, M. P., Kop, J. M. M., Hermens, W. T. und Hemker, H. C. (1982) The adsorption of prothrombin to phosphatidylserine multilayers quantitated by ellipsometry. *J. Biol. Chem.* 258, 2426-2431
- (61) Koppenol, S., Tsao, F. H. C., Yu, H. und Zografis, G. (1998) The interaction of lung annexin I with phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 1369, 221-232
- (62) Vörös, J. (2004) The density and refractive index of adsorbing protein layers. *Biophys. J.* 87, 553-561
- (63) Spottiswoode, W. (1874) Polarisation of light. Macmillan & Co., London
- (64) Herraiez, J. V. und Belda, R. (2006) Refractive indices, densities and excess molar volumes of monoalcohols + water. *J. Solution Chem.* 35, 1315-1328
- (65) Buttry, W. (1992) Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance. *Chem. Rev.* 92, 1355 - 1379
- (66) Sauerbrey, G. (1959) Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Phys.* 155, 206-222
- (67) Martin, S. J., Granstaff, V. E. und Frye, G. C. (1991) Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading. *Anal. Chem.* 63, 2272 - 2281
- (68) Lucklum, H. (2003) Transduction mechanism of acoustic-wave based chemical and biochemical sensors. *Meas. Sci. Technol.* 14, 1854 - 1864
- (69) Voinova, M. V., Jonson, M. und Kasemo, B. (2002) 'Missing mass' effect in biosensor's QCM applications. *Biosensors and Bioelectronics* 17, 835-841
- (70) Kastl, K. (2005) Wechselwirkung von Annexin A1 mit Modellmembranen und S100A11. *Dissertation*, Universität Regensburg
- (71) Künneke, S. (2003) Kontaktmechanik und Strukturierung von festkörperunterstützten Lipidmembranen. *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- (72) Binnig, G., Quate, C. F. und Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933

-
- (73) Alexander, S., Hellemanns, L., Marti, O., Schneir, J., Elings, V., Hansma, P. K., Longmire, M. und Gurley, J. (1989) An atomic-resolution atomic-force-microscope implemented using an optical lever. *J. Appl. Phys.* 65, 164-167
- (74) Engelhardt, J. und Knebel, W. (1993) Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. *Physik in unserer Zeit* 24, 70-78
- (75) Langmuir, I. (1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 40, 1361-1403
- (76) Schaaf, P. und Talbot, J. (1989) Kinetics of random sequential adsorption. *Phys. Rev. Lett.* 62, 175-178
- (77) Lüthgens, E. (2005) Modellierung der Oberflächenreaktionen von Vesikeln und Proteinen mit Hilfe dynamischer Monte Carlo-Simulationen. *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- (78) Wang, J.-S. (1994) A fast algorithm for random sequential adsorption of discs. *Int. J. Mod. Phys. C* 5, 707-715
- (79) Adamczyk, Z., Senger, B., Voegel, J.-C. und Schaaf, P. (1999) Irreversible adsorption/deposition kinetics: A generalized approach. *J. Chem. Phys.* 110, 3118-3128
- (80) Rosengarth, A., Rösgen, J., Hinz, H.-J. und Gerke, V. (1999) A Comparison of the energetics of Annexin I and Annexin V. *J. Mol. Biol.* 288, 1013-1025
- (81) Gerke, V. und Weber, K. (1984) Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J.* 3, 227-233
- (82) Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- (83) Rosengarth, A., Wintergalen, A., Galla, H.-J., Hinz, H.-J. und Gerke, V. (1998) Ca²⁺-independent interaction of Annexin A1 with phospholipid monolayers. *FEBS Lett.* 438, 279-284
- (84) Avanti Polar Lipids
www.avantilipids.com
- (85) Koynova, R. und Caffrey, M. (1998) Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 91-145
- (86) Lipidat
www.lipidat.com
- (87) Molecular Probes
www.probes.com

- (88) MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P. M., Takeshita, K., Subbarao, M. K. und Hu, L. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1061, 297-303
- (89) Menke, M., Gerke, V. und Steinem, C. (2005) Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by Annexin A2/S100A10 Heterotetramer. *Biochem.* 44, 15296-15303
- (90) Janshoff, A., Ross, M., Gerke, V. und Steinem, C. (2001) Visualization of Annexin 1 binding to calcium-induced phosphatidylserine domains. *ChemBioChem* 7/8, 587-590
- (91) Adamczyk, Z., Siwek, B., Warszynski, P. und Musial, E. (2001) Kinetics of particle deposition in the radial impinging-jet cell. *J. Coll. Int. Sci.* 242, 14-24
- (92) Dabros, T. und van de Ven, T. G. M. (1983) A direct method for studying particle deposition onto solid surfaces. *Colloid Polym. Sci.* 261, 694-707
- (93) Albon, N. und Sturtevant, J. (1978) Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2258-2260
- (94) Marsh, D., Watts, A. und Knowles, P. F. (1976) Evidence for phase boundary lipid. Permeability of Tempo-choline into Dimyristoylphosphatidylcholine vesicles at the phase transition. *Biochemistry* 15, 3570-3578
- (95) Flory, P. J. (1969) Statistical mechanics of chain molecules. Interscience, New York
- (96) Marsh, D., Watts, A. und Knowles, P. F. (1977) Cooperativity of the phase transition in single- and multibilayer lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 465, 500-514
- (97) Citra, M. J. und Axelsen, P. H. (1996) Determination of molecular order in supported lipid membranes by internal reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 71, 1796-1805
- (98) Picard, F., Buffeteau, T., Desbat, B., Auger, M. und Pezolet, M. (1999) Quantitative orientation measurements in thin lipid films by attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 76, 539-551
- (99) Jin, Y. L., Chen, J. Y., Xu, L. und Wang, P. N. (2006) Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection. *Phys. Med. Biol.* 51, N371-N379
- (100) Horvath, R., Fricsovszky, G. und Papp, E. (2003) Application of the optical waveguide lightmode spectroscopy to monitor lipid bilayer phase transition. *Biosens. Bioelectron.* 18, 415-428
- (101) Salamon, Z. und Tollin, G. (2001) Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape. *Biophys. J.* 80, 1557-1567
- (102) Frey, S. und Tamm, L. K. (1991) Orientation of melittin in phospholipid bilayers: a polarized attenuated total reflection study. *Biophys. J.* 60, 922-930

- (103) Schuy, S. und Janshoff, A. (2006) Thermal expansion of microstructured DMPC bilayers quantified by temperature-controlled atomic force microscopy. *ChemPhysChem* 7, 1207-1210
- (104) Charrier, A. und Thibaudau, F. (2005) Main phase transitions in supported lipid single-bilayer. *Biophys. J.* 89, 1094-1101
- (105) Mouritsen, O. G. und Zuckermann, M. J. (2004) What's so special about cholesterol? *Lipids* 39, 1101-1113
- (106) Ipsen, J. H., Karlström, G., Mouritsen, O. G., Wennerström, H. und Zuckermann, M. J. (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta* 908, 162-172
- (107) Smondyrev, A. M. und Berkowitz, M. L. (1999) Structure of Dipalmitoyl-phosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: Molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 77, 2075-2089
- (108) Løbbecke, L. und Cevc, G. (1995) Effects of short-chain alcohols on the phase behavior and interdigitation of phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1237, 59-69
- (109) Rowe, E. S. (1983) Lipid chain length and temperature dependence of ethanol-phosphatidylcholine interactions. *Biochemistry* 22, 3299-3305
- (110) Rowe, E. S. (1985) Thermodynamic reversibility of phase transitions. Specific effects of alcohols on phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* 813, 321-330
- (111) Rowe, E. S. und Campion, J. M. (1994) Alcohol induction of interdigitation in distearoylphosphatidylcholine: Fluorescence studies of alcohol chain length requirements. *Biophys. J.* 67, 1888-1895
- (112) Simon, S. A. und McIntosh, T. J. (1984) Interdigitated hydrocarbon chain packing causes the biphasic transition behavior in lipid / alcohol suspensions. *Biochim. Biophys. Acta* 773, 169-172
- (113) Slater, J. L. und Huang, C.-H. (1988) Interdigitated bilayer membranes. *Prog. Lipid Res.* 27, 325-359
- (114) Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B. W., Holopainen, J. und Karttunen, M. (2006) Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophys. J.* 90, 1121-1135
- (115) Reimhult, E., Höök, F. und Kasemo, B. (2002) Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: Dependence on vesicle size. *J. Chem. Phys.* 117, 7401-7404
- (116) Schuy, S. (2003) Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von planaren und mikrostrukturierten festkörperunterstützten Lipidmembranen. *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

-
- (117) Tokumasu, F., Jin, A. J. und Dvorak, J. A. (2002) Lipid membrane phase behaviour elucidated in real time by controlled environment atomic force microscopy. *J. Elec. Microsc.* 51, 1-9
- (118) Nagle, J. F. und Tristram-Nagle, S. (2000) Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 159-195
- (119) Xie, A. F., Yamada, R., Gewirth, A. A. und Granick, S. (2002) Materials Science of the Gel to Fluid Phase Transition in a Supported Phospholipid Bilayer. *Phys. Rev. Lett.* 89, 246103/1-246103/4
- (120) Yang, J. und Appleyard, J. (2000) The Main Phase Transition of Mica-Supported Phosphatidylcholine Membranes. *J. Phys. Chem. B* 104, 8097-8100
- (121) Feng, Z. V., Spurlin, T. A. und Gewirth, A. A. (2005) Direct visualization of asymmetric behavior in supported lipid bilayers at the gel-fluid phase transition. *Biophys. J.* 88, 2154-2164
- (122) Heimburg, T. (1998) Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta* 1415, 147-162

A Anhang

A.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Präparation mikrostrukturierter Lipidmembranen auf einem Substrat durch <i>microcontact printing</i> (A) ¹¹ und <i>micromolding in capillaries</i> (B).....	5
Abbildung 1.2: Präparation mikrostrukturierter Lipidmembranen durch Belichtung mit UV-Licht. ¹⁷	6
Abbildung 1.3: A) Strukturierte Lipidmembranen, getrennt durch eine Barriere aus Photolack. ¹⁹ B) Darstellung barrierefreier strukturierter Lipidmembranen mit Hilfe der Polymer <i>lift-off</i> Technik. ²⁰	7
Abbildung 1.4: Erzeugung einer strukturierten Membran aus polymerisierten Lipiden (A-C) und anschließende Präparation fluider Lipidkompartimente (D). ²³	8
Abbildung 1.5: Prinzip der DPN. An der SFM-Spitze anhaftende Moleküle werden über einen Wassermeniskus auf die Oberfläche übertragen. ²⁵	8
Abbildung 1.6: Kristallstruktur von Annexin A1 in Gegenwart von 100 mM Calciumacetat. Die Ca^{2+} -Ionen sind als gelbe Kugeln dargestellt. Die vier Subdomänen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Der N-Terminus, der sich an der unteren Seite anschließt konnte nicht eindeutig lokalisiert werden und ist daher nicht dargestellt. ⁴¹	12
Abbildung 1.7: Modelle des Annexin A2/p11 - Komplexes. A) Heterotetramer. B) Heterooktamer. Die Annexin A2 - Untereinheiten sind in blau und grün dargestellt, die p11 - Moleküle in rot. ⁴⁵	13
Abbildung 2.1: Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche.....	19
Abbildung 2.2: Reflexion an einer Oberfläche, Definition der Einfallsebene und der elektrischen Feldvektoren E_s und E_p . ⁵⁵	20
Abbildung 2.3: A) Die Reflektivitäten R^p und R^s als Funktion des Einfallswinkels für ein transparentes Material mit $n_2 = 2.0$. ⁵⁵ B) Reflexion und Lichtbrechung an einem Substrat (3) mit einem dünnen Film (2) mit Schichtdicke d	21
Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau eines konzeptionellen Ellipsometers mit dem Kompensator im Strahlengang nach der Reflexion an der Probenoberfläche. ⁵⁵	23
Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines modernen Ellipsometers mit dem Kompensator im Strahlengang vor der Reflexion und rotierendem Polarisator und Analysator. ⁵⁵	24
Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau des bildgebenden Ellipsometers EP ³ -SW der Firma Nanofilm.....	26

Abbildung 2.7: Graustufen-Kontrastbilder einer mikrostrukturierten BSA-Schicht auf Si/SiO ₂ bei schrittweiser Änderung des Polarisatorwinkels von 43 ° auf 53 °. Das Muster wird durch den Nulldurchgang des Polarisators invertiert. Eine hellere Fläche bedeutet somit im Allgemeinen nicht eine höhere Schichtdicke.....	27
Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau einer Ellipsometer-Probe. Auf das Substrat adsorbierte Lipidmembran und Protein werden als dünne Filme modelliert.	28
Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau eines Nanofilm Optislides. Die Schichtdicke des stark reflektierenden Ta ₂ O ₅ -Layers beträgt etwa 82 nm, die SiO ₂ -Schicht ist etwa 10 nm dick.	28
Abbildung 2.10: Abhängigkeiten der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi von der Schichtdicke SiO ₂ auf Silizium (A, B) und von der Schichtdicke einer Lipidmembran auf Silizium mit 1 nm SiO ₂ (C). Als umgebendes Medium wurde H ₂ O gewählt.	29
Abbildung 2.11 Graustufenbild eines strukturierten Lipidbilayers auf Si/SiO ₂ . In weiß sind mehrere <i>regions of interest</i> (ROI) eingezeichnet.	30
Abbildung 2.12: A) „Delta-Map“ eines strukturierten Lipidbilayers auf Si/SiO ₂ . Eine Histogramm-Analyse innerhalb des schwarz eingerahmten Bereichs ergibt das in B) dargestellte Histogramm, an das sich die Linearkombination zweier Gauß-Kurven anpassen lässt.	31
Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des Dipolcharakters eines Quarzkristalls und dessen Scherdeformation beim Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes (A) Gleichspannung, B) Wechselspannung).	33
Abbildung 2.14: Butterworth van Dyke (BVD)-Ersatzschaltbild eines Schwingquarzes. ⁶⁷	33
Abbildung 2.15: Ersatzschaltbild eines Quarzresonators in Kontakt mit einer viskosen Flüssigkeit und einer starren Masse. Parasitäre Kapazitäten resultieren aus Kabelverbindungen angeschlossener Messgeräte und sind in C _p zusammengefasst. ⁶⁷	34
Abbildung 2.16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die QCM-Messung. Messzelle und Reaktionsgefäß befinden sich im Thermoschrank. ⁷⁰	35
Abbildung 2.17: Schematische Darstellung der QCM-Messzelle. ⁷⁰	36
Abbildung 2.18: Das Wechselwirkungspotential $V(z)$ und die daraus abgeleitete Kraft $F(z)$ in Abhängigkeit des Abstandes z zwischen Messspitze und Probe. Zusätzlich sind die Arbeitsbereiche der gängigsten Betriebsmodi eingezeichnet. ⁷¹	37
Abbildung 2.19: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops betrieben im <i>tapping</i> -Modus. ⁷¹	38
Abbildung 2.20: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Fluoreszenzmikroskops.	41
Abbildung 2.21: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Nur der rote Lichtstrahl stammt direkt aus der Brennebene. Der blaue und grüne Lichtstrahl, die nicht direkt aus der Brennebene stammen, werden durch die Lochblende vor dem Detektor ausgeblendet.	42

Abbildung 2.22: Teilbereich einer Oberfläche, die mit mehreren Scheiben des Durchmessers d belegt ist. Im Ausschlusskreis mit Durchmesser $2d$ darf sich kein weiterer Mittelpunkt einer Scheibe befinden. Die in grau dargestellten Schnittmengen dieser Bereiche müssen bei der Berechnung der ASF als Korrekturglieder berücksichtigt werden. ⁷⁷	44
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der bei Lipidmembranen vorkommenden Phasen. A) Sub-Gelphase L_c , B) Gelphase L_β (nicht gekippte Ketten), C) Gelphase $L_{\beta'}$, D) rippled Gelphase $P_{\beta'}$, E) flüssigkristalline oder fluide Phase L_α , F) interdigitierte Phase $L_{\beta i}$	50
Abbildung 3.2: Strukturformeln von A) TexasRed®-DHPE und B) β -BODIPY® 500/510- C_{12} -HPC.	51
Abbildung 3.3: Absorptions- und Emissionsspektren von A) TexasRed®-DHPE und B) β -BODIPY® 500/510- C_{12} -HPC.	51
Abbildung 3.4: Präparation individuell adressierbarer mikrostrukturierter Lipidmembranen auf einem Substrat durch <i>micromolding in capillaries</i> (MIMIC).	56
Abbildung 3.5: Reaktion des flüssigen Präpolymers (1) und des Härters (2) zu festem Polydimethylsiloxan (PDMS).	57
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der softlithographischen Methode zur Herstellung der PDMS-Form für das mikrofluide Netzwerk.	58
Abbildung 4.1: Zeitliche Verläufe der ellipsometrischen Winkel Delta und Psi nach der Zugabe einer unilamellaren Vesikelsuspension (0.5 mg/mL) aus POPC/POPS mit unterschiedlichen POPS-Gehalten zu einer Si/SiO ₂ -Oberfläche.	63
Abbildung 4.2: Fluoreszenzaufnahmen von mikrostrukturierten Lipidmembranen aus POPC und POPC/POPS (4:1) auf Glas nach Zugabe von 0.2 μ M Texas Red-Annexin A1. Die Lipidmembranen waren mit 0.5 mol% Bodipy gelabelt. A) Anregung des Bodipy-Farbstoffs bei 488 nm zur Visualisierung der Lipidmembranen. B) Anregung des Texas Red-Farbstoffs bei 543 nm zur Visualisierung des gebundenen Annexin A1.	64
Abbildung 4.3: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke nach Zugabe von 0.4 μ M Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen auf Si/SiO ₂ bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Nach 20 Minuten wurde mit proteinfreiem Puffer gespült.	65
Abbildung 4.4: Zeitliche Resonanzfrequenzverläufe eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μ M Annexin A1 zu einer POPC/POPS (4:1)-Membran bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Nach 10 Minuten (bei 0.05 mM Ca ²⁺ nach 12 Minuten) wurde mit proteinfreiem Puffer gespült.	66
Abbildung 4.5: Fluoreszenzaufnahmen von mikrostrukturierten Lipidmembranen aus POPC und POPC/POPS (4:1) auf Glas nach Zugabe von 0.2 μ M Texas Red-Annexin A2t. Die Lipidmembranen waren mit 0.5 mol% Bodipy gelabelt. A) Anregung des Bodipy-Farbstoffs bei 488 nm zur Visualisierung der Lipidmembranen. B) Anregung des Texas Red-Farbstoffs bei 543 nm zur Visualisierung des gebundenen Annexin A2t.	67
Abbildung 4.6: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke nach Zugabe von 0.6 μ M Annexin A2t zu einer strukturierten und einer unstrukturierten POPC/POPS (4:1)-Membran auf Si/SiO ₂ . Die Calciumkonzentration betrug in beiden Experimenten 1.0 mM.	68

Abbildung 4.7: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke nach Zugabe von 0.6 μM Annexin A2t zu einer strukturierten POPC/POPS (4:1)-Membran auf Si/SiO ₂ und nach dem Spülen mit proteinfreiem Puffer bei verschiedenen Calciumkonzentrationen.....	69
Abbildung 4.8: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke auf dem Substrat und der Membran nach Zugabe von 0.6 μM Annexin A2t zu einem strukturierten POPC/POPS (4:1)-Bilayer auf Si/SiO ₂ und nach dem Spülen mit proteinfreiem Puffer in Gegenwart von 1.0 mM Ca ²⁺	70
Abbildung 4.9: Zeitliche Verläufe der mittleren Proteinschichtdicke auf dem Substrat und der Lipidmembran nach Zugabe von zuerst 1 mg/mL BSA und anschließend 0.6 μM Annexin A2t zu einem strukturierten POPC/POPS (4:1)-Bilayer. Bei 45 und 78 Minuten wurde mit proteinfreiem Puffer gespült. Die Calciumkonzentration betrug 1.0 mM.....	71
Abbildung 4.10: Mit Hilfe der SPIP-Software durchgeführte <i>grain</i> -Analysen von SFM-Aufnahmen von Annexin A1 auf POPC/POPS (95:5) auf Si/SiO ₂ zur Ermittlung der mittleren Domänenradien und der Belegungsgrade. Aus den SFM-Aufnahmen (oben) werden die Domänen identifiziert (Mitte) und die Ergebnisse der Analyse in einer Tabelle ausgegeben (unten).....	73
Abbildung 4.11: <i>Tapping</i> -Modus SFM-Aufnahmen von Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen. Der POPS-Anteil betrug A) 5 %, B) 10 %, C) 20 %. Die Calciumkonzentration betrug 1.0 mM.....	74
Abbildung 4.12: <i>Tapping</i> -Modus SFM-Aufnahmen von Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen. Der POPS-Anteil betrug A) 5 %, B) 10 %, C) 20 %. Die Calciumkonzentration betrug 0.05 mM.....	75
Abbildung 4.13: <i>Tapping</i> -Modus SFM-Aufnahmen von Annexin A2t auf POPC/POPS-Membranen mit einem POPS-Anteil von 5 %. Die Calciumkonzentration betrug A) 0.05 mM und B) 1.0 mM.....	76
Abbildung 4.14: A) Geometrie der Staupunktströmung mit den für die Betrachtung relevanten Größen. Der Fluss der Lösung durch die Messzelle ist durch Pfeile, die den Partikelflussvektor \vec{j} repräsentieren, angedeutet. B) Stromlinien eines Fluids in Staupunktgeometrie für $h/R = 1.6$ für verschiedene Reynoldszahlen nach Adamczyk. ⁹¹	77
Abbildung 4.15: Bindungsmodell von Annexin A1 auf einer heterogenen Oberfläche. Nach dem Transport zur Oberfläche erfolgt reversible Bindung auf der POPC-reichen Matrix und irreversible Bindung auf den POPS-reichen Domänen. ⁴⁸	79
Abbildung 4.16: A) Darstellung einer Simulationsfläche mit 1 μm Kantenlänge und einer relativen Domänenfläche $A_{\text{irr}} = 0.3$. B) Vergrößerter Ausschnitt aus der Simulationsfläche mit reversibel gebundenen Teilchen (weiß) auf der Matrix (schwarz) und irreversibel gebundenen Teilchen (gelb) auf den Domänen (grau).....	81
Abbildung 4.17: Flussdiagramm des Simulationsprogramms „VESAD“. Die Heterogenität der Oberfläche ist über reversible und irreversible Adsorptionsplätze (Domänen) im Diagramm berücksichtigt. ⁷⁷	82
Abbildung 4.18: Simulierter Frequenzverlauf während der Proteinadsorption bei verschiedenen Kantenlängen der Simulationsfläche.....	85

Abbildung 4.19: Relative Rechenzeit einer einzelnen (schwarz) Simulation in Abhängigkeit von der Simulationsfläche und Gesamtrechenzeit von zehn (rot) Simulationen.	86
Abbildung 4.20: Simulierte Resonanzfrequenzverläufe bei unterschiedlichen Teilchenzahldichten N_D	87
Abbildung 4.21: Simulierter Frequenzverlauf während einer Proteinadsorption bei verschiedenen Werten für k_{tr}	88
Abbildung 4.22: Simulierte Resonanzfrequenzverläufe für verschiedene Werte von A) k_{irr} , B) k_{on} , C) k_{off}	89
Abbildung 4.23: Exponentielle Anpassung des Resonanzfrequenzverlaufs nach dem Spülen zur Abschätzung von k_{off}	90
Abbildung 4.24: Abhängigkeit der irreversiblen Oberflächenbelegung vom mittleren Domänenradius bei gleich bleibender Gesamtdomänenfläche von 33.5 %. Eine steigende Domänengröße wird bei konstanter Simulationsfläche durch eine Erniedrigung der Domänenanzahl erreicht.	91
Abbildung 4.25: Zeitlicher Resonanzfrequenzverlauf eines 5 MHz-Quarzes nach Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu einer POPC/POPS (4:1)-Membran. Nach 600 s wurde mit proteinfreiem Puffer gespült. Die experimentellen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulation erhaltene Kurve in schwarz.	92
Abbildung 4.26: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz. Der mittlere Domänenradius betrug bei allen Simulationen 50 nm.	93
Abbildung 4.27: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz. Die Simulationen wurden mit gleich bleibender Domänenanzahl durchgeführt.	96
Abbildung 4.28: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und einer Inkubationszeit von 30 Minuten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz. Der mittlere Domänenradius betrug bei allen Simulationen 50 nm.	97
Abbildung 4.29: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach Erhöhung der NaCl-Konzentration von 100 mM auf 150 mM.	99
Abbildung 4.30: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei einer Calciumkonzentrationen von 1.0 mM und unterschiedlicher Inkubationszeit. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz. Der mittlere Domänenradius betrug bei allen Simulationen 50 nm.	100

Abbildung 4.31: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen bei einer Calciumkonzentration von 0.5 mM und unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz.....	101
Abbildung 4.32: Zeitliche Resonanzfrequenzänderung eines 5 MHz-Quarzes nach der Zugabe von 0.4 μM Annexin A1 zu POPC/POPS (4:1)-Membranen einer Calciumkonzentration von 0.05 mM und unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die mit der Quarzmikrowaage gemessenen Daten sind in rot dargestellt, die durch Computersimulationen ermittelten Kurven in schwarz.....	102
Abbildung 4.33: Abhängigkeit der Bindungskonstanten K (A) und k_{irr} (B) von der Calciumkonzentration in halblogarithmischer Auftragung bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten.	106
Abbildung 5.1: Verlauf der ellipsometrischen Winkel Delta (■) und Psi (▲) in Abhängigkeit von der Wellenlänge für mikrostrukturierte DMPC-Bilayer mit der entsprechenden Anpassung nach Cauchy.	113
Abbildung 5.2: Ortsaufgelöste Schichtdickeninformation eines DMPC-Streifens auf Si/SiO ₂ bei verschiedenen Temperaturen. Die Größe der Bilder beträgt 70×140 μm^2	114
Abbildung 5.3: Verlauf der Schichtdicke d und der normierten Membranfläche $\Delta A/A$ eines strukturierten DMPC-Bilayers auf Si/SiO ₂ mit steigender (■) und sinkender (□) Temperatur. Die angegebenen Phasenumwandlungstemperaturen sind Ergebnisse der sigmoidalen Anpassung.....	115
Abbildung 5.4: A) Abhängigkeit der ellipsometrischen Winkel Delta (■, □) und Psi (■, □) vom Einfallswinkel vor (Optislid 1) und nach (Optislid 2) der Hydrophilisierung der Oberfläche. Linien sind Ergebnisse der Anpassung des optischen Modells für variierende Schichtdicken d_1 und d_2 an die experimentellen Daten. B) Aus A) resultierende Schichtdicken für ein Optislid vor (1) und nach (2) der Hydrophilisierung.....	117
Abbildung 5.5: Vergleich der normierte Verläufe der Schichtdicke (A) und der Membranfläche (B) eines DMPC-Streifens mit der Temperatur auf einem Optislid mit einem Si/SiO ₂ -Substrat.	118
Abbildung 5.6: „Delta-Map“ eines DMPC-Lipidstreifens auf einem Optislid bei A) $T = 21.0\text{ }^\circ\text{C}$, B) $T = 40.6\text{ }^\circ\text{C}$	119
Abbildung 5.7: Vergleich der temperaturabhängigen Schichtdicke (A), der normierten Schichtdicke (B) und der Bilayerausdehnung (C) von DMPC (●), diC ₁₅ PC (□) und DPPC (■). Die angegebenen Phasenumwandlungstemperaturen sind die Ergebnisse der sigmoidalen Anpassungen (—).	120
Abbildung 5.8: Anteil der Moleküle in der fluiden Phase während der Phasenumwandlung als Funktion von $1/T$ für DMPC (●), diC ₁₅ PC (□) und DPPC (■). A) Auswertung der Membrandicke, B) Auswertung der Membranfläche. Die linearen Fits um T_m sind in rot dargestellt.....	121
Abbildung 5.9: A) Strukturformel von Cholesterol mit hydrophilem und hydrophobem Bereich. B) Orientierung von Cholesterol in einer Lipidmembran.....	123

- Abbildung 5.10: Allgemeines Phasendiagramm für Lipidmembranen aus Phosphatidylcholinen und Cholesterol. Die laterale Struktur und Organisation der Membranen bestehend aus geordneten und ungeordneten Lipidketten sowie Cholesterol ist schematisch dargestellt. Der kritische Punkt ist durch einen Stern markiert. Die Cholesterol-Konzentration ist in mol% angegeben. T = Temperatur, T_m = Phasenübergangstemperatur.¹⁰⁵ 124
- Abbildung 5.11: Ausschnitt aus einer DPPC-Membran mit A) 11 mol% Cholesterol und B) 50 mol% Cholesterol. Die Cholesterol-Moleküle sind in grün dargestellt.¹⁰⁷ 125
- Abbildung 5.12: Ellipsometrische Schichtdickenaufnahmen von zwei mikrostrukturierten Lipidstreifen aus DMPC (links) und DMPC/Cholesterol (60:40, rechts) auf Si/SiO₂ bei verschiedenen Temperaturen. A) $T = 15.6$ °C, B) $T = 23.7$ °C, C) $T = 29.4$ °C, D) $T = 34.6$ °C, E) $T = 40.2$ °C, F) $T = 51.1$ °C. Alle Aufnahmen sind $125 \times 140 \mu\text{m}^2$ groß, der weiße Balken indiziert die Position der unter den Aufnahmen gezeigten Profile. Die Höhenskala ist für alle Aufnahmen gültig. 126
- Abbildung 5.13: Verlauf der normierten Schichtdicke und der normierten Membranfläche mit der Temperatur für DMPC/Cholesterol - Gemische. Der Cholesterolgehalt beträgt zwischen 0 und 40 mol%. 127
- Abbildung 5.14: Ein DPPC-Molekül zusammen mit zwei Ethanol-Molekülen aus einer MD-Simulation einer voll hydratisierten Lipidmembran. Die Ethanol-Moleküle sind nahe an den Sauerstoff-Atomen des Phosphorsäureesters positioniert und es bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus.¹¹⁴ 128
- Abbildung 5.15: Ellipsometrische Schichtdickenbilder von strukturierten DMPC-Membranen auf Si/SiO₂. A) $T = 22$ °C, B) $T = 40$ °C, C) $T = 40$ °C, nach Zugabe von Ethanol, D) $T = 18$ °C, nach Zugabe von Ethanol, E) $T = 40$ °C, nach Spülen mit ethanolfreiem Puffer, E) $T = 18$ °C, nach Spülen mit ethanolfreiem Puffer. Alle Aufnahmen sind $140 \times 80 \mu\text{m}^2$ groß, der weiße Balken indiziert die Position der unter den Aufnahmen gezeigten Profile. Die Höhenskala ist für alle Aufnahmen gültig. 131
- Abbildung 5.16: Mittlere Membranschichtdicken von DMPC bei unterschiedlichen Temperaturen mit und ohne Ethanol. 132
- Abbildung 5.17: SFM-Aufnahmen eines mikrostrukturierten DMPC-Bilayers auf Glas bei A) $T = 23.0$ °C und B) $T = 29.0$ °C. Bei der Ausdehnung der Membran auftretende Defekte sind durch Pfeile markiert. 135
- Abbildung 5.18: A) „Delta-Maps“ von mikrostrukturierten Lipidmembranen aus diC₁₅PC auf Si/SiO₂ bei verschiedenen Temperaturen. Die Größe der Bilder beträgt $200 \times 300 \mu\text{m}^2$. B) Temperaturabhängiger Verlauf der berechneten Schichtdicke der Lipidmembran für die in A) gezeigte Probe. 136
- Abbildung 5.19: SFM-Aufnahmen von fluorinierten DPPC-Lipidstreifen. A) Bei Raumtemperatur durchgeführte Mikrostrukturierung führt zu einer Schicht aus intakten Vesikeln. B) Höhenprofil an der in A) eingezeichneten Linie. C) Nach Aufheizen und Abkühlen der in A) gezeigten Probe hat sich ein stark ausgedehnter Lipidstreifen gebildet, auf dem noch einzelne intakte Vesikel zu erkennen sind. D) Eine bei 65 °C durchgeführte Mikrostrukturierung führt zur direkten Bildung eines Lipidbilayers. Daneben ist die Oberfläche von PDMS-Resten bedeckt. 137

A.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schichtdickenbereiche, Brechungsindizes und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Materialien.....	28
Tabelle 2: Molmassen und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine Annexin A1 und Annexin A2t.....	47
Tabelle 3: Strukturformeln, Nomenklatur und Eigenschaften der verwendeten Lipide.....	49
Tabelle 4: Domänenradius und mittlere Belegung mit Annexin A1 auf POPC/POPS-Membranen bei verschiedenen Zusammensetzungen und Calciumkonzentrationen.....	75
Tabelle 5: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche für eine Inkubationszeit von 10 Minuten und konstantem mittlerem Domänenradius.....	94
Tabelle 6: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche für eine Inkubationszeit von 10 Minuten und konstanter Domänenanzahl.....	96
Tabelle 7: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche für eine Inkubationszeit von 30 Minuten und konstantem mittlerem Domänenradius.....	98
Tabelle 8: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche bei einer Calciumkonzentration von 1.0 mM.....	100
Tabelle 9: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche bei einer Calciumkonzentration von 0.5 mM.....	102
Tabelle 10: Aus den Computersimulationen durch Anpassung an die experimentellen Frequenzverläufe ermittelte kinetische Parameter und Eigenschaften der Simulationsoberfläche bei einer Calciumkonzentration von 0.05 mM.....	103
Tabelle 11: Kooperativitätsparameter σ und Größe der kooperativen Einheitszelle n für DMPC, diC ₁₅ PC und DPPC.....	122
Tabelle 12: Maximale relative Schichtdicken- ($\Delta d_{\text{norm}}^{\text{max}}$) und Flächenänderungen ($\Delta A_{\text{norm}}^{\text{max}}$) von DMPC/Cholesterol-Streifen auf Si/SiO ₂	127
Tabelle 13: Zusammenfassung der Werte für die Phasenumwandlungstemperatur T_m und die Größe der kooperativen Einheitszelle für DMPC, diC ₁₅ PC und DPPC. Vergleich der mit Hilfe der bildgebenden Ellipsometrie (ELL) gemessenen Werte für festkörperunterstützte Membranen mit Literaturwerten für multilamellare Vesikel (MLV) und kleine unilamellare Vesikel (SUV).....	133

A.3 Abkürzungsverzeichnis

ASF	Funktion für die verfügbare Oberfläche (<i>available surface function</i>)
ATR-FTIR	<i>attenuated total reflection - Fourier transform infrared spectroscopy</i>
BSA	Albumin aus Rinderserum (<i>bovine serum albumin</i>)
BVD	Butterworth van Dyke
CCD	<i>charge coupled device</i>
CLSM	konfokale Fluoreszenzmikroskopie (<i>confocal laser scanning microscopy</i>)
CPWR	<i>coupled plasma-waveguide resonance</i>
diC ₁₅ PC	1,2-Dipentadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPN	<i>dip-pen</i> Nanolithographie
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DTT	1,4-Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykol-tetraessigsäure
FPLC	Flüssigchromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
kDa	Kilodalton
Mes/NaOH	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
μCP	Mikrokontaktdrucken (<i>micro contact printing</i>)
MIMIC	Mikroformen in Kapillaren (<i>micromolding in capillaries</i>)
MLV	Multilamellare Vesikel
NHS	Succinimid
OWLS	<i>optical waveguide light mode spectroscopy</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-L-serin]
QCM	Quarzmikrowaage (<i>quartz crystal microbalance</i>)
QCM-D	Dissipative Quarzmikrowaage-Technik
ROI	<i>region of interest</i>
RSA	Zufällige sequentielle Adsorption (<i>random sequential adsorption</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFM	Rasterkraftmikroskop (<i>scanning force microscope</i>)
SNOM	<i>scanning near-field optical microscopy</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
STM	Rastertunnelmikroskopie (<i>scanning tunnelling microscopy</i>)
SUV	kleine unilamellare Vesikel (<i>small unilamellar vesicle</i>)
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid

A.4 Chemikalien

Ammoniak (28 %), $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma, Taufkirchen
BSA	Fluka, Neu-Ulm
Calciumchlorid-dihydrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Cholesterol	Sigma, Taufkirchen
diC ₁₅ PC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (USA)
DMPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (USA)
DPPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (USA)
DTT	Sigma, Taufkirchen
EGTA (Tetra-Natriumsalz)	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Fluka, Neu-Ulm
Natriumazid, NaN_3	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid, NaCl	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid, NaOH	Sigma, Taufkirchen
1-Oktanthiol	Aldrich, Taufkirchen
PDMS	Dow Corning, Midland, MI (USA)
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (USA)
POPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL (USA)
Salzsäure (37 %), HCl	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Tris/ HCl	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (35 %), H_2O_2	Sigma, Taufkirchen

A.5 Geräte und Materialien

Ellipsometrie

EP3-SW Ellipsometer	Nanofilm Technologie, Göttingen
Optislides	Nanofilm Technologie, Göttingen
Objektiv, 20×/0.35 CF-Plan	Nikon, Tokio (Japan)
Silizium-Wafer	Wacker Siltronic, München
Flüssigkeitsmesszelle	Nanofilm Technologie, Göttingen
Liquid handling - System	Nanofilm Technologie, Göttingen
Peristaltik-Pumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Tygon-Pumpschläuche	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
PFA-Schläuche	Upchurch scientific, Oak Harbor, WA (USA)
HPLC-Schlauchverbinder	Ziemer Chromatographie, Langerwehe
Umwälz-Thermostat	VWR International, Darmstadt

Rasterkraftmikroskopie

Dimension 3100 Nanoscope IIIa	Veeco, Santa Barbara, CA (USA)
OMCL-TR400PSA Cantilever	Olympus Optical Co., Tokio (Japan)
Silizium-Wafer	Wacker Siltronic, München
Teflon-Flüssigkeitsmesszelle	Eigenbau

Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskop DM IRE2 mit konfokaler
Laser-Raster Technik TCS-SL

Leica Microsystems, Wetzlar

Objektive: 10×/0.3 HC PL Fluotar
20×/0.5 HC PL Fluotar

40×/1.25-0.75 OIL HCX PL APO

Leica Microsystems, Wetzlar

Glasträger

Plano, Wetzlar

Petrischalen, PS, steril

Greiner Bio-one, Kremsmünster
(Österreich)

Quarzmikrowaage

Oszillatorschaltkreis TTL SN74LS124N

Texas Instruments, Dallas, TX (USA)

Frequenzzähler 53181A

Hewlett-Packard, San Diego, CA (USA)

Spannungsquelle HP E3630A

Hewlett-Packard, San Diego, CA (USA)

Peristaltik-Pumpe

Ismatec, Wertheim-Mondfeld

Quarzresonatoren, 5 MHz, AT-cut

KVG, Neckarbischofsheim

Kalrez-Dichtringe

DuPont Co., Wilmington, DE (USA)

3-Wege-Hahn

Upchurch scientific, Oak Harbor, WA
(USA)

Sonstiges

Purelab Plus Reinstwasseranlage

ELGA Labwater, Celle

Plasmareiniger

Harrick, Ossining, NY (USA)

Schüttler, REAX Top

Heidolph, Schwabach

Miniextruder, LiposoFast

Avestin, Mannheim

Polycarbonatmembranen

Avestin, Mannheim

UV-Spektrometer Cary 100

Varian, Palo Alto, CA (USA)

Ultraschall-Becherresonator

Bandelin, Berlin

Texas Red-X protein labeling kit

Molecular Probes, Eugene, OR (USA)

Dialyseschläuche VISKING

Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

Texas Red-DHPE

Molecular Probes, Eugene, OR (USA)

Bodipy-C₁₂HPC

Molecular Probes, Eugene, OR (USA)

Sonstige Verbrauchsmaterialien

VWR International, Darmstadt

