

**Untersuchung multimerer  
Proteinkomplexe mit  
oberflächenanalytischen und  
röntgenspektroskopischen Methoden**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Christian Beck

geboren am 01. Juli 1979 in Simmern

Mainz, 2011





Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2011

## **Eigenständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Die verwendeten Quellen und Hilfsmittel sind im Literaturverzeichnis und im Anhang vollständig aufgeführt.

Mainz, August 2011

---

Christian Beck

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Multimere Proteinkomplexe .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Toxine .....	3
1.1.1.1 Staphylococcus aureus $\alpha$ -Toxin .....	4
1.1.1.2 AFM an biologischen Proben .....	9
1.1.1.3 Biologische Membranen .....	9
1.1.1.3.1 Phospholipide .....	11
1.1.1.4 Modellmembranen .....	12
1.1.1.5 Liposomen .....	12
1.1.1.6 Festkörperunterstützte Membranen .....	13
1.1.1.7 Phasenseparation in PhosphoLipidmembranen .....	14
1.1.1.8 Ziele der Untersuchungen mit $\alpha$ -Toxin .....	15
1.1.2 Hämocyanine .....	16
1.1.2.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie .....	20
1.1.2.2 Röntgenabsorptionsspektroskopie an Hämocyaninen .....	21
1.1.2.3 Die Messkammer Liquidrom .....	23
1.1.2.4 Ziele der Untersuchungen mit Hämocyanin .....	26
<b>2 MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Chemikalien &amp; Geräte .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Verwendete Chemikalien .....	27
2.1.2 Verwendete Geräte .....	28
2.1.3 Verwendete Oberflächenmaterialien .....	29
2.1.4 Verwendete Phospholipide .....	29
2.1.5 Verwendete Puffer .....	29
<b>2.2 Proteine .....</b>	<b>30</b>
2.2.1 $\alpha$ -Toxin aus <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
2.2.2 Hämocyanin aus <i>Homarus americanus</i> .....	31
<b>2.3 Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.3.1 Herstellung von Vesikeln und oberflächenunterstützten Modellmembranen .....	32
2.3.1.1 Herstellung großer Vesikel .....	33
2.3.1.2 Herstellung riesiger Vesikel .....	36
2.3.1.3 Herstellung oberflächenunterstützter Modellmembranen .....	37
2.3.2 Rasterkraftmikroskopie .....	41
2.3.3 Quarzmikrowaage mit Dissipation .....	46
2.3.4 Fluoreszenzmikroskopie .....	49
2.3.5 Dynamische Lichtstreuung .....	50
2.3.6 Röntgenabsorptionsspektroskopie .....	51
2.3.7 Ultrazentrifugation .....	52

2.3.8	Absorptionsspektroskopie.....	53
2.3.9	Gelelektrophorese .....	55
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE ALPHA-TOXIN .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung des Porenbildungsmechanismus des <math>\alpha</math>-Toxins aus <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>56</b>
3.1.1	Oberflächenunterstützte Modellmembranen aus einer Phospholipid-Komponente .....	59
3.1.1.1	Überprüfung des Spreitungsverhaltens mit QCM-D .....	59
3.1.1.2	Darstellung oberflächenunterstützter Modellmembranen mit AFM .....	61
3.1.2	Ternäre Lipidsysteme aufgebaut aus Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Cholesterol .....	64
3.1.2.1	Überprüfung des Spreitungsverhaltens zwitterionischer, ternärer Vesikel mit QCM-D .....	65
3.1.2.2	Darstellung zwitterionischer, ternärer Modellmembranen mit AFM .....	69
3.1.2.3	Einfluss der AFM-Tastspitze auf das Phasenseparationsverhalten .....	74
3.1.2.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zwitterionischer, ternärer Lipidsysteme .....	76
3.1.2.5	Fluoreszenzmikroskopie an ternären Vesikeln .....	77
3.1.2.6	Untersuchung zwitterionischer, ternärer Modellmembranen mit Fluoreszenzmikroskopie	79
3.1.3	Ternäre Lipidsysteme aufgebaut aus Sphingomyelin und Cholesterol, sowie Phosphatidylserin bzw. DOTAP .....	80
3.1.3.1	Überprüfung des Spreitungsverhaltens geladener, ternärer Vesikel mit QCM-D .....	82
3.1.3.2	Untersuchung geladener, ternärer Modellmembranen mit AFM .....	85
3.1.4	Höhenunterschiede zwischen Domänen der ternären Phospholipidsysteme I – V .....	88
3.1.5	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit Modellmembranen .....	89
3.1.5.1	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit oberflächenunterstützten Modellmembranen aus ePC .....	90
3.1.5.2	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit oberflächenunterstützten und phasenseparierten ternären Modellmembranen .....	94
3.1.5.2.1	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit ternären oberflächenunterstützten Modellmembranen aus ePC, eSM und Cholesterol .....	94
3.1.5.2.2	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit ternären oberflächenunterstützten Modellmembranen aus DOPS, PSM und Cholesterol .....	100
3.1.5.2.3	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit unbehandelten Micaoberflächen .....	105
<b>4</b>	<b>DISKUSSION ALPHA-TOXIN.....</b>	<b>107</b>
<b>4.1</b>	<b>Adsorptionsverhalten von Vesikeln unterschiedlicher Phospholipid-Komposition .....</b>	<b>108</b>
4.1.1	QCM-D-Versuche zum Adsorptionsverhalten von Vesikeln unterschiedlicher Lipid-Komposition	110
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung der SPB-Ausbildung mittels AFM .....</b>	<b>119</b>
4.2.1	Phospholipidsystem aufgebaut aus ePC .....	120
4.2.2	Ternäre, zwitterionische Phospholipidsysteme.....	122
4.2.3	Ternäre, geladene Phospholipidsysteme.....	128
<b>4.3</b>	<b>Interaktion des <math>\alpha</math>-Toxins mit homogenen und phasenseparierten SPBs .....</b>	<b>130</b>
4.3.1.1	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit homogenen ePC-Membranen .....	130
4.3.1.2	Co-Lokalisation des $\alpha$ -Toxins mit Raft-artigen Domänen phasenseparierter SPBs .....	134
4.3.1.2.1	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit zwitterionischen Lipidsystemen .....	135
4.3.1.2.2	Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit geladenen Lipidsystemen .....	138

4.4	Zusammenfassung.....	141
4.5	Ausblick.....	142
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE HÄMOCYANIN.....</b>	<b>143</b>
<b>5.1</b>	<b>Röntgen-L-Kanten-Spektroskopie am Hämocyanin aus <i>Homarus americanus</i> .....</b>	<b>143</b>
5.1.1	Vorarbeiten .....	144
5.1.2	Untersuchungen mit Röntgen-L-Kanten-Spektroskopie.....	145
5.1.2.1	Oxygeniertes und Deoxygeniertes Hämocyanin von <i>Homarus americanus</i> .....	145
5.1.2.2	Verfahren zur Deoxygenierung des Hämocyanins aus <i>Homarus americanus</i> .....	147
5.1.2.3	Untersuchung der Hämocyanin-Lösungen hinsichtlich möglicher Strahlenschäden .....	148
5.1.2.4	Vergleichende Messungen mit chemischen Testsystemen .....	150
<b>5.2</b>	<b>Darstellung der aktiven Zentren von Typ-3-Kupferproteinen anhand bekannter Röntgenkristallstrukturen, unter Berücksichtigung des Vorkommens von Wassermolekülen in der Kristallstruktur .....</b>	<b>153</b>
5.2.1	Wasser am aktiven Zentrum von Hämocyaninen .....	154
5.2.2	Wasser am aktiven Zentrum verschiedener Typ-3-Kupfer-Proteine .....	161
5.2.3	Zugänglichkeit von Wassermolekülen aus dem Lösungsmittel an das aktive Zentrum .....	165
<b>6</b>	<b>DISKUSSION HÄMOCYANIN.....</b>	<b>169</b>
<b>6.1</b>	<b>Interpretation der Hämocyanin-Spektren .....</b>	<b>169</b>
6.1.1	Oxygeniertes Hämocyanin.....	169
6.1.2	Deoxygeniertes Hämocyanin .....	171
6.1.3	Ursache der ungewöhnlichen Signatur des deoxygenierten Hämocyanins .....	173
6.1.3.1	Mögliche unvollständige Deoxygenierung der Hämocyanin-Lösungen .....	173
6.1.3.2	Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Hämocyanin-Proben .....	174
6.1.3.3	Ausschluss des Met-Zustandes .....	175
6.1.4	Wasser als Ligand von Typ-3-Kupferzentren .....	177
6.1.5	Chemische Vergleichslösungen .....	183
<b>6.2</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>185</b>
<b>6.3</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>186</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>187</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>II</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIV</b>

<b>12</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>XXXII</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>XXXVII</b>
<b>14</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>XXXVIII</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Multimere Proteinkomplexe

Proteine spielen eine wichtige Rolle in allen Bereichen des Lebens und bilden die Grundbausteine der Zelle. Ihre Aufgaben sind sehr zahlreich und eine lose Gliederung anhand ihrer Aufgabe und Funktion im Organismus kann gemacht werden. Man unterscheidet dabei Enzyme, Speicher- und Transportproteine, Struktur- und Membranproteine, sowie Toxine, Hormone und Schutzproteine. Multimere Proteinkomplexe nehmen im Bereich der Biowissenschaften eine bedeutende Position ein.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf zwei bestimmten Proteintypen, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind. Zum einen das Metalloprotein Hämocyanin aus dem amerikanischen Hummer (*Homarus americanus*), welches als Sauerstofftransporter dient und ein aktives Kupferzentrum besitzt. Zum anderen das porenbildende Membranprotein  $\alpha$ -Toxin aus dem gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus*, welches bestimmte Zielzellen lysiert und somit dem Nahrungserwerb des Bakteriums dient.

Um deren Struktur-Funktions-Beziehung aufzuklären, sollten, nach Fixierung der Proteine an Oberflächen, Experimente zu beiden Multimeren durchgeführt werden.

Im Fall des  $\alpha$ -Toxins sollten so neue Erkenntnisse bezüglich seines Binde- sowie Oligomerisierungs-Verhaltens an Phospholipidmembranen gewonnen werden. Bei diesem Prozess kommt es zur Zusammenlagerung der vom Bakterium abgesonderten, wasserlöslichen Protein-Monomere zu heptameren Transmembran-Poren [1]. Die Untersuchung der Protein-Membran-Interaktion, sowie der Ausbildung der dazu relevanten oberflächenunterstützten Modellmembranen (SPB – Supported-Phospholipid-Bilayer), erfolgte bevorzugt mit Rasterkraftmikroskopie (AFM – Atomic-Force-Microscopy) in wässrigem Medium. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei die Überprüfung der vermuteten, bevorzugten Interaktion der Toxine, mit speziellen, sogenannten Raft-artigen Membrandomänen [2].

Im Fall des Hämocyanins sollten dagegen röntgenspektroskopische Untersuchungen an oberflächenimmobilisierten Einzelmolekülen, bzw. Untersuchungen an Protein-Ensembles durchgeführt werden. Die in vorhergehenden Arbeiten gewonnenen Erkenntnisse bezüglich Proteinimmobilisation [3] und L-Kantensignaturen der unterschiedlichen Beladungszustände des Kupferzentrums [4,5], sollten vertieft und optimiert werden, und somit neue Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von Wassermolekülen auf den Valenzwechsel der Kupferatome, sowie deren Einfluss auf die Kooperativität der Hämocyanine gewonnen werden. Dazu wurden auch für die Hämocyanine AFM-Untersuchungen bezüglich der Proteinimmobilisation auf modifizierten Siliziumoberflächen angestrebt [3,6], welche in der Folge die Grundlage für L-Kantenspektroskopische Versuche liefern sollten. Ähnliche Experimente bezüglich der Hämocyanin-Immobilisation sind für modifizierte Goldoberflächen beschrieben [7].

Für Versuche an oberflächenimmobilisierten Proteinen bzw. Proteinkomplexen ist es sehr wichtig, dass die Funktion der Proteine erhalten bleibt, und die Prozesse der Multimerisierung (Toxin) bzw. kooperativen Sauerstoffbindung (Hämocyanin) ablaufen können. Nach Beginn dieser Arbeit wurde auf Grund der Verfügbarkeit einer neu entwickelten Messkammer am Bessy II (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung G.m.b.H. / Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB)), dem sogenannten *Liquidrom*, das Augenmerk von oberflächenimmobilisierten Hämocyaninen auf frei in Lösung vorliegende Hämocyaninen verlagert. Mit dieser Methode war es erstmals möglich Proteinlösungen mit Röntgen-L-Kantenspektroskopie unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen im Durchfluss zu untersuchen. Aussagen zur Belegung der bindenden Orbitale der Kupferatome sowie deren Interaktion mit Wassermolekülen und anderen möglichen Interaktionspartnern, sollten dadurch gewonnen werden [8,9]. Im Gegensatz zu den angestrebten Experimenten mit oberflächenimmobilisierten Hämocyaninen in einer statischen und abgeschlossenen Messzelle, bei der nur relativ wenige Moleküle mehr oder weniger permanent dem Röntgenlicht ausgesetzt werden, war es mit dieser Methode möglich durch die *in vivo*-nahen Versuchsbedingungen bessere Erkenntnisse zur tatsächlichen Interaktion des aktiven Kupferzentrums mit möglichen Bindungspartnern zu gewinnen. Außerdem konnte, durch den Einsatz relativ hoch konzentrierter Hämocyanin-Lösungen, eine Verbesserung in der Signalstärke gegenüber wenigen an der Oberfläche immobilisierten Molekülen erzielt und somit in der Folge eine klare Unterscheidung zwischen den Beladungszuständen und Aussagen hinsichtlich der Interaktion mit bestimmten Liganden (Sauerstoff, Wasser) getroffen werden.

### 1.1.1 Toxine

Als Toxine werden Stoffe bezeichnet die als Gifte auf Zellen wirken, und von Organismen (Tiere, Pflanzen, Mikroorganismen) produziert und abgesondert werden [10,11,12,13,14]. Verhalten und Funktion der Zielzelle werden dadurch beeinflusst oder modifiziert, wodurch die Zellen in ihrer ursprünglichen Funktionsweise gestört werden und diese nicht mehr ausüben können. Folge dieser Eingriffe kann das Absterben der betroffenen Zelle sein. Heutzutage sind hunderte von Toxinen bekannt, bei denen es sich in den meisten Fällen um Peptide bzw. Proteine handelt. Ihr Wirkmechanismus konzentriert sich dabei im Wesentlichen auf Zellmembranen, wobei es entweder zu einer Schädigung der Membran bzw. deren Komponenten kommt (Lipase- bzw. Protease-Funktion), oder die Membran als Barriere überwunden werden muss, so dass im Zellinnern Schädigungen und Einflussnahmen auf den Stoffwechsel und die regulatorische Prozesse der Zielzelle ausgeübt werden (Einflussnahme auf Zell-Signalprozesse).

Bakterielle Toxine werden in Exo- und Endotoxine unterteilt. Endotoxine sind thermolabil, aus Lipopolysacchariden aufgebaut und werden vornehmlich von gramnegativen Bakterien abgegeben. Die Freisetzung erfolgt oftmals durch Zerfall der die Proteine beherbergenden Mikroorganismen. Exotoxine sind ebenfalls thermolabile Proteine, die aber, im Gegensatz zu den Endotoxinen, von grampositiven Bakterien ausgeschieden werden [15]. Für porenbildende Toxine (PFTs – Pore-Forming-Toxins) werden zwei wesentliche Klassen unterschieden, die  $\alpha$ -PFTs sowie die  $\beta$ -PFTs. Das Unterscheidungsmerkmal ist dabei die Sekundärstruktur des Proteins, die für die Ausbildung des Transmembran-Abschnittes verantwortlich ist. Bei den  $\alpha$ -PFTs sind dies  $\alpha$ -helikale Strukturen, für die  $\beta$ -PFTs  $\beta$ -Faltblattstrukturen [11,13]. Typische Vertreter ersterer Toxin-Klasse sind die Colicine die von *Escherichia Coli* abgesondert werden, sowie das zur Familie der Actionoporine gehörende Equinatoxin aus der Seeanemone *Actinia Equina* [16,13]. Vertreter der Klasse der  $\beta$ -PFTs sind diverse Toxine aus *Staphylococcus aureus*, so unter anderem das LukF-PV und das hier untersuchte  $\alpha$ -Toxin [11,13], sowie das zur Familie der Aerolysine gehörende Enterolobin aus *Enterolobium contortisiliquum* [13]. Der komplexe strukturelle Aufbau vieler Toxine hat zur Folge, dass oftmals ein spezifischer Binde- bzw. Interaktionspartner für die Intoxikation von Bedeutung ist. So dient das Gangliosid GM1 als spezifischer Rezeptor für die Interaktion des Cholera-Toxins aus dem Bakterium *Vibrio cholerae* [17] mit der Membran der Zielzelle. Für das Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila*, genauso wie für das  $\alpha$ -Toxin aus *Clostridium septicum* ist der Interaktionspartner ein GPI-verankertes Protein [18,19,20].

Für das hier untersuchte  $\alpha$ -Hämolysin aus *Staphylococcus aureus* wird dagegen kein Proteinrezeptor, sondern eine bevorzugte Interaktion des Toxins mit bestimmten Bereichen der Zielmembran, sogenannten Raft-artigen Membran-Domänen, postuliert. Dabei handelt es sich um Lipid-Cluster, die bevorzugt aus Sphingomyelinen und Cholesterol ausgebildet sind und eine spezielle Kopfgruppe, das Phosphocholin, tragen. Außerdem weisen diese Abschnitte, gegenüber den sie umgebenden Membranbereichen, eine erhöhte laterale Packungsdichte auf, welche durch eine spezielle Interaktion der beteiligten Moleküle zustande kommt.

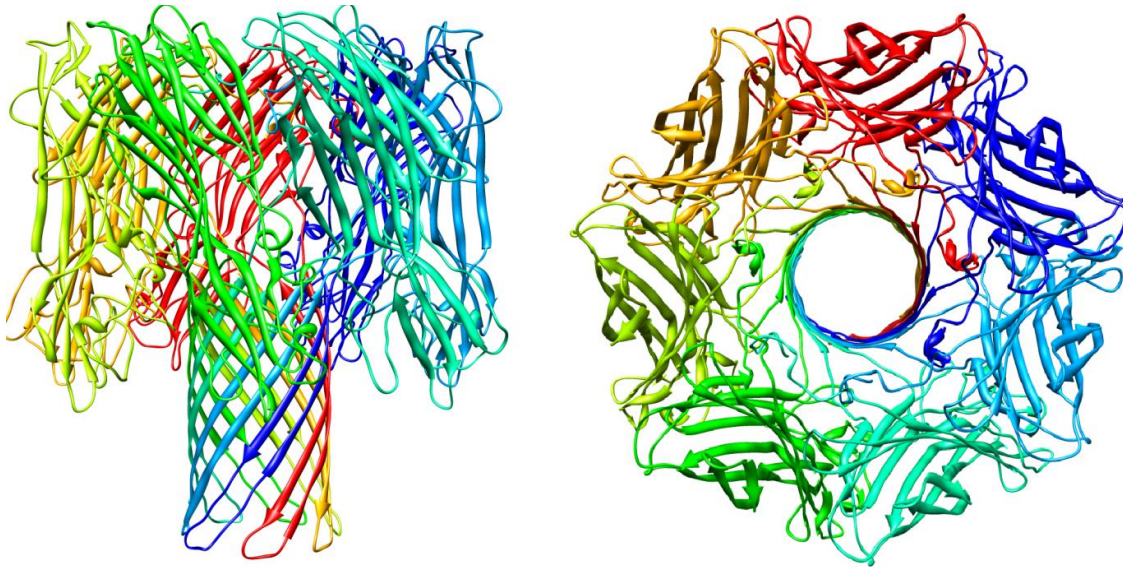
In dieser Arbeit wurde das  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* hinsichtlich seines Porenbildungsmechanismus, und vor allem bezüglich der Art und Weise seiner Interaktion mit der Zielmembran, untersucht.

#### **1.1.1.1 *Staphylococcus aureus* $\alpha$ -Toxin**

Bei *Staphylococcus aureus* handelt es sich um ein gram positives Bakterium, welches schon seit langer Zeit Gegenstand naturwissenschaftlicher- und medizinischer Untersuchungen ist. Erste Arbeiten über diesen Organismus wurden bereits vor über 120 Jahren durchgeführt. Der Chirurg Ogston identifizierte *Staphylococcus aureus* als Krankheitserreger und stellte Zusammenhänge zwischen dem Bakterium und Entzündungen in Folge von Blutvergiftungen her [21]. In den Jahrzehnten nach der Entdeckung des Pathogens wurde deutlich, dass es eine der am weitesten verbreiteten Ursachen bakterieller Infektion beim Menschen darstellt und eine breite Palette an Krankheiten auslöst. Das Bakterium kommt beim Menschen häufig auf der Haut [22] oder den Nasenschleimhäuten vor, und gehört dort zur natürlichen Flora. Durch Absonderung von Toxinen kann es zur Pathogenität kommen, was sich im Auftreten von Eiterbeulen, Lungenentzündungen, Knochenmarks- und Hirnhautentzündungen, dem toxischen Schock Syndrom und Sepsis äußert. Nicht alle Stämme des Bakteriums sind dabei pathogen und es hängt wesentlich von der physiologischen Verfassung des Trägers ab, ob, und in welchem Maße sich die Pathogenität äußert. Im schlechtesten Fall kann der Tod des Trägers die Folge sein. Bekannte Toxine aus *Staphylococcus aureus* sind die Enterotoxine A-E, die Exotoxine  $\alpha$ - $\delta$ , sowie die Koagulase. Auch heute kann es immer wieder zu Epidemien durch das Bakterium kommen [23], diese bleiben dabei aber in der Regel lokal begrenzt.

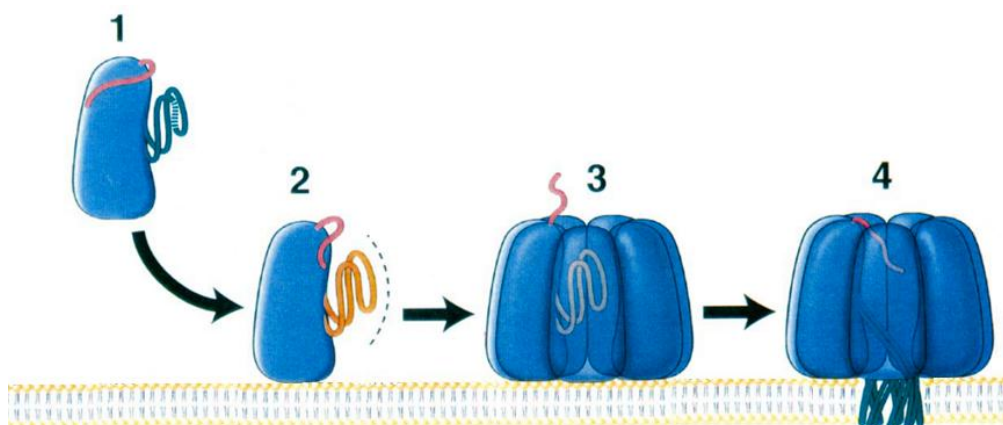
Eine ernste Gefahr im klinischen Bereich geht durch die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen einiger Stämme aus [24]. Gegenüber Methicillin und Oxacillin bestehen bekannte Resistenzen. Sie werden dementsprechend als Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Oxacillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (ORSA) bezeichnet. Diese Tatsachen machen den Erreger gegenwärtig zu einem weltweiten Problem. Neben dem Auftreten dieser Resistenzen liegt die eigentliche Gefahr durch das Bakterium darin, dass es ein breites Spektrum an Toxinen absondert, welche die Zellmembranen der Wirtszelle angreifen und lysieren können. Durch diesen Prozess gewinnt *S. aureus* Nährboden für sein eigenes weiteres Wachstum. Von den oben genannten abgesonderten Agentien ist das  $\alpha$ -Toxin ( $\alpha$ -Hämolyisin) das bedeutendste. Sein Name kommt von seiner Eigenschaft eine hämolytische Wirkung auszuüben. Es wird von vielen *S. aureus*-Stämmen ausgeschüttet [25] und hat auf viele Säugetierzellen eine toxische Wirkung. Die Virulenz der meisten, wenn auch nicht aller Stämme, geht auf dieses Toxin zurück [26].

Der Genabschnitt (hla) der für das Protein codiert wurde bereits vor mehr als 20 Jahren kloniert [27]. Das Gen steht unter der Kontrolle eines akzessorischen Genregulators (agr), der bewirkt, dass es erst in einer relativ späten Phase des Wachstums des Bakteriums zur Expression kommt. Das fertige monomere Protein besteht aus 293 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa (33248 Da)[28]. Gewebsschädigungen und die damit verbundene Lyse der Wirtszellen werden durch die Anlagerung der wasserlöslichen  $\alpha$ -Toxin-Monomere an die Zellmembran verursacht, die sich dort zu Oligomeren zusammenlagern. Vor der Ausbildung der finalen Pore wird ein sogenannter Präporenzustand ausgebildet [29]. Durch eine Konformationsänderung dieser Präpore kommt es dann zur Ausbildung der die Wirtszellmembran durchspannenden Pore [30,31]. Der Porenkanal wird dabei von den Glycinreichen Abschnitten der Toxin-Monomere gebildet [32,33]. Die Lyse der Wirtszelle ist die Folge. Der heptamere Zustand des  $\alpha$ -Toxins ist durch seine Kristallstruktur beschrieben. Die Pore lag dabei in Micellen aus Deoxycholate (DOC) integriert vor, und konnte von Song et al. [31] mit einer Auflösung von 1,9 Å aufgelöst werden (Abbildung 1). Die Kristallstruktur des Monomers ist bisher noch nicht bekannt, jedoch konnte vor Kurzem die Struktur in Lösung präsentiert werden [34]. Diese wurde anhand der Kristallstruktur einer Untereinheit (Luk-F) des Leukozidins (Luk) über Homologie-Modellierung und Röntgenkleinwinkel-Streuung gewonnen [34].



**Abbildung 1:** Darstellung der heptameren Pore des  $\alpha$ -Toxins aus *S. aureus*. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm *Chimera* [35]. Die verwendete PDB-Datei war 7AHL [31]. Alle Untereinheiten des Heptamers sind unterschiedlich eingefärbt.

Die heptamere Struktur des  $\alpha$ -Hämolysin sowie die monomere Struktur des LukF bilden die Eckpunkte des Toxin-Porenbildungsmechanismus [1] (Schema Abbildung 2). Dabei wird das wasserlösliche Monomer vom Bakterium ins umliegende Medium abgegeben (Schritt 1). Von dort gelangt es mittels Diffusion zur Zielmembran wo die Anbindung erfolgt (Schritt 2). Durch laterale Bewegung an der Membran-Oberfläche finden die Monomere zueinander und oligomerisieren (Schritt 3). Durch die Zusammenlagerung von sieben Monomeren entsteht die Präpore und schließlich kommt es zur Ausbildung der die Membran durchspannenden Pore (Schritt 4).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Porenbildungsmechanismus - nach Olson et al 1999 [1]. Die vom Bakterium abgesonderten Monomere liegen zunächst frei in Lösung vor (1) bevor sie an die Zielmembran binden (2). Dort treffen mehrere Monomere aufeinander, lagern sich zu Oligomeren zusammen und bilden eine Präpore aus (3). Diese führt eine Konformationsänderung durch und die finale, die Membran durchspannende Pore, wird ausgebildet.

Weiterhin nicht vollständig geklärt ist die Frage nach einem möglichen Rezeptor, der die Bindung der  $\alpha$ -Toxin-Monomere an die Membran vermittelt. Unterschiede im Bindungsverhalten des Proteins an verschiedenen Zelltypen werfen Fragen auf. So kommt es je nach Zelltyp zu einer Sättigung des Bindungsverhaltens. Unterschiede zwischen Erythrocyten von Menschen und Kaninchen sind beschrieben [2]. In diesem Zusammenhang können hoch- und niederaffine Bindestellen unterschieden werden. Diese Erkenntnisse weisen auf das Vorhandensein eines Protein-Rezeptors hin. Ein solcher konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden. Zur Diskussion stand unter anderem der Anionen-Austauscher 1 (AE1 oder Band3), der vorherrschende Membran-Transporter in Erythrocyten-Membranen [36]. Diese Annahme konnte allerdings nicht bestätigt werden. Seit Neustem wird vermutet, dass ein peripheres Membranprotein, die Metallopeptidase ADAM 10, eine bedeutende Rolle bei der Bindung und Integration des  $\alpha$ -Toxins spielt [37].

Da eine Porenbildung auch an Membranabschnitten, lediglich zusammengesetzt aus Phosphatidylcholin (PC), erfolgen kann, liegt die Vermutung nahe, dass es einen klassischen Protein-, oder auch Glycolipid-Rezeptor nicht gibt [38,39], bzw. nicht die einzige mögliche Bindestelle für das Protein darstellt.  $\alpha$ -Toxin-Monomere sind auch in der Lage an das Phosphocholin-Fragment von Phospholipid-Molekülen zu binden, wie Watanabe et al. [39] zeigen konnte. Solche Kopfgruppen kommen in Zellmembranen vor allem bei den genannten Phosphatidylcholinen, sowie bei Sphingomyelinen vor. Beides sind weit verbreitete Bestandteile natürlicher Membranen. Für unterschiedliche Toxin-Konzentrationen kann die Bindung des Toxins demnach über zwei verschiedene Wege erfolgen. Liegt das Monomer dabei in einer geringen Konzentration vor, so bindet es an einen spezifischen Rezeptor. Liegt es dagegen in höheren Konzentrationen vor, kann eine unspezifische Anlagerung an die Membran erfolgen. In der Veröffentlichung von Valeva et al aus dem Jahre 2006 [2] wird vorgeschlagen, dass der Rezeptor als sogenannter Quasirezeptor zu betrachten ist, welcher durch die Zusammenlagerung bestimmter Lipid-Gruppen zu sogenannten „Rafts“, oder auch Domänen, gebildet wird.

Es existiert also sowohl eine hoch- als auch eine niederaffine Bindestelle, wobei die niederaffine Variante von der Phosphocholin-Kopfgruppe einzelner Lipide in der Membran gebildet wird, wohingegen eine dichte Gruppierung solcher Kopfgruppen zu einer hochaffinen Bindestelle führt. Dabei spielt der Einfluss des Cholesterols eine wesentliche Rolle. Cholesterol interagiert bevorzugt mit Phospholipiden die gesättigte Fettsäureschwänze tragen (u.a. Sphingomyelin).

Dabei interagiert das Ringsystem des Cholesterol mit den Kohlenwasserstoffketten der Fettsäureschwänze und es kommt zu einer dichteren Zusammenlagerung der beteiligten Moleküle [40]. Im Falle der Interaktion des Cholesterol mit dem Sphingomyelin kann außerdem eine Verkippung der Phosphocholin-Kopfgruppe erfolgen. Durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der freien Hydroxylgruppe des Cholesterol und dem Phosphatrest des Sphingomyelins wird die Phosphocholin-Kopfgruppe so positioniert, dass sie das Cholesterol-Molekül vom Umgebungsmedium abschirmt [41], und eine andere räumliche Position einnimmt. Diese veränderte Ausrichtung kann ein weiterer Grund für die verbesserte Interaktion der  $\alpha$ -Toxine mit diesen Raft-artigen Membranbereichen sein.

Zur Porenbildung an niederaffinen Bindestellen müssen die Toxin-Monomere in mikromolaren Konzentrationen vorliegen, wohingegen bei der hochaffinen Bindestelle Konzentrationen im unteren nanomolaren Bereich für die Porenbildung ausreichen [2]. Wie erwähnt nimmt Cholesterol in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle ein. Durch Experimente bei denen Modellmembranen Cholesterol entzogen wurde, kam es zum Verlust der hochaffinen Bindestelle, und die Toxine konnten nur noch mit niedriger Affinität binden [2]. Die Ursache für die unterschiedlichen Affinitäten liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die Protein-Monomere an der Membran oligomerisieren müssen, um eine Pore ausbilden zu können. Die Monomer-Bindung an die Kopfgruppe ist reversibel, und zur Ausbildung einer Toxin-Pore müssen zum Bindungszeitpunkt genügend Monomere auf einem bestimmten Raum an der Membranoberfläche vorhanden sein. Bei einer erhöhten Packungsdichte der Phosphocholin-Bindestellen in Clustern, sowie der damit einhergehenden kompakten Anordnung der Lipid-Moleküle innerhalb der Membran und der veränderten räumlichen Orientierung der Cholin-Kopfgruppe durch die Interaktion mit Cholesterol, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Toxin-Monomere finden, gegenüber der Monomer-Bindung an einzelnen über die Membran verteilte Kopfgruppen, deutlich erhöht.

Die hier beschriebenen Experimente sollten neue Erkenntnisse liefern, ob eine Oligomerisierung und Insertion der Toxine tatsächlich bevorzugt an solchen Raft-artigen Membranabschnitten erfolgt.

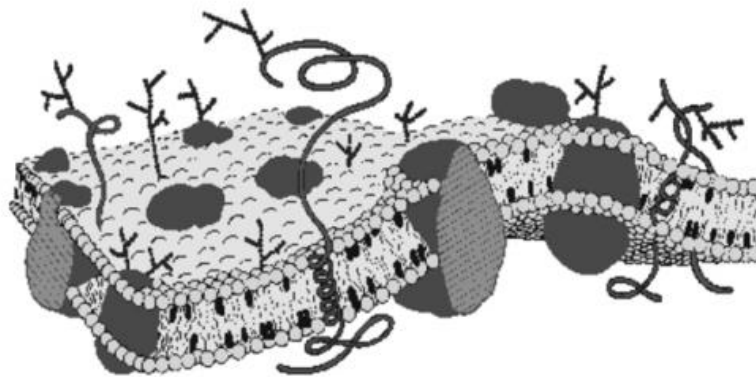
### **1.1.1.2 AFM an biologischen Proben**

Die Rasterkraftmikroskopie ist der Familie der Rastersondenmikroskope zuzuordnen, und wurde 1986 von Binning und Kollegen entwickelt [42]. Gegenüber dem zuvor entwickelten Rastertunnel-Mikroskop, welches eine Probe mit leitender Oberfläche benötigt, konnten nun erstmals auch nichtleitende Oberflächen untersucht werden. Abtasten und Abbildung von Oberflächenprofilen, sowie die Messung atomarer Kräfte auf der Nanometerskala wurden möglich. Auch Experimente in unterschiedlichen Medien können mit dem Rasterkraftmikroskop durchgeführt werden. Neben Messungen an Luft (gasförmiges Medium) sind auch Experimente in Flüssigkeiten und im Hochvakuum durchführbar. Für biologische Fragestellungen ist dabei der Flüssigkeitsmodus von Vorteil, da er eine *in-vivo*-nahe Umgebung liefern kann. Untersuchungen an so unterschiedlichen biologischen Objekten wie DNA [43], Proteinen [44,45,7], Membranen [46,47] und auch Zellen [48,49] konnten durchgeführt werden. Von Nachteil bei Messungen in Flüssigkeiten ist die höhere Störanfälligkeit der Probe, unter anderem durch mögliche Gaseinschlüsse im Medium, aber auch eine längere Stabilisationsdauer zu Messbeginn. Für meine Experimente war die Rasterkraftmikroskopie die Methode der Wahl, da sie sich für Untersuchungen von Protein-Membran-Interaktionen als sehr gut geeignet erwiesen hat und außerdem ein hohes örtliches Auflösungsvermögen liefert.

### **1.1.1.3 Biologische Membranen**

Lebende Zellen werden von Lipidmembranen gegenüber ihrer Umgebung begrenzt und in ihrem Inneren in unterschiedliche Kompartimente unterteilt. Durch die so gebildeten Reaktionsräume können verschiedenste Stoffwechselprozesse auf engstem Raum und getrennt voneinander ablaufen. Aufgebaut werden die Zellmembranen zu einem großen Teil aus amphiphilen Phospholipiden, die eine hydrophile Kopfgruppe und eine hydrophobe Schwanzgruppe aufweisen, sowie aus Proteinen und Kohlenhydraten. Sie bilden hochselektive Permeabilitätsschranken wodurch die Membran kein starres Gebilde und keine unüberwindliche Barriere darstellt, sondern ein selektives System, welches in der Lage ist zelluläre Prozesse sehr

präzise zu regeln. Membranen sind asymmetrisch aufgebaute, fluide Strukturen die von Singer & Nicolson in deren „Flüssig-Mosaik-Modell“ beschrieben wurden [50]. Sie sind demzufolge dynamische, flüssig-kristalline Lipiddoppelschichten in denen sich die integrierten Proteine in lateraler Richtung frei bewegen können. Die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide weisen dabei zur Peripherie, während die hydrophoben Kohlenwasserstoff-Schwänze ins Innere der Membran zeigen. Die eingebetteten Proteine übernehmen unterschiedlichste Funktionen, u.a. als Pumpen und Transporter sowie als Kanalproteine, die eine wichtige Rolle bei der ionischen und molekularen Zusammensetzung des Intrazellularraums einnehmen. Außerdem werden so diverse Prozesse wie Rezeptorbindung, Stofftransport, enzymatische Reaktionen und Zell-Zell-Wechselwirkungen über die Membranen abgewickelt. Periphere Proteine sind hingegen an der Membranoberfläche lokalisiert und werden dort u.a. durch elektrostatische Wechselwirkungen fixiert. Eine Lipiddoppelschicht kann praktisch eine impermeable Barriere ausbilden, die es für größere und geladene Moleküle nahezu unmöglich macht sie ohne Hilfe zu überwinden. Demnach liegt ein zweidimensionaler Aufbau aus Lipidmolekülen vor, die das Grundgerüst der Membran aufbauen. Durch den amphiphilen Charakter der Moleküle kommt es im wässrigen Medium zu einer spontanen Zusammenlagerung zu Doppelschichten mit einer Stärke von ca. 4-5 nm. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 3 gezeigt.



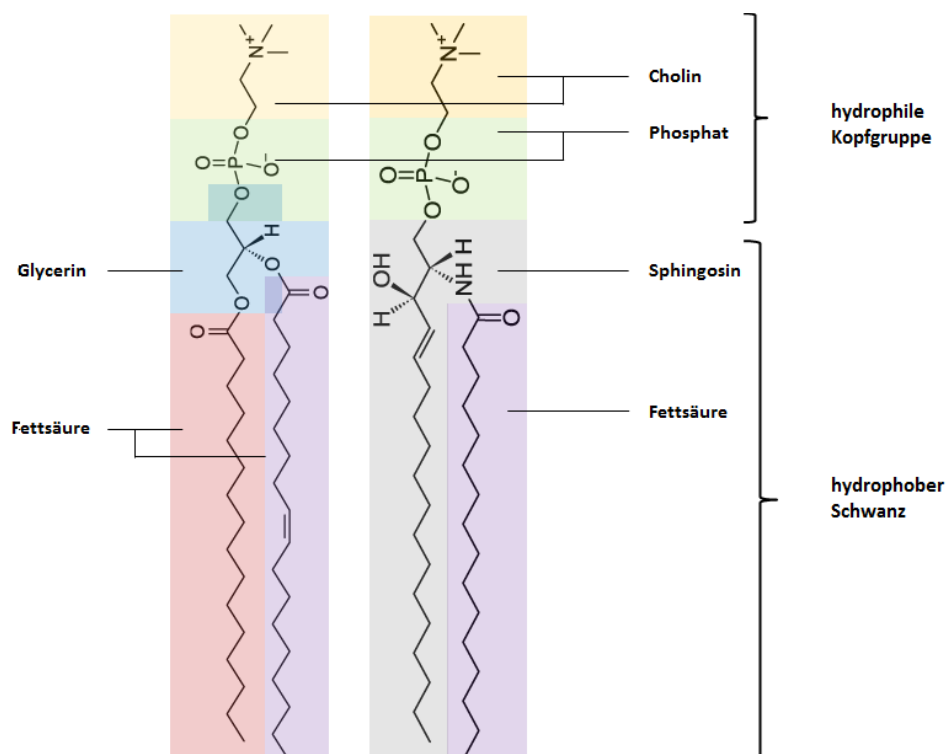
**Abbildung 3:** Schematische Darstellung einer Zellmembran nach dem Flüssig-Mosaik-Modell nach Singer und Nicolson [51].

Mittlerweile wurde das grundlegende Modell von Singer und Nicolson erweitert, und es konnte gezeigt werden, dass es innerhalb von biologischen Membranen und Modellmembranen zur Ausbildung von Mikrodomänen kommen kann. Diese sogenannten Lipid-Rafts setzen sich vor allem aus Sphingolipiden und Cholesterol zusammen und kommen unter anderem auf Grund

von Phasentrennungen innerhalb der jeweiligen Membran zu Stande. Eingeführt wurde das Modell der Lipid-Rafts von Simons et al. [52,53].

### 1.1.1.3.1 Phospholipide

Phospholipide sind amphiphile Moleküle und die wesentlichen Bestandteile der Biomembranen. Sie gliedern sich in eine hydrophile Kopfgruppe und in eine hydrophobe Schwanzgruppe. Zu den wichtigsten natürlich vorkommenden Lipiden gehören Phosphatidylcholine (Lecithine), Sphingomyeline, Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylserine.



**Abbildung 4: Strukturformel von Phosphatidylcholin (links) und Sphingomyelin (rechts).** Die einzelnen Komponenten sind farblich hinterlegt und beschriftet. Der Hauptunterschied dieser beiden Molekülgruppen ist das jeweilige Grundgerüst, an welches die Kopfgruppe (gelb) und die Fettsäureschwänze (rot & lila) gekoppelt sind. Das Grundgerüst wird für Phosphatidylcholine von Glycerin (blau) und für Sphingomyeline von Sphingosin (grau) gebildet. (Quelle: Avanti Polar Lipids - <http://www.avantilipids.com/>).

Auf Grund ihrer unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung können Glycerophospholipide (Phosphoglyceride) und Sphingomyeline als die beiden wesentlichen Gruppen unterschieden werden. Bei den Glycerolipiden wird das Grundgerüst aus Glycerin gebildet, welches über zwei Hydroxylgruppen mit zwei Fettsäuren verestert ist. Die dritte Hydroxylgruppe ist mit einer Phosphatgruppe verbunden, die wiederum mit einem endständigen Alkohol verestert ist.

Sphingomyeline leiten sich im Gegensatz zu den Glycerophospholipiden vom Sphingosin ab. Dabei binden sie über ihre Amid-Gruppe eine Fettsäure und über einen Phosphorsäureester an eine geladene Kopfgruppe, wie zum Beispiel Cholin. Eine vergleichende Übersicht bezüglich des Aufbaus dieser beiden Molekülgruppen ist in Abbildung 4 gezeigt. Links im Bild ist ein Phosphatidylcholin dargestellt, rechts im Bild Sphingomyelin. Der Hauptunterschied liegt im Grundgerüst der Moleküle, das für die Phosphoglyceride von Glycerin (blau) und für Sphingolipide von Sphingosin (grau) gebildet wird.

#### ***1.1.1.4 Modellmembranen***

Modellmembranen sind vereinfachte und in ihrer Komplexität reduzierte Nachahmungen biologischer Membranen. Sie bauen sich aus wenigen Komponenten, in der Regel aus Phospholipiden auf, und sind für die Untersuchung von Membraneigenschaften, oder auch der in ihnen enthaltenen Komponenten geeignet. Anwendungsbereiche für solche Systeme sind weit gefasst. Sie reichen von biophysikalischen Untersuchungen, über die Biotechnologie bis hin zu medizinischen Applikationssystemen [54,55]. Diverse Modellsysteme werden in diesem Kontext eingesetzt. Im Folgenden sind zwei davon aufgeführt die auch in dieser Arbeit Verwendung fanden.

#### ***1.1.1.5 Liposomen***

Liposomen (oder auch Vesikel) bilden sich spontan, wenn Phospholipide in eine wässrige Lösung überführt werden. Ihre Hülle besteht dabei aus einer (unilamellar) oder mehreren (multilamellar) Phospholipiddoppelschichten, welche ein wässriges Inneres umschließen. Diese Art von Modellmembran findet in der bereits erwähnten medizinischen Applikation Verwendung, wo Liposomen als Transportvehikel für Medikamente verwendet werden, aber auch bei Untersuchungen die Membranfunktionen und Protein-Rezeptor-Interaktionen betreffen. Bei diesen frei im Lösungsmittel vorkommenden Membransystemen bleiben zusätzlich die laterale Mobilität sowie der Austausch der Lipide zwischen den Membranfaltblättern, der sogenannte Lipid-„Flip-Flop“, erhalten.

### ***1.1.1.6 Festkörperunterstützte Membranen***

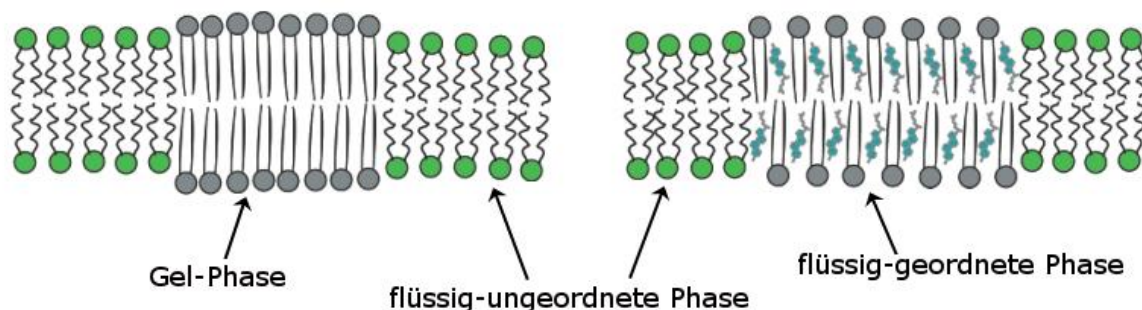
Festkörperunterstützte Membranen (SPB - Supported Phospholipid Bilayer) sind Modellsysteme bei deren Herstellung im einfachsten Fall eine Lipiddoppelschicht auf einem festen Untergrund aufgebracht wird. Geeignete Substrate sind dabei Siliziumdioxid, Mica (Glimmer) oder auch Titan und Gold. Durch dieses Modellsystem werden Untersuchungen mittels oberflächenanalytischen Methoden wie der Rasterkraftmikroskopie, der Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie oder auch der Fluoreszenzmikroskopie realisierbar, welche bei mobilen, frei in Lösungen vorliegenden Liposomen nicht einsetzbar wären. Durch die Fixierung auf einem festen Untergrund erlangen die Membranen ein hohes Maß an Stabilität, sind aber in der Folge teilweise in ihrer lateralen Bewegungsfreiheit und bezüglich des Lipid-Austauschs zwischen den Membranfaltblättern, eingeschränkt. Gut geeignet ist diese Art von Modellsystem für die Untersuchung von Eigenschaften und Funktionen integrierter Membranproteine, wobei die Membran als fixierende Matrix dient. In dieser Arbeit wurden festkörperunterstützte Membranen aus einer oder mehreren Phospholipid-Komponenten dazu verwendet, sie mit Rasterkraftmikroskopie, und teilweise auch mit Fluoreszenzmikroskopie auf ihr Spreitungsverhalten an Oberflächen und ihr Phasenseparations-Verhalten zu untersuchen. Außerdem wurden Wechselwirkungen und Bindevorgänge von Protein-Monomeren mit dem jeweiligen Membransystem auf diese Weise geprüft. In der Literatur ist oftmals von einer sehr dünnen Wasserschicht die Rede, die das Substrat von der Modellmembran trennt [56,57,58]. Diese Schicht erhält zu einem gewissen Grad die Beweglichkeit der Phospholipide in der Membran und bildet einen schmalen Platzhalter zwischen Modellsystem und Oberfläche. Für unsere Untersuchungen, bei denen es primär um die Bindung und Oligomerisierung der Toxine, nicht aber zwingend um deren Insertion in die Membran ging, war dieser Versuchsaufbau gut geeignet.

Zusätzliche Experimente bei denen ein weiterer Platzhalter zwischen Lipiddoppelschicht und Oberfläche integriert war, wurden ebenfalls durchgeführt. Verwendung fand dabei die Siliziumverbindung APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane). Dabei handelt es sich um ein kurzes Siliziummolekül, welches auf Mica und Siliziumdioxid-Oberflächen eine dünne Zwischenschicht ausbilden kann [59] und der Membran etwas Freiraum zum Substrat hin verschafft. Ziel dieser Oberflächenmodifikation war es das Durchdringen der fertigen Toxin-Pore durch die

oberflächenunterstützte Membran zu ermöglichen, ohne dass diese durch das feste Substrat blockiert wird.

### 1.1.1.7 Phasenseparation in PhosphoLipidmembranen

Phospholipide weisen einen spezifischen Schmelzpunkt bzw. Übergangstemperatur ( $T_M$ ) auf. Wird dieser über- oder unterschritten, so ändert sich die räumliche Ausdehnung bzw. die Struktur des Moleküls. Die Lage des Schmelzpunktes auf der Temperaturskala hängt dabei sehr stark von der Art der Fettsäureschwänze ab, die das Molekül trägt. Unterhalb der Übergangstemperatur liegen die Fettsäuren in gestreckter, geordneter Form vor, oberhalb des Schmelzpunktes dagegen in nicht gestreckter, ungeordneter Form. Handelt es sich ausschließlich um gesättigte Fettsäureschwänze, so bewegt sich der Schmelzpunkt bei relativ hohen Temperaturen (z.B. Palmitoyl-Sphingomyelin (PSM) – 42°C). Sind dagegen einer oder beide Fettsäureschwänze ungesättigt, so liegen die Schmelzpunkte der Moleküle bei wesentlich tieferen Temperaturen (z.B: Dioleoyl-Phosphatidylcholin (DOPC) -20°C; Palmitoyl-Phosphatidylcholin (POPC) - 2°C). Membranen, die aus unterschiedlichen Phospholipid-Komponenten aufgebaut sind weisen daher Bereiche auf, die bei einer definierten Temperatur unterschiedliche Phasenzustände einnehmen. Dadurch kommt es zur gegenseitigen Abgrenzung und zur Ausbildung von Domänen (Modellmembranen) oder Rafts (natürliche Membranen) innerhalb der Membran. Für Modellmembranen spielen dabei nur die definiert eingesetzten Phospholipid-Komponenten eine Rolle, wohingegen bei natürlichen Membranen die vorhandenen Proteine und das Zytoskelett der Zelle entscheidenden Einfluss auf die Phasenseparation nehmen können. Man unterscheidet grob drei verschiedene Phasen die von Phospholipiden bzw. Phospholipid-Gemischen eingenommen werden können.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung unterschiedlicher Membran-Phasen.** Von links nach rechts sind die Gel-Phase ( $s_0$ ), die flüssig-ungeordnete-Phase ( $l_d$ ) sowie die flüssig-geordnete-Phase ( $l_o$ ) dargestellt. Die blau dargestellten Cholesterin-Moleküle in der rechten Ansicht verleihen der flüssig-geordneten Phase eine erhöhte Fluidität. (Nach Johnston 2007 [60]).

Namentlich sind das die flüssig ungeordnete Phase ( $I_d$ ), die flüssig-geordnete Phase ( $I_o$ ) und die Gel-Phase ( $s_o$ ). Liegt die Umgebungstemperatur für alle Komponenten des betrachteten Membranbereichs oberhalb der Übergangstemperatur, liegt ausschließlich die flüssig-ungeordnete Phase vor. Liegt die Umgebungstemperatur unterhalb der Übergangstemperatur, liegt die Gel-Phase vor. Ist Cholesterol als Komponente in das System involviert können die beiden eben beschriebenen Phasen in eine dritte überführt werden, die flüssig-geordnete Phase. In Abbildung 5 sind alle drei beschriebenen Membranzustände schematisch dargestellt.

Sie vereinen die Fluidität der flüssig-ungeordneten Phase mit der Stabilität der Gelphase. Diese Eigenschaften werden dabei durch das Vorkommen von Cholesterol vermittelt, welches sich zwischen Phospholipiden einlagert, dabei aber bevorzugt mit den Molekülen interagiert, die gesättigte Fettsäureschwänze tragen. Dadurch wird der Gelphase eine höhere Fluidität gewährt, bei gleichzeitigem Erhalt der Stabilität, und die flüssig-geordnete Phase entsteht.

### **1.1.1.8 Ziele der Untersuchungen mit $\alpha$ -Toxin**

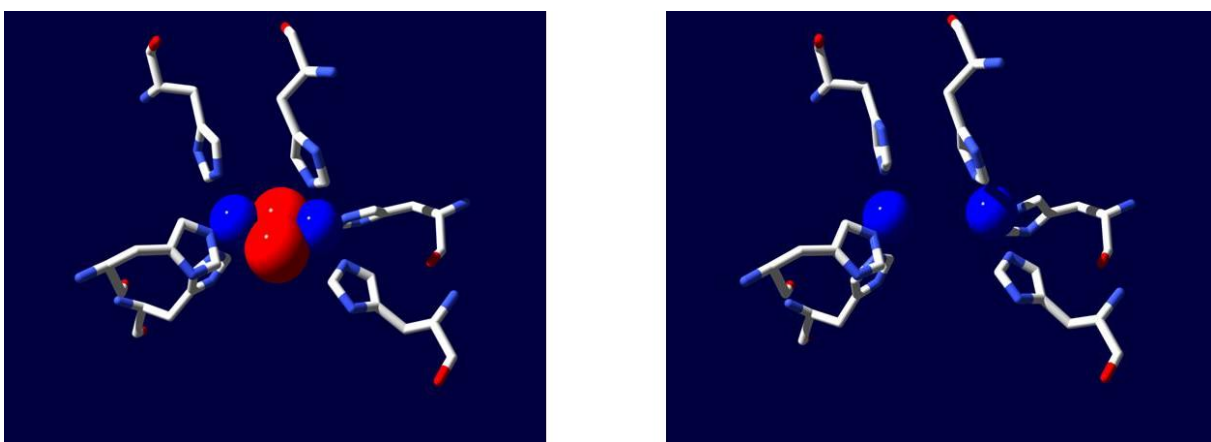
Für den Prozess der Oligomerisierung der Toxin-Monomere zu heptameren Präporen oder Poren ist es entscheidend welche Form der Proteinbindung erfolgt. Deshalb sollte in dieser Arbeit mittels oberflächenanalytischer Methoden wie Rasterkraftmikroskopie (AFM), Quarz-Mikrowaage mit Dissipation (QCM-D) und Fluoreszenzmikroskopie (FM) die Frage geklärt werden, ob dicht gepackt Bereiche in Modellmembranen einen „Quasirezeptor“ für die hochaffine Bindung des  $\alpha$ -Toxins darstellen [2].

Die hauptsächlich eingesetzten Versuchssysteme waren dabei oberflächenunterstützte Modellmembranen (SPB), die mittels der Methode der Vesikelspreitung auf verschiedenen unterstützenden Oberflächen aufgebracht wurden. Bei Verwendung nanomolarer Proteinkonzentrationen sollte dann eine Co-Lokalisation der oligomerisierten Proteinmoleküle mit den in den SPBs ausgebildeten Raft-artigen Membrandomänen erfolgen. Auf Grund der erhöhten Wahrscheinlichkeit der gegenseitigen Proteinfindung an dicht gepackt vorliegenden, Raft-artigen Membranbereichen, die außerdem eine spezielle Ausrichtung der Phosphocholin-Kopfgruppen aufweisen, gegenüber weniger dicht gepackten Membranbereichen, sollte ein

erhöhtes Auftreten von Präporen bzw. fertigen Poren an definierten Membranabschnitten die Folge sein. Eine solche Co-Lokalisation sollte mit Rasterkraftmikroskopie dargestellt werden. Für die Durchführung der AFM-Experimente wurden festkörperunterstützte Modellmembranen benötigt, die es ermöglichen deren Phasenverhalten zu untersuchen. Dabei wurden verschiedene Lipidkomponenten und Lipidkompositionen verwendet. Entscheidend für die Fragestellung der Co-Lokalisation waren Experimente mit ternären Lipidsystemen (drei Komponenten) welche in der Lage sind durch Phasenseparation Raft-artige Domänen innerhalb der Membran auszubilden. Diese sollen im Modellsystem die Rolle der natürlich vorkommenden hochaffinen Bindestellen darstellen.

### 1.1.2 Hämocyanine

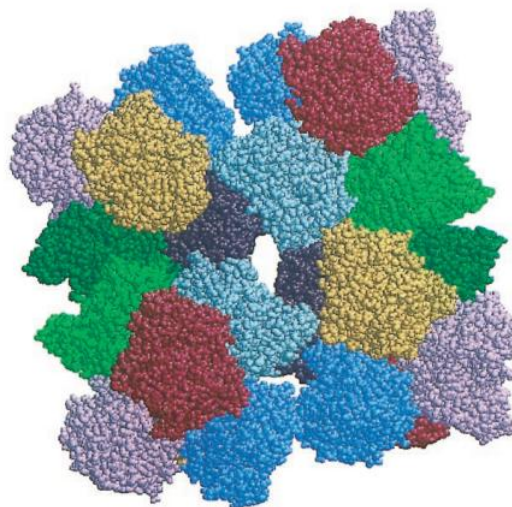
Hämocyanine sind hoch kooperative respiratorische Proteinmultimere, die in Arthropoden und Mollusken vorkommen [61,62]. Sie dienen dazu den Sauerstofftransport von den respiratorischen Oberflächen zu den Geweben zu verbessern. Im Gegensatz zum Hämoglobin der Vertebraten liegen Hämocyanine frei gelöst in der Hämolymphe vor und sind somit extrazelluläre Atmungsproteine. Ihre Molekulargewichte liegen artspezifisch zwischen 0.5 MDa und 9 MDa. Diese große Varianz gründet auf der stark variierenden Anzahl von Untereinheiten der verschiedenen Tierarten. Jede funktionelle Einheit ist in der Lage ein Sauerstoffmolekül zwischen zwei Kupferatomen im aktiven Zentrum zu binden. Die Kupferatome sind ihrerseits über je drei Histidin-Reste koordiniert. Eine schematische Darstellung, am Beispiel des aktiven Zentrums von *Limulus polyphemus*, findet sich in Abbildung 6.



**Abbildung 6:** aktives Zentrum der Typ-III-Kupferproteine im oxygenierten Zustand (links) und im deoxygenierten Zustande (rechts). Durch die Bindung des Sauerstoffmoleküls verändern die Kupferatome ihre Wertigkeit von Cu(I) nach Cu(II), was mit der Vergrößerung ihres Abstandes von 3,2 Å auf 4,7 Å einhergeht [63].

Durch die Bindung entsteht ein Sauerstoff-Kupfer-Komplex, der für die blaue Farbe des Proteins im sauerstoffbeladenen Zustand verantwortlich ist, im unbeladenen Zustand erscheint es dagegen fast farblos. Zur Superfamilie der Hämocyanine gehören mehrere Proteinklassen. Diese weisen zwar Sequenzähnlichkeiten auf, können sich in ihrer Funktionsweise aber deutlich unterscheiden [64,65]. Zusätzlich zu den Sauerstofftransportproteinen gehören zu dieser Familie noch die Hexamerine der Insekten, sowie die Pseudohämocyanine der Crustaceen [66,67,65].

Eine Untereinheit der Arthropoden-Hämocyanine hat typischerweise eine molekulare Masse von ca. 75 kDa [68,69]. Pro Untereinheit wird dabei ein Molekül Sauerstoff gebunden, wobei die Untereinheiten in einem streng stöchiometrischen Verhältnis vorliegen und jede ihren festgelegten Platz im oligomeren Protein besitzt [69,70]. Die Zusammenlagerung erfolgt zu Hexameren bzw. zu einem Vielfachen davon. Während in der Hämolymphe von Crustaceen 6mere und 2 x 6mere Hämocyanine vorkommen, findet man bei Cheliceraten auch 4 x 6mere bzw. 8 x 6mere. Allerdings sind auch 3 x 6-mere und 6 x 6mere beschrieben [69,71,72,73,74]. Als Beispiel ist hier das 24mere Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* gezeigt (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Hämocyanin aus *Eurypelma californicum*.** Das Protein liegt als 24mer vor und die hier dargestellte Struktur wurde durch SAXS/EM-Aufnahmen erhalten [70].

Die räumliche Struktur der Untereinheiten ist nierenförmig und durch drei Domänen mit unterschiedlichen Faltungsmotiven charakterisiert [68,69]. Domäne I liegt N-terminal, besteht aus 150-180 Aminosäuren und wird aus sechs bis sieben  $\alpha$ -Helices aufgebaut [72,71,69]. Sie schützt den Eingang zum aktiven Zentrum und spielt eine Rolle bei der Aufnahme von Liganden.

Domäne II wird aus 220 Aminosäuren gebildet, besteht nur aus  $\alpha$ -Helices, und bildet den zentralen Bereich der Untereinheit [69,75]. Sie enthält das aktive Typ-3-Kupferzentrum, in dem die zwei Kupferatome von insgesamt sechs Histidin-Resten koordiniert werden, die wiederum in einem Bündel aus zwei antiparallelen Paaren aus  $\alpha$ -Helices verankert sind [76]. Zwischen den Kupferatomen wird der Sauerstoff als Peroxid-Molekül in *side-on*-Koordination ( $\mu - \eta^2 : \eta^2$ ) gebunden [63,77]. Domäne III schließlich liegt am C-terminalen Ende der Untereinheit und wird aus einem siebensträngigen  $\beta$ -Faltblattmotiv ( $\beta$ -barrel) gebildet. Ihre Funktion ist bisher nicht gesichert belegt. Es wird ihr ein stabilisierender Einfluss auf die anderen beiden Domänen zugesprochen.

Außer den respiratorischen Eigenschaften der Hämocyanine werden noch weitere Funktionen beschrieben. So können die Proteine u.a. auch Speicherfunktionen wahrnehmen, wie sie zum Beispiel von den verwandten Hexamerinen der Insekten bekannt sind [65]. Außerdem leisten sie einen enormen Beitrag zur Pufferkapazität in der Hämolymphe der Tiere [78], wo sie den mit Abstand größten Teil der Proteine ausmachen. Des Weiteren können Hämocyanine auch zu Enzymen konvertiert werden [79,80,81,82,83,84,85,86], welche dann Phenoloxidase-Aktivität aufweisen. Eine große strukturelle Ähnlichkeit der aktiven Zentren von Phenoloxidasen und Hämocyaninen ist bekannt [87]. In beiden Fällen liegt ein Typ-3-Kupferzentrum vor, mit ähnlichen Mechanismen zur Aktivierung und Katalyse. Zu Phenoloxidasen aktivierte Hämocyanine spielen bei der Sklerotisierung nach der Häutung, der Wundheilung und bei der Abwehr von Infektionen eine bedeutende Rolle [88][86].

Mollusken besitzen ebenfalls Hämocyanine als respiratorische Proteine. Deren Untereinheiten falten sich in 7 bis 8 funktionelle Einheiten [61,89,90,91,92,93], welche aus zwei Domänen aufgebaut sind und eine Masse von 50 kDa aufweisen [89]. Der N-terminale Bereich entspricht der Domäne II der Arthropoden-Hämocyanine und ist aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut. Der C-Terminus entspricht der Domäne III der Arthropoden-Hämocyanine und besteht aus einem  $\beta$ -Barrel. Zehn dieser Untereinheiten verbinden sich zu einem Dekamer, der eine zylinderförmige Hohlstruktur ausbildet und eine fünfzählige Symmetrieachse aufweist. Je nach Tierart verbleibt das Hämocyanin-Molekül dabei als Decamer oder ordnet sich in der Hämolymphe zu Di-Decameren zusammen [94,61,95,92,93]. Ein solches Di-Decamer liegt z.B. beim Hämocyanin aus *Megathura crenulata* vor und hat eine Masse von 8 MDa.

Durch die oben beschriebene Zusammenlagerung der Untereinheiten kommt es für diese zu veränderten Affinitäten bezüglich des Liganden Sauerstoff. Die Bindungsstärke hängt dabei von der Anzahl bereits mit Sauerstoff besetzter Untereinheiten im Gesamtmolekül ab. Einzelne Untereinheiten beeinflussen durch ihren Ladungszustand das Verhalten der anderen Untereinheiten, die Kooperativität der Hämocyanine bei der Sauerstoffbindung wird so ermöglicht. Die beiden standardmäßig verwendeten Modelle zur Beschreibung der Kooperativität, das KNF-Modell [96] nach Koshland, Nemethy und Filmer, sowie das MWC-Modell [97] nach Monod, Wyman und Changeux, beschreiben das kooperative Verhalten von großen Protein-Komplexen wie den Hämocyaninen nur unzureichend. Zur besseren Beschreibung des Sauerstoffbindeverhaltens wurde deshalb das sogenannte „Nesting“-Modell vorgeschlagen [98,99]. Dabei werden den Hierarchien der verschiedenen Strukturen allosterische Gleichgewichte, wie  $L = \frac{T}{R}$  in Abbildung 8 zugeordnet. T bezeichnet dabei den nieder-affinen, und R den hoch-affinen Zustand. Für das Gesamtmolekül besteht ein Gleichgewicht zwischen den Zuständen R und T. Für die Halbmoleküle allerdings, welche die kleinste identische Einheit bilden, gibt es zusätzlich zwei unterschiedliche Zustände. Liegt das Gesamtmolekül beispielsweise im Zustand R vor, so können die Halbmoleküle die Zustände rR und tR einnehmen. Liegt es im Zustand T vor, so unterscheidet man die Zustände rT und tT. Decker und Sterner konnten zeigen, dass dieses Modell die Sauerstoffbindungseigenschaften für das Hämocyanin aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*, erklären kann [100].

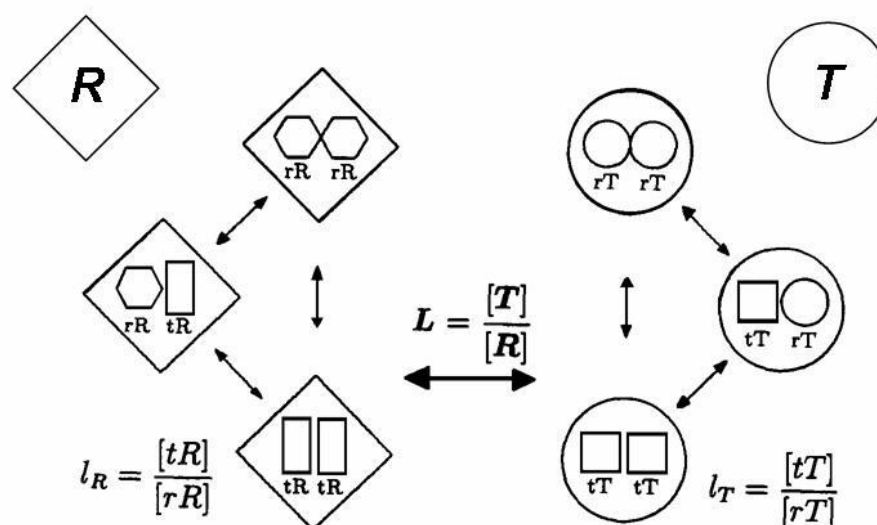


Abbildung 8: Mögliche Zustände der Sauerstoffbindung des Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum* nach dem Nesting-Modell [100].

Des Weiteren ist das Bindeverhalten von Sauerstoff für verschiedene Arten gut untersucht [101,102]. Auch der Einfluss verschiedener Effektoren, sowohl organischer als auch anorganischer Natur (u.a. Lactat, Koffein sowie TRIS, aber auch bivalente Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) ist Gegenstand der Forschung [103,104,105,106].

Das in dieser Arbeit verwendete Hämocyanin aus *Homarus americanus* ist ein aus zwei Hexameren aufgebauter 2 x 6mer. Strukturelle Beschreibungen wurden u.a. mit Röntgen-Kleinwinkelstreuung gemacht und sind in der Literatur beschrieben [107,108,109,110,104].

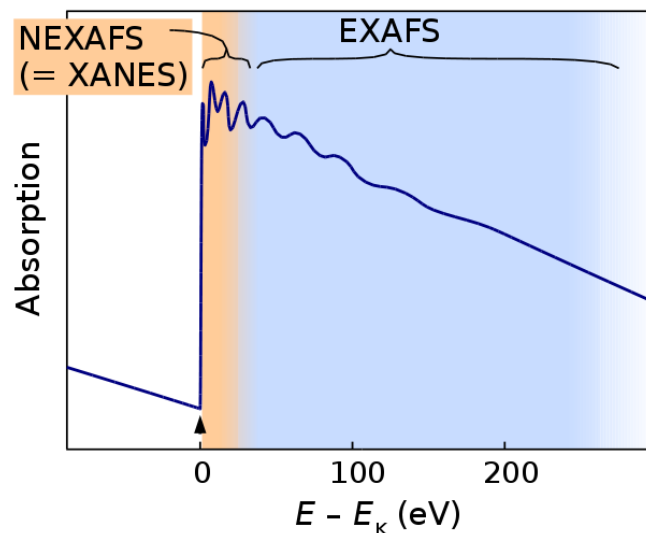
### **1.1.2.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie**

Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS: X-Ray Absorption Spectroscopy) ist ein Sammelbegriff für verschiedene Verfahren der Röntgenspektroskopie, unter anderem zur Untersuchung der Röntgenabsorptionsnahkantenstruktur (XANES: X-Ray-Absorption-Near-Edge-Structure), auch bekannt unter der Bezeichnung Nahkanten-Röntgenabsorptions-Feinstruktur (NEXAFS: Near-Edge-X-Ray-Adsorption-Fine-Structure), und der ausgedehnten Röntgenabsorption-Feinstruktur (EXAFS: Extended X-ray Absorption Fine Structure). Diese Methoden nutzen Röntgenstrahlung unterschiedlicher Energie um Elektronen aus kernnahen Atomschalen (K-Schale, L-Schale) anzuregen, bzw. herauszuschlagen. Der Begriff Röntgenstrahlung bezeichnet dabei elektromagnetische Wellen mit Energien von etwa 100 eV (weiche Röntgenstrahlung) bis zu über 100 keV (harte Röntgenstrahlung), was Wellenlängen im Bereich von Nanometern bis Picometern entspricht. Der Röntgenabsorptionsquerschnitt dient als Maß für das Verhältnis zwischen angeregten Elektronen pro Zeiteinheit und der Anzahl von Röntgenphotonen, die pro Zeiteinheit auf eine Einheitsfläche eingestrahlt werden. Er hängt also von der Wahrscheinlichkeit ab, dass ein Elektron aus seinem Anfangszustand in einen Endzustand übergeht. Wichtig ist dabei die Zustandsdichte der unbesetzten Zustände, die wiederum direkt resultiert aus der geometrischen und elektronischen Struktur in der Umgebung des angeregten Atoms. Der Endzustand kann dabei ein unbesetzter gebundener Zustand sein, der unterhalb der Austrittsschwelle des Elektrons ins Kontinuum liegt, oder ein Kontinuums-Zustand. Aussagen über die geometrische Koordination der untersuchten Atome (vorwiegend EXAFS an der K-

Kante), sowie bezüglich der Elektronenkonfiguration (XANES, L-Kante), können so gemacht werden.

### 1.1.2.2 Röntgenabsorptionsspektroskopie an Hämocyaninen

Zur Aufklärung der geometrischen und elektronischen Struktur von Metallzentren in Proteinen, ist Synchrotronstrahlung zur Aufnahme von Röntgenabsorptionsspektren der zu untersuchenden Metalloproteine seit den siebziger Jahren regelmäßig im Einsatz [111,112,113,114,115]. Allgemein wurden Untersuchungen an biologischen Proben bisher meist mit hochenergetischer, harter Röntgenstrahlung (mehrere keV) im Bereich der Röntgen-K-Kante durchgeführt. Die hohe Energie der verwendeten Strahlung ermöglichte den Einsatz von Küvetten an Luft, da eine ausreichende Penetrationstiefe der Strahlung durch die Probe und deren Umgebung gegeben war. Durch Auswertung kantenferner Oszillationen des aufgenommenen Absorptionsspektrums (Abbildung 9 – blau hinterlegt) konnten so Informationen bezüglich Geometrie und Struktur der angeregten Atome erhalten werden [116]. Dieses Verfahren wird mit dem Begriff EXAFS (Extended-X-ray-Absorption-Fine-Structure) beschrieben.



**Abbildung 9:** Darstellung der einzelnen Messbereiche anhand einer Röntgenabsorptions-Kante. Der gelb unterlegte Bereich markiert die Nah-Kante (XANES bzw. NEXAFS). Der blau unterlegte Bereich die EXAFS-Region. *Quelle:* [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:NEXAFS\\_EXAFS\\_schematic.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:NEXAFS_EXAFS_schematic.svg), Urheber: Michael Schmid, Lizenz CC BY-SA 3.0)

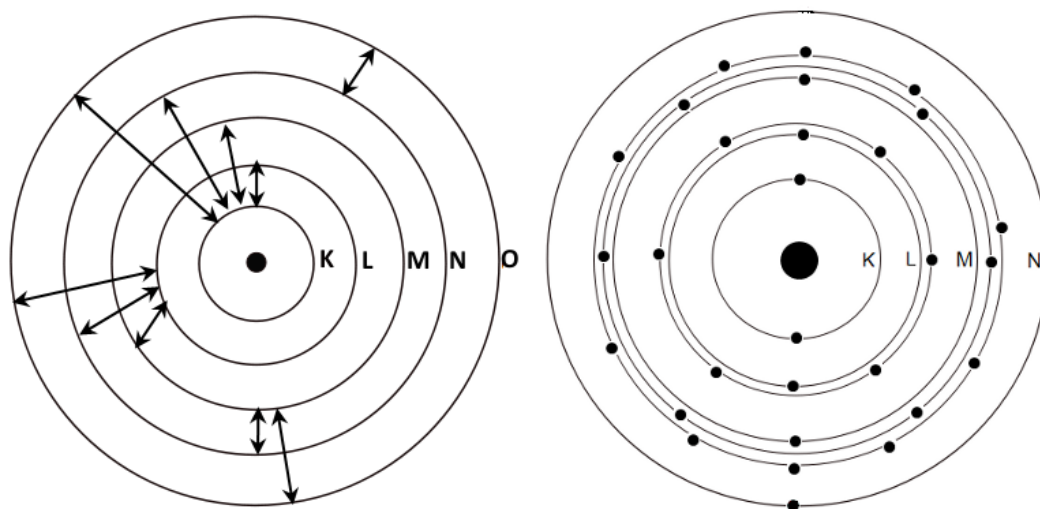
Für Hämocyanine konnten mit dieser Methode entscheidende Aussagen bezüglich Geometrie und Koordinationschemie des aktiven Kupferzentrums erhalten werden [111,112,113,114,115,117]. In Verbindung mit Erkenntnissen aus röntgenkristallographischen Untersuchungen wurde so ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Strukturen der Hämocyanine im oxigenierten und deoxygenierten Zustand, und dem kooperativen Verhalten der Proteine hergestellt [63]. Des Weiteren wurde die Geometrie aktiver Zentren von Hämocyaninen aus Organismen unterschiedlicher Tierstämme (Mollusken & Arthropoden) im oxigenierten und deoxygenierten Zustand untersucht und verglichen [115].

Experimente mit niederenergetischer, weicher Röntgenstrahlung im Bereich der L-Kanten (für Hämocyanine im Bereich von ca. 900 – 1000 eV) waren auf Grund wesentlicher apparativer Limitationen lange Zeit nicht möglich. Erst durch die Option Hochvakuum und Flüssigproben zu vereinen wurde ein Einsatz dieser Methode möglich [118,119]. Ist kein Hochvakuum vorhanden, wird die eingesetzte schwache Röntgenstrahlung von verbliebenen Molekülen der Atmosphäre soweit abgeschwächt, dass sie für die Untersuchung der Proben nicht ausreichend Intensität aufweist. Untersuchungen von Feststoffproben mit L-Kantenspektroskopie waren zwar möglich, allerdings ist eine *in vivo*-nahe Umgebung, wie sie z.B. eine Pufferlösung liefern kann, für die untersuchten Moleküle von Vorteil.

Auf Grund dieser Einschränkungen wurden zunächst Experimente im Bereich der K-Kante durchgeführt. Unter anderem kamen dafür Trockenproben zum Einsatz, bei denen Proteine in eine Saccharosematrix eingebettet waren [120,121]. Die Saccharose diente dabei dem Schutz der Proteine vor dem Einfluss der harten Röntgenstrahlung und sollte eine längere Exposition der untersuchten Proben gegenüber dem Röntgenlicht ermöglichen [115]. Eine physiologische bzw. *in vivo*-nahe Umgebung war dabei allerdings nicht gegeben. Für Kryoproben gilt dies ebenfalls. Bei biologischem Material (z.B. Proteine in Flüssigkeit bzw. Puffer) kann der Gefrierprozess die Probe stark beeinträchtigen. Fortgeschrittene Systeme mit kontrollierbarer Temperatur ermöglichen zwar Experimente am Phasenübergang, jedoch ist hier eine Untersuchung dynamischer chemischer Veränderungen unmöglich [122].

Prinzipiell können durch röntgenspektroskopische Versuche an der K-Kante auch Information zur elektronischen Struktur des untersuchten Elements erhalten werden. Dazu muss der kantennahe Bereich (Abbildung 9 – orange hinterlegt) eines solchen Spektrums betrachtet werden [123]. Allerdings ist die Signalstärke für Übergangsmetalle der ersten Reihe, zu denen auch Kupfer gehört, diesbezüglich sehr schwach. Bei Experimenten mit Metalloproteinen, die Übergangsmetalle wie Kupfer (Hämocyanin) oder Eisen (Hämoglobin) in ihren aktiven Zentren

tragen, ist deshalb die L-Kante wesentlich besser geeignet um Aussagen zu den elektronischen Strukturen, und somit zur Besetzung der beteiligten Orbitale, liefern zu können.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Anordnung von Atomshalen um den Atomkern.** Links ist ein allgemeines Schema gezeigt. Die Atomshalen sind mit K bis O durchnummeriert. K ist die kernnächste Schale und besitzt die höchste Bindungsenergie für die in ihr enthaltenen Elektronen. Die Pfeile kennzeichnen die möglichen Elektronenübergänge zwischen den Atomshalen. Rechts ist eine schematische Abbildung dargestellt, welche die Elektronenverteilung im Kupferatom aufzeigt.

Die L-Kantenspektroskopie bietet gegenüber der K-Kante einige Vorteile. So besitzen die kernnahen Lochzustände der p-Orbitale eine deutlich kleinere Lebensdauer als die s-Orbitale. Als Resultat ergeben sich schärfere spektrale Signaturen für die detektierten Übergänge. Auftretende  $2 p_{3/2}; p_{1/2} \rightarrow 3 d$  Übergänge der L-Kante sind im Gegensatz zu  $1 s \rightarrow 3 d$  Übergängen Dipol-erlaubt, wodurch die Spektren intensiver und ausgeprägter werden. Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Elektronen eines Kupferatoms auf die einzelnen Atomshalen (rechtes Bild). Das linke Bild zeigt eine allgemeine schematische Abbildung eines Atoms, wobei die eingezeichneten Pfeile die möglichen Elektronenübergänge zwischen den Atomshalen darstellen.

### 1.1.2.3 Die Messkammer Liquidrom

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten L-Kanten-spektroskopischen Versuche wurden an der Beamline U41-PGM des HZB-Berlin („Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie“ (BESSY II)) gemacht. Dazu wurde hochbrillante, weiche Synchrotronstrahlung im Energiebereich

zwischen 920 und 970 eV verwendet, welche das Absorptionsspektrum der zweiten Atomschale der zu untersuchenden Kupferatome des aktiven Zentrums der Hämocyanine abdeckt. Die für unsere Versuche geeignete Messapparatur war das am BESSY entwickelte *Liquidrom*, eine spezialisierte Endstation, oder Versuchskammer, aufgebaut aus Hauptkammer mit Messzelle und Detektor, sowie einem differenziellen Pumpsystem zwischen Kammer und Strahlrohr [8] (Abbildung 11 - oben).

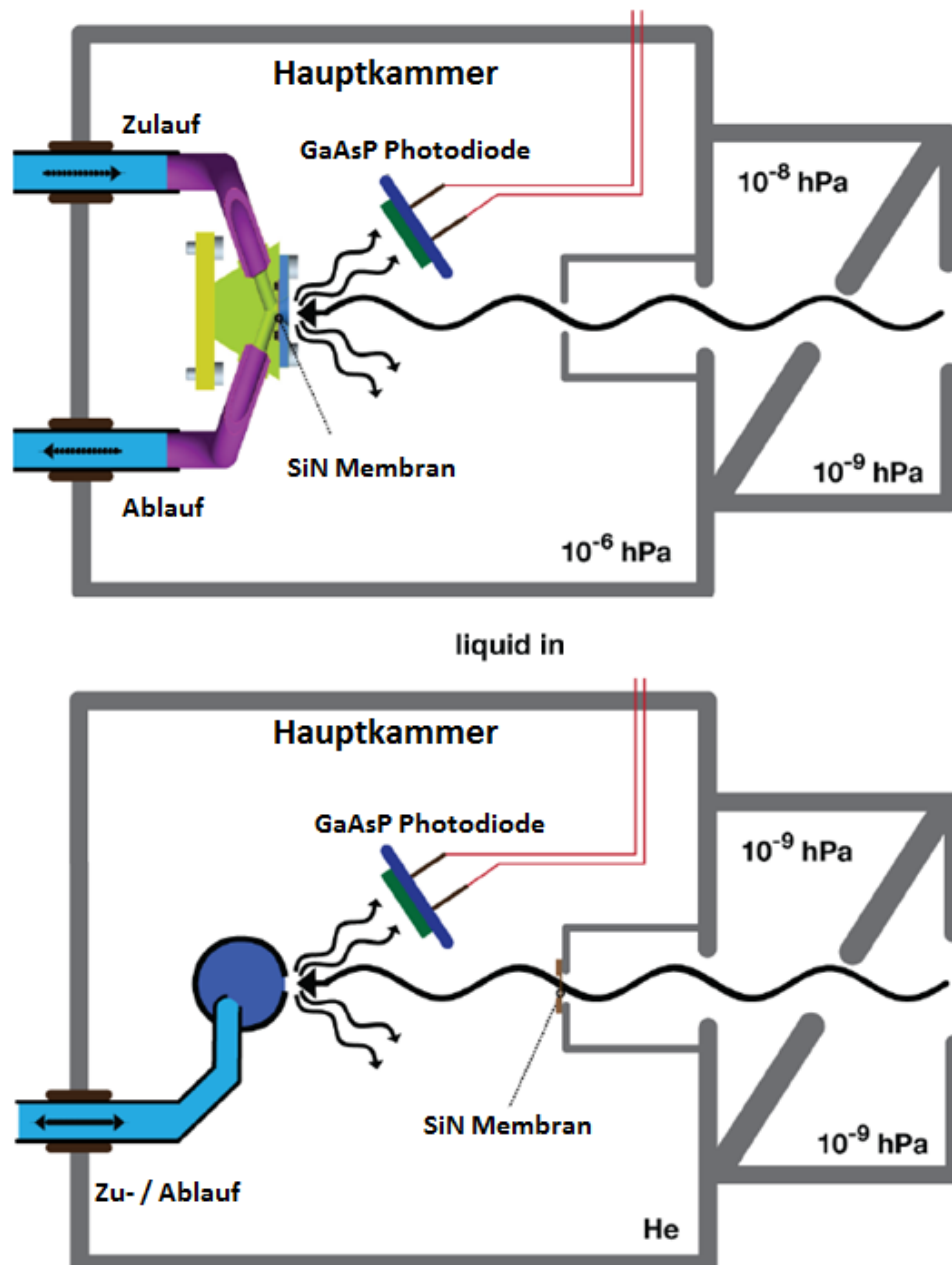
Hierbei wird die Messzelle durch eine Siliziumnitrid-Membran (SiN) von ca. 150 nm Dicke von der Messkammer abgetrennt, und die Proteinlösung zirkuliert, mit direktem Kontakt zum Eingangsfenster der Messzelle durch die Probenkammer. Die eingesetzten Siliziumnitrid - Membranen waren dabei so dünn, dass die weiche Röntgenstrahlung sie durchdringen und mit der Probenlösung interagieren konnte. Durch ein neu entwickeltes Ätzverfahren war es erstmals möglich Silizium-Membranen mit so geringen Schichtdicken einzusetzen, die außerdem noch ausreichend stabil waren dem Hochvakuum ( $10^{-3}$  -  $10^{-7}$  hPa) standzuhalten. Auf Grund dieser Neuerungen wurde der Weg frei, um chemische Systeme in Lösung mit L-Kantenspektroskopie zu studieren [8,119]. Die unter Hochvakuum stehende Hauptkammer ist vom Strahlrohr abgetrennt und kann über einen Deckel mit Schnellverschlüssen sehr schnell für Modifikationen des Messaufbaus oder Reparaturen zugänglich gemacht werden. Absorptionsspektren wurden im Röntgenfluoreszenz-Modus aufgenommen, wobei der TFY (Total Fluorescence Yield) der Proteinlösung über GaAsP-Fotodioden, in Abhängigkeit von der Energie der anregenden Röntgenstrahlung, gemessen wurde. Ein zweiter Aufbau mit einer stationären Messzelle war des Weiteren möglich (Abbildung 11 - unten).

Hierbei wird die Hauptkammer mit Helium geflutet statt unter Hochvakuum gesetzt, und die Durchflusszelle wird durch eine statische Messzelle ausgetauscht, die über einen Zugang gefüllt und entleert werden kann. Ein- und Austritt der Röntgenstrahlung erfolgen durch einen seitlichen Schlitz in der Wand der Messzelle. Strahlrohr und Messkammer sind ebenfalls durch eine Siliziumnitrid-Membran voneinander abgetrennt. Die einzelnen Aufbauten haben dabei individuelle Vor- und Nachteile.

Der Durchflussmodus besitzt den Vorteil, dass die untersuchte Proteinlösung mit einem relativ großen Volumen am Silizium-Fenster vorbeifließt und dadurch immer neue, frische Moleküle dem Röntgenlicht ausgesetzt werden. So wird u.a. der Einfluss der Röntgenstrahlung auf die untersuchten Moleküle minimiert. Allerdings muss für die Verwendung dieses Aufbaus ein relativ großes Volumen an Proteinlösung zur Verfügung stehen (70 ml). Außerdem traten in

unserem Fall teilweise Probleme mit dem Pumpsystem auf, so dass durch den ungleichmäßigen Durchfluss Modulationen im Signal zu erkennen waren.

Die statische Messzelle dagegen benötigt ein geringeres Volumen (40 ml), liefert aber nicht die Möglichkeit eines konstanten Durchflusses.



**Abbildung 11: Schematischer Aufbau der Endstation Liquidrom. Oben:** Durchflusszelle. Bei diesem Versuchsaufbau steht die Hauptkammer mit der Messzelle unter Hochvakuum. Die Probenlösung wird durch eine 150 nm Dicke Siliziummembran von der Kammer abgetrennt. **Unten:** Statische Zelle. Hierbei ist die Hauptkammer mit Helium geflutet und die statische Zelle mit der enthaltenen Proteinlösung steht in direktem Kontakt dazu. Eine Siliziummembran trennt die Hauptkammer vom Strahlrohr.

Dadurch sind Teile der Lösung evtl. etwas länger dem Röntgenlicht ausgesetzt, wobei es auf Grund des sehr geringen Interaktionsraums von Strahl und Probe, und der Bewegung der Moleküle in Lösung (Brown'sche Molekularbewegung) zu einem ausreichenden Austausch der untersuchten Proteine kommt.

#### ***1.1.2.4 Ziele der Untersuchungen mit Hämocyanin***

Ziel dieses Teilprojekts war es Hämocyanine in physiologischer Umgebung auf deren Verhalten am aktiven Kupfer-Zentrum mit Röntgenabsorptions-Spektroskopie an der L-Schale zu studieren. Durch Verbindung der L-Kanten-Spektroskopie mit statischen Flüssigkeitszellen bzw. Durchflusssystemen, war es erstmals möglich die elektronische Konfiguration der Kupferatome hinsichtlich der beteiligten Bindungspartner unter physiologisch ähnlichen Bedingungen, also in wässriger Pufferlösung, zu untersuchen. Die Darstellung unterscheidbarer spektraler Signaturen von sauerstoffbeladenem und sauerstoffunbeladenem Hämocyanin mit dieser Methode stand dabei im Mittelpunkt des Interesses. Weiterhin waren Untersuchungen hinsichtlich Strahlenschäden, sowie der Rolle von Wasser-Molekülen im Sauerstoffbindeprozess und deren Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum Gegenstand der Untersuchungen. Fernziel dieses Projektes war es neue Einsichten bezüglich des kooperativen Verhaltens dieser komplexen Sauerstofftransportproteine zu gewinnen.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Chemikalien & Geräte

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien

Argon	(Linde Gas, Pullach)
Calciumchlorid-Hexahydrat	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Chloroform Rotisol	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Ethanol 70 %	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Ethanol 99,9 %	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Hellmanex Reinigungskonzentrat KG)	(Hellma Materials GmbH & Co.
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Methanol	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Natriumchlorid	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	(Merck, Darmstadt)
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
(3-Aminopropyl)-Triethoxysilan (APTES) ≥98%	(Sigma Aldrich)
Natriumdithionit	(Sigma Aldrich)
Natriumazid	(Sigma Aldrich)

Natriumdodecylsulfat	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
SDS Ultra pure	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Stickstoff	(Linde Gas, Pullach)
Temed	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Tris	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)

### **2.1.2 Verwendete Geräte**

AFM MultiMode III & V	(Veeco Instruments GmbH, Mannheim)
Analytische Ultrazentrifuge	(Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Exsikkator	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Feinwaage: A200S	(Sartorius AG, Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop BZ 8000K	(Keyence Corporation, Japan)
Frequenzgenerator HAMEG 20 MHz Pulse Generator	(HAMEG GmbH, Frankfurt am Main)
Glasthermometer	(Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Hamiltonspritzen	(Hamilton Company, Reno, USA)
Heizplatte IKAMAG RCT basic	(IKA-Werke, Staufen)
Labor-pH-Meter 766	(Princeton Instruments, Trenton, USA)
Mini Extruder USA)	(Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)
QCM-D D300 System	(Q-Sense, Västra Frölunda, Sweden)
Reinstwasseranlage (Milli-Q biocel)	(Milli-Pore GmbH, Bad Schwalbach)
Sandbad ST 72	(Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf)

Schüttler Duomax 1030	(Heidolph Elektro GmbH, Kelkheim)
Spektrophotometer Cary 300 Bio UV-Visible	(Varian, Zug, Schweiz)
Ultrazentrifuge L7	(Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Vakuumpumpe	(Vaccubrand, Wertheim)
Zetasizer Nano-S	(Malvern Industries)

### **2.1.3 Verwendete Oberflächenmaterialien**

Silizium-Wafer Silicon Materials (Victor-Frankl-Str. 20, D - 86916 Kaufering, Deutschland) bezogen, Mica-Plättchen wurden von der Firma Ted Pella Inc. (P.O. Box 492477, Redding, California).

### **2.1.4 Verwendete Phospholipide**

*Siehe „Verwendete Lipid-Kompositionen für große Vesikel“ im Abschnitt 2.3.1.1*

### **2.1.5 Verwendete Puffer**

Für die Herstellung aller Puffer wurde höchst reines Wasser verwendet, welches mit einer Reinstwasseranlage (Milli-Q biocel-Anlage, Milli-Pore GmbH, Bad Schwalbach) gereinigt wurde und einen Leitwiderstand von 18,2 M $\Omega$  aufwies. Das Einstellen der pH-Werte erfolgte, wenn erforderlich, mit konzentrierter Salzsäure bzw. mit 0,5 M Natronlauge bei Raumtemperatur. Außerdem wurden alle Puffer nach Herstellung und vor der weiteren Verwendung mittels einer Vakuumpumpe (Vaccubrand, 97877 Wertheim, Germany) durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 200 nm (Milli-Q biocel-Anlage, Milli-Pore GmbH, Bad Schwalbach) gefiltert.

*Natrium-Phosphatpuffer:*

Der in dieser Arbeit eingesetzte Natriumphosphatpuffer (70 mM) wurde aus den Bestandteilen Natriumhydrogenphosphat und Di-Natriumhydrogenphosphat so zusammengemischt, dass ein finaler pH-Wert von 7,2 resultierte. Verwendet wurde dieser Puffer, sofern nicht anders erwähnt, für alle Experimente mit Vesikeln und Toxin.

*HEPES-Puffer:*

HEPES-Puffer wurde für bestimmte Experimente mit Vesikeln verwendet, enthielt 10 mM HEPES sowie 2 mM  $\text{CaCl}_2$  und wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

*Crustaceen-Puffer:*

Der für die Experimente mit Crustaceen-Hämocyanin (*Homarus americanus*) eingesetzte Puffer enthielt 0,1 M Tris-HCl sowie je 20 mM  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$ , und wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

## 2.2 Proteine

### 2.2.1 $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus*

Das in dieser Arbeit verwendete Wildtyp (*wt*) Hämolysin ( $\alpha$ -toxin) aus *Staphylococcus aureus* (Stamm DU 1090) wurde von Frau Dr. Antje Brack in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Valeva der Universitätsklinik Mainz hergestellt. Die Herstellung erfolgte aus dem Überstand von *S. aureus* Zellkulturen. Das Protein wurde in der Folge bei  $-80^\circ\text{C}$  in 0,1 M Ammonium-Acetat-Puffer (pH 6) gelagert und sollte als Monomer vorliegen. Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit dem Nano-Drop-Photometer durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm. Der Extinktionskoeffizient mit 1,7 für 1 mg pro ml  $\alpha$ -Toxin wurde nach der Methode von Scopes ermittelt [124].

### 2.2.2 Hämocyanin aus *Homarus americanus*

Die verwendeten Hummer wurden beim Frischeparadies (Frischeparadies KG, Lärchenstraße 101, 65933 Frankfurt am Main) bestellt und am Tag der Lieferung unmittelbar verarbeitet. Zur Gewinnung des Hämocyanins aus dem amerikanischen Hummer (*Homarus americanus*) musste im ersten Schritt die Hämolymphe des Tieres erhalten werden. Dazu erfolgte eine Punktion des Hummers mit Spritze und Kanüle dorsal am Perikard, wobei die Kanüle in Richtung Kopfende zeigte und so flach wie möglich angesetzt wurde. Die wechselwarmen Tiere lagerten während der Lieferung und vor der Punktion auf Eis um sie reaktionsträge zu machen. Der Einstich erfolgte am hinteren Ende des Carapax, und die Hämolymphe wurde anschließend bei Raumtemperatur für ca. eine Stunde in Bechergläsern gelagert, bis ein gelartiges Ausfallprodukt gebildet hatte. Die koagulierte Lymphe wurde dann mit einem sauberen Spatel zerstoßen und in Zentrifugen-Gläser gefüllt.

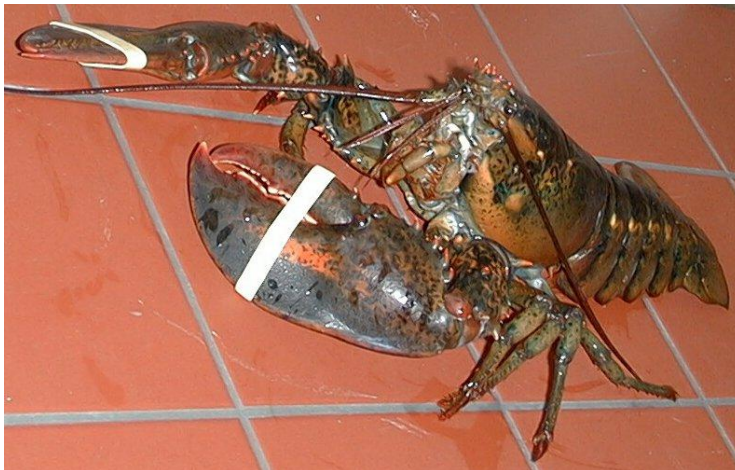


Abbildung 12: *Homarus americanus* (amerikanischer Hummer).

Zelluläre Bestandteile und Gerinnungsfaktoren konnten durch eine vierzigminütige Zentrifugation mit der präparativen Ultrazentrifuge bei 30000 rpm und 4°C entfernt werden (Rotor Ti60). Der Überstand, der das Hämocyanin enthielt, wurde abgeschöpft, in saubere Zentrifugen-Röhrchen überführt und erneut für viereinhalb Stunden bei 54000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt die Hämocyanine und wurde in 5ml Tris/HCl-Puffer über Nacht auf einem Schüttler und bei 4°C resuspendiert. Die finale Lösung wurde mit einer Spatelspitze Natriumazid versetzt und bis zu weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Eine

Säulenchromatographie wurde auf Grund der riesigen Proteinmengen und Konzentrationen nicht durchgeführt.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Herstellung von Vesikeln und oberflächenunterstützten Modellmembranen

Vesikel werden sowohl nach der Anzahl der sie aufbauenden Doppelschichten, als auch nach ihrer Größe unterschieden. Baut sich ihre Hülle aus mehreren PhosphoLipiddoppelschichten auf, so spricht man von multilamellaren Vesikeln, bei lediglich einer Doppelschicht spricht man von unilamellaren Vesikeln. Zu Beginn der Präparation liegen Vesikel als multilamellare Gebilde vor und erst im weiteren Verlauf der Herstellung werden sie in die unilamellare Struktur überführt. Dies geschieht je nach Präparationsmethode auf unterschiedliche Weise und wird im Folgenden genauer beschrieben.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Vesikeln handelte es sich in allen Fällen um unilamellare Vesikel. Diese sind in drei verschiedene Größenordnungen eingeteilt:

Tabelle 1: Übersicht zur Einteilung einschaliger Vesikel nach ihrer Größe.

<b>SUV</b>	<u>S</u> mall <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esicles	kleine einschalige Vesikel	< 100 nm
<b>LUV</b>	<u>L</u> arge <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esicles	große einschalige Vesikel	100 nm – 1 µm
<b>GUV</b>	<u>G</u> iant <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esicles	riesige einschalige Vesikel	> 1 µm

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich kleine und große einschalige Vesikel verwendet, die im Größenbereich um 60 nm bzw. um 100 nm lagen und beim Aufbau von oberflächenunterstützten PhosphoLipiddoppelschichten Verwendung fanden. Riesige einschalige Vesikel wurden dagegen für fluoreszenzmikroskopische Experimente eingesetzt. Als frei in Lösung vorliegende Vesikel mit einer Größe und Ausdehnung, die über dem unteren Grenzbereich des Auflösungsvermögens von Lichtmikroskopen ( $\lambda/2$ ) liegt, waren sie für diese

Versuchsanordnung gut geeignet. Kleine und große einschalige Vesikel sind meist nicht groß genug, um durch diese Methode detektiert zu werden.

### ***2.3.1.1 Herstellung großer Vesikel***

#### ***Reinigung von Rundglaskolben zur Präparation von Vesikeln***

Um sicherzustellen, dass die für die Präparation der Vesikel verwendeten Glaskolben einen möglichst hohen Reinheitsgrad aufwiesen, wurden die Kolben vor jedem Präparationsvorgang dem im Folgenden aufgeführten Reinigungsprotokoll unterzogen:

1. Spülen mit Wasser
2. Spülen mit Chloroform
3. Inkubation in 2 %iger (v/v) Hellmanex-Lösung (davon 30 Minuten im Ultraschallbad bei 50 °C)
4. Spülen mit Aceton
5. Gründliches Ausspülen mit Wasser und abschließendes Trocknen an Luft oder im Stickstoffstrom

Unmittelbar vor der erneuten Verwendung wurden die Kolben noch einmal vorsorglich mit Chloroform durchgespült, um mögliche Rückstände vollends zu entfernen.

#### ***Verwendete Lipid-Kompositionen für große Vesikel***

Die in dieser Arbeit verwendeten Vesikel enthielten je nach Versuchsansatz unterschiedlich viele Phospholipid-Bestandteile. Die Anzahl der Lipide variierte dabei zwischen einer Komponente bis hin zu drei Komponenten. In der folgenden Tabelle sind die jeweiligen Kompositionen samt ihrem Anteil (in Mol%), dem Hersteller und der jeweiligen Produktionsnummer aufgeführt.

Alle Phospholipide wurden entweder in Chloroform gelöst oder lagen bereits in Chloroform gelöst vor. Die Lipide wurden in den entsprechenden Konzentrationen in Rundkolben gegeben und vermischt. Im Anschluss erfolgte die Trocknung unter einem Strom aus Stickstoffgas. Danach wurden die Kolben zur weiteren Trocknung und zum Entzug verbliebener Chloroform-Rückstände für mehrere Stunden (teilweise auch über Nacht) in einem Sandbad bei 50°C an ein Vakuum angeschlossen ( $< 3-4 \times 10^{-2}$  mbar). Der getrocknete Phospholipid-Film wurde in der Folge entweder unter Argon gelagert oder umgehend in Puffer resuspendiert und zu Vesikeln weiterverarbeitet. Wenn in den entsprechenden Kapiteln nicht anders angegeben, wurde Natriumphosphatpuffer (70 mM & pH 7,2) für die Herstellung der Vesikel verwendet.

### ***Herstellung großer einschaliger Vesikel mittels Extrusion***

Für die Herstellung großer einschaliger Vesikel (LUVs) wurden getrocknete Lipide in Pufferlösung resuspendiert [125]. Dazu wurde ein Milliliter Pufferlösung in den Rundkolben pipettiert und dieser anschließend auf einem Vortex Mixer CAT VM3 (M. Zipperer GmbH D 79219 Staufen) geschüttelt, bis sich der Phospholipid-Film von der Glasoberfläche gelöst hatte. Die entstandene Lipid-Pufferlösung wurde mittels eines Extruders (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, Typ 610000) zu Vesikeln definierter Größe weiterverarbeitet [126]. Das Puffer-Lipid-Gemisch wurde hierfür durch eine Membran definierter Porengröße (Avanti Polar Lipids/Whatman, 50 oder 100 nm Porendurchmesser: Typ 6324004 bzw. Typ 8249043; Filterunterlage: Typ 610014) gepresst. Dabei entstanden einschalige Vesikel einheitlicher Größe. Die Extrusion erfolgte bei einer Temperatur, die den Schmelzpunkt des Lipids mit der höchsten Übergangstemperatur überschritt. In der Regel wurde bei ca. 50-55°C extrudiert. Der Extruder wurde zu diesem Zweck auf eine Heizplatte (IKA-Werke, Staufen) gestellt und die Temperatur mit einem Thermometer kontrolliert. Die Phospholipid-Lösung wurde 15mal durch die jeweilige Membran gepresst, die Vesikel-Suspension anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt und abgekühlt.

Wenn die Vesikel nicht direkt im Anschluss verwendet wurden, wurde die Lösung mit Argon überschichtet, das Behältnis mit PTFE-Gewindeband (Roth GmbH & Co) und Parafilm (Roth GmbH & Co, Karlsruhe) verschlossen, und bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufbewahrt.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zusammensetzungen einschaliger Vesikel

Lipid-Komponente	Gehalt [%]	Hersteller	Produktionsnummer
<b>Einkomponenten-System:</b>			
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (from egg yolk) (ePC)	100	Fluka	61752 250g
<b>Zweikomponenten-System:</b>			
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (from egg yolk) (ePC)	50	Fluka	61752 250g
N-Acyl-4-sphingenyl-1-O-phosphorylcholine (from egg yolk) (eSM)	50	Sigma	S0756
<b>Dreikomponenten-System (I):</b>			
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (from egg yolk) (ePC)	35	Fluka	61752
N-Acyl-4-sphingenyl-1-O-phosphorylcholine (from egg yolk) (eSM)	35	Sigma	S0756
Cholesterol	30	Sigma	C8667
<b>Dreikomponenten-System (II):</b>			
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DOPC)	35	Avanti	850375C
N-palmitoyl-D- <i>erythro</i> -sphingosylphosphorylcholin (PSM)	35	Avanti	860584P
Cholesterol	30	Sigma	C8667
<b>Dreikomponenten-System (III):</b>			
1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (POPC)	35	Avanti	850457C
N-palmitoyl-D- <i>erythro</i> -sphingosylphosphorylcholin (PSM)	35	Avanti	860584P
Cholesterol	30	Sigma	C8667
<b>Dreikomponenten-System (IV):</b>			
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho-L-Serine] (DOPS)	50		
N-palmitoyl-D- <i>erythro</i> -sphingosylphosphorylcholin (PSM)	25	Avanti	860584P
Cholesterol	25	Sigma	C8667
<b>Dreikomponenten-System (V):</b>			
1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (chloride salt) (DOTAP)	33,3		890890
N-palmitoyl-D- <i>erythro</i> -sphingosylphosphorylcholin (PSM)	33,3	Avanti	860584P
Cholesterol	33,3	Sigma	C8667

### ***2.3.1.2 Herstellung riesiger Vesikel***

Die Herstellung von riesigen einschaligen Vesikeln (GUVs) erfolgte mittels der Methode der Elektroformation [127]. Die hierfür verwendeten Lipide wurden ebenfalls in Chloroform gelöst oder lagen bereits in Chloroform gelöst vor. Zur Herstellung der verschiedenen Kompositionen wurden die entsprechenden Phospholipide mittels Hamilton-Spritzen in Schraubdeckelgläser gegeben und vermischt. Außerdem wurde in diesem Teil der Präparation der Fluoreszenzfarbstoff Lissamin-Rhodamin-PE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine – Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama) im Verhältnis 1:1000 zugeführt. Das finale Gemisch hatte dabei eine Lipid-Konzentration von 0,25 mg/ml.

Sowohl das Phospholipid-Gemisch, als auch die mit Indium-Zinnoxid (ITO - Indium-Tin-Oxide) beschichteten Glasobjektträger (Sigma Aldrich), die als Teil der Präparationskammer für die GUV-Herstellung dienten, wurden im Sandbad auf ca. 50 - 55°C vortemperiert. Die erwärmte Lipid-Lösung wurde anschließend tropfenweise auf die ITO-Träger gegeben und mittels einer modifizierten Pasteur-Pipette ausgestrichen, bis das Chloroform sich verflüchtigt hatte und nur noch der Phospholipid-Film als dünne Schicht an der Oberfläche zurückblieb. Der entstandene Film wurde in der Folge unter Vakuumbedingungen in einem Exsikkator weiter getrocknet, wodurch letzte Chloroform-Rückstände entfernt werden sollten. Anschließend wurden die ITO-Träger mit der, den Phospholipid-Film tragenden, stromleitenden Seite nach innen zusammengebaut, und mittels eines Rahmens aus Silikon, der als Platzhalter diente, voneinander getrennt. Dadurch entstand eine Probenkammer mit einem Volumen von ca. 1 ml. Zusammengehalten wurde der Aufbau mit Hilfe von extern angebrachten Klammern. Die Befüllung erfolgte mit erwärmtem Wasser oder Puffer (55°C) über Kanülen, wobei zwei Kanülen pro Kammer an den gegenüberliegenden Ecken eingeführt wurden, so dass zum einen die Lösung in die Kammer hinein, und Luft aus der Kammer herausgelangten. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der Behälter vollständig und ohne Lufteinschlüsse gefüllt war, und somit eine Oxidation der Lipide vermieden wurde. Beim Entfernen der Kanülen schlossen sich die entstandenen Kanäle durch die Ausdehnung des Silikon-Elastomers und dem Druck der Klammern. Nach dem vollständigen Zusammenbau wurde über zwei Krokodil-Klemmen eine Sinusspannung mit 20 Hz und 1,5 V an die ITO-Träger angelegt. Für die GUV-Herstellung wurde die Präparationskammer dann in der Regel über Nacht im Sandbad inkubiert. Dabei musste sichergestellt werden, dass die Temperatur in der Kammer über dem Schmelzpunkt ( $T_M$ ) des

Phospholipids mit dem höchsten Schmelzpunkt ( $T_M$ -high) lag. Für die hier durchgeführten Versuche betrug die Temperatur ca. 50-55°C.

Der genaue Mechanismus der GUV-Entstehung durch Elektroformation ist bisher noch nicht verstanden. Man vermutet aber, dass sich durch periodische Schwingungen der Wassermoleküle in der Probenkammer, die durch die angelegte Spannung erzeugt werden, die multilamellar übereinander angeordneten Phospholipid-Filme langsam vom Glasträger ablösen, und sich anschließend als pilzförmige Strukturen abschnüren[128]. In der Folge entstehen dann durch Fusion dieser Strukturen GUVs im Größenbereich von 5-60  $\mu$ M. Nach der Präparation wurde die GUV-Lösung über Kanülen entnommen und entweder unmittelbar weiterverwendet oder in Eppendorf-Gefäßen (Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg) unter Argon gelagert. Nach der Präparation konnten die verwendeten ITO-Objektträger und der Silikonrahmen mit Ethanol gereinigt und erneut verwendet werden. Um die ITO-Objektträger auf Beschädigungen hin zu untersuchen, sollte vor der erneuten Verwendung die Leitfähigkeit der Beschichtung geprüft werden.

### ***2.3.1.3 Herstellung oberflächenunterstützter Modellmembranen***

Für die Untersuchung von festkörperunterstützten Phospholipidmembranen auf verschiedenen Substraten können zwei verschiedene Verfahren angewendet werden. Zum einen die Methode der Vesikelspreitung [129,130], zum anderen das Verfahren nach Langmuir-Blodgett bzw. Langmuir-Schäfer [131,130]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Vesikelspreitung angewendet.

#### ***Vorbehandlung der Festkörperoberflächen:***

Der für die jeweilige Präparation verwendete Oberflächentyp ( $\text{SiO}_2$ , Mica) wurde vor der Ausbildung der Lipiddoppelschicht zurechtgeschnitten. Für die Präparation auf Mica wurde dazu

eine für den Einbau in das AFM geeignete Oberfläche aus einem größeren Mica-Plättchen ausgeschnitten oder, mit einem extra angefertigten Stanzgerät, ausgestanzt.

Für die Silizium-Oberflächen wurde dagegen mit Hilfe eines Diamantschneiders die Silizium-Wafer angeritzt, und diese dann in Kristallrichtung gebrochen. So konnten Silizium-Plättchen einer bestimmten Größe hergestellt werden. Die Substratfläche war dabei in der Regel zwischen 0,2 – 0,8 cm<sup>2</sup> groß.

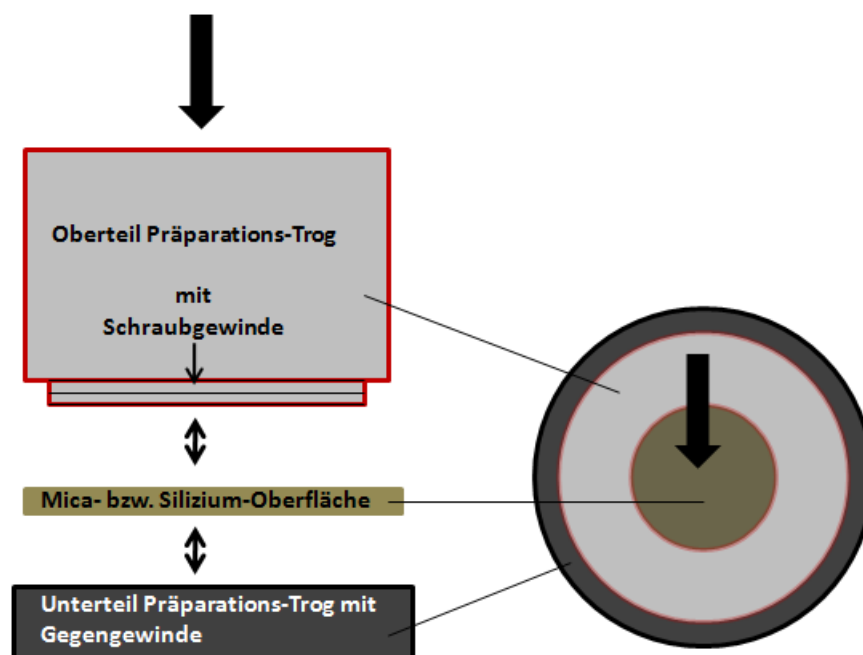
Um eine möglichst reine Oberfläche für die Ausbildung der Modellmembranen zu erhalten wurden die Silizium-Substrate zuvor nach folgendem Protokoll aufbereitet:

1. Abblasen der geschnittenen Plättchen mit Stickstoffgas zur Entfernung des Feinstaubes der Bruchkanten
2. Einlegen der Wafer in 2%ige SDS-Lösung für 2-12 Stunden
3. Anschließend mehrfache Spülung mit reichlich Milli-Q-Wasser bis SDS-Rückstände entfernt waren
4. Trocknung der Silizium-Träger im Strom aus Stickstoffgas
5. Reinigung für zweimal 10 - 15 Minuten in einem „Plasma-Cleaner“, alternativ mittels UV-Ozon-Behandlung. Gründliche Milli-Q-Spülung und Stickstofftrocknung zwischen den Reinigungsschritten
6. Anschließend möglichst direkter Einbau in den Präparationstrog für die Ausbildung der Lipiddoppelschicht . Alternativ erfolgte die Lagerung unter Argon- bzw. Stickstoffgas in einem geschlossenen Glasgefäß.

Bei der Verwendung von Micaoberflächen entfiel dieser Reinigungsschritt. Hier genügte es eine Abspaltung der oberen Kristallschicht vorzunehmen. Dazu wurde ein Klebestreifen gleichmäßig auf die Oberfläche gedrückt, und dieser dann vorsichtig abgezogen. Dadurch lösen sich die oberen Mica-Schichten, das Substrat wird entlang des Kristallgitters gespalten und eine im Idealfall atomar ebene Oberfläche entsteht. In dieser Form waren die Micaoberflächen zur weiteren Verwendung geeignet. Anschließend erfolgte, wie bei den Silizium-Oberflächen, ein möglichst direkter Einbau in den Präparationstrog, wo die Oberfläche mit Vesikel-Lösung überschichtet wurde.

### ***Herstellung festkörperunterstützter Modellmembranen mittels Vesikelspreitung***

Für die Ausbildung einer oberflächenunterstützten Membran durch den Prozess der Vesikel-Spreitung wurden zuerst einschalige Vesikel nach dem oben beschriebenen Extrusionsverfahren hergestellt. Die resultierenden Vesikel lagen in einer Pufferlösung oder in Wasser vor. Gereinigte Substratoberflächen wurden in extra angefertigte Präparationströge (Abbildung 13) eingebaut und mittels Schraubgewinde fixiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der jeweiligen Vesikellösung, die für einen bestimmten Zeitraum über die Substratoberfläche geschichtet wurde. Zur besseren Verteilung und Interaktion der Vesikel mit der Substratoberfläche wurden die Präparations-Tröge auf einem Schüttler (Duomax 1030, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, 93309 Kelkheim) gestellt.

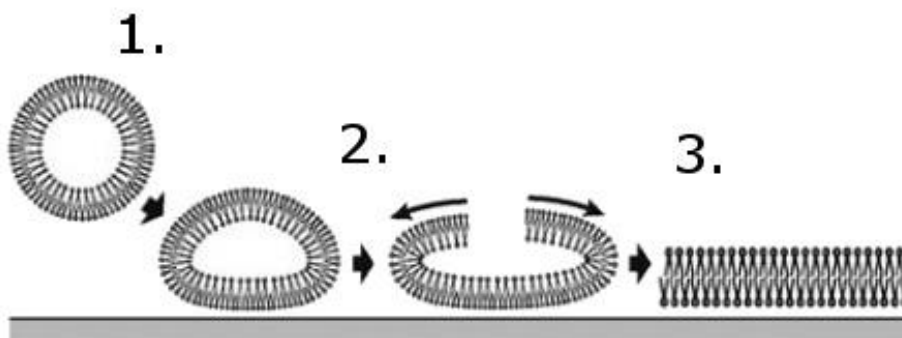


**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des Präparations-Trogs für SPBs auf Mica oder Silizium. Links ist die Seitenansicht der einzelnen Komponenten gezeigt. Das Oberteil wird über ein Schraubgewinde auf das Unterteil des Trogs geschraubt. Dazwischen wird das jeweilige Substrat eingeklemmt. Die Übersichtung mit Vesikeln erfolgt von oben (schwarzer Pfeil). In der Mitte ist die entsprechende Aufsicht für diesen Aufbau dargestellt.

Durch die Bewegung der Vesikel-Lösung kommt es zu einer erhöhten Interaktionsrate mit dem Substrat und die Ausbildung der Membran wird verbessert. Der hierbei ablaufende Interaktionsprozess gliedert sich in drei wesentliche Abschnitte die auch in Abbildung 14 eingezeichnet sind:

1. Die Vesikel bewegen sich frei in ihrem Lösungsmittel und beginnen mit der Oberfläche zu interagieren. Dabei kommt es zuerst zu einem Anheften an das jeweilige Substrat mit anschließender Deformation und Abflachung der Vesikel.
2. In der Folge kommt es durch die Deformation zu einer erhöhten Spannung in der Vesikelmembran und zur Überschreitung der kritischen Krümmung, was ein Aufreißen der Phospholipidmembran der Vesikel zur Folge hat. Dabei wird das eingeschlossene Flüssigkeitsvolumen ins umgebende Medium freigesetzt.
3. Die rupturierte Membran klappt anschließend auf und bildet an der Substratoberfläche eine festkörperunterstützte Membran aus (Abbildung 14).

Zur Überprüfung, ob die eingesetzten Vesikel unterschiedlicher Phospholipidzusammensetzung dieses Verhalten zeigen, wurde der Vesikelspreitungs-Prozess mittels QCM-D überprüft. Ausgebildete SPBs konnten anschließend mittels AFM und Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.



**Abbildung 14: Schema des Vesikelspreitungs-Prozess zur Ausbildung eines SPB (Schema, modifiziert nach Tero [132]).** In Schritt eins liegen die Vesikel frei im Lösungsmittel vor und beginnen mit dem jeweiligen Substrat zu interagieren, wodurch sie meist abflachen. Schritt 2 beschreibt dann die Ruptur der Vesikel auf Grund der erhöhten Spannung in deren Membran. Dadurch kommt es in Schritt drei zum Aufreißen der Vesikel und zur Ausbildung einer oberflächeunterstützten Modellmembran.

### ***Plasma Cleaner***

Der Plasmacleaner diente als zusätzlicher Reinigungsschritt der Silizium-Kristalle. Die vorgereinigten Kristalle wurden zusätzlich noch für zwei Minuten bei 50 W im Plasmacleaner behandelt. Dabei werden durch Radikalisierung von reinem Sauerstoff Sauerstoffradikale erzeugt. Diese Sauerstoffradikale reagieren mit an der Oberfläche trotz vorheriger Reinigung noch zurückgebliebenen organischen Verbindungen. Diese Rückstände, die evtl. die Oberfläche verschmutzen, werden dadurch in ihre Bestandteile zerlegt. Da sich die Probe während des Reinigungsprozesse im Vakuum ( $1 \times 10^{-5}$  bar) befindet, und die Vakuumpumpe unter Sauerstoffzufuhr durchgehend weiterarbeitet, werden alle entstehenden Rückstände abgesaugt.

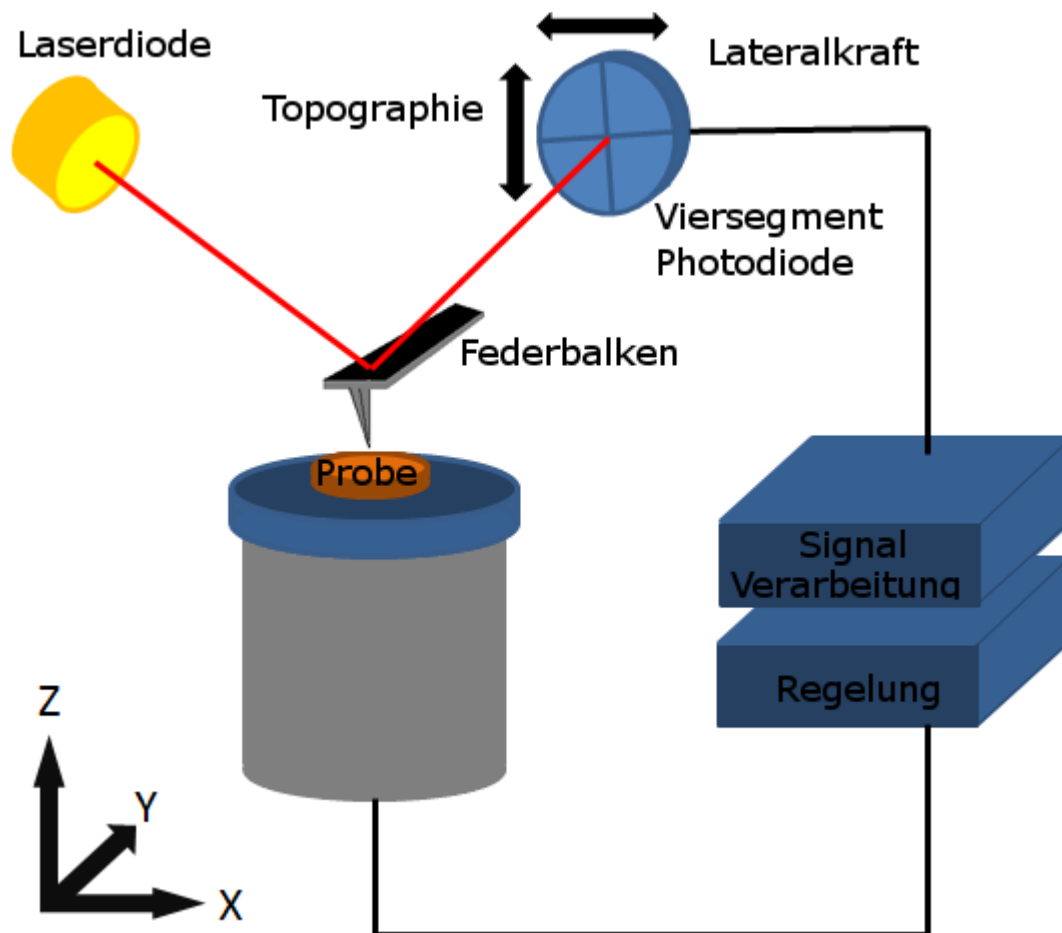
### **2.3.2 Rasterkraftmikroskopie**

In diesem Abschnitt wird die Methode der Rasterkraftmikroskopie (Atomic-Force-Microscopy - AFM) beschrieben, die zur Gruppe der Rastersonde-Mikroskopie gehört und von Binnig et al. entwickelt wurde [42]. In dieser Arbeit eingesetzte AFMs des Typs MultiMode III & V stammten von der Firma Veeco (Veeco Germany, Dynamostr. 19, 68165 Mannheim) und waren mit einer Flüssigkeitszelle ausgestattet. Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probenoberfläche mit einer sehr feinen Spitze Zeile für Zeile abgerastert und die erhaltenen Informationen aufgezeichnet. Das Auflösungsvermögen, das mit dieser Art der Mikroskopie erzielt werden kann, liegt in Bezug auf die räumliche Information im Bereich von Mikrometern bis Nanometern. Als Messfühler dient ein Federbalken (cantilever) an dessen Ende eine sehr feine Spitze (tip) angebracht ist. Diese Messspitze wird über die Probenoberfläche geführt und so die räumlichen Ausdehnungen und das Höhenprofil der Oberfläche erfasst. Häufig bestehen die verwendeten Spitzen aus Silizium oder Siliziumnitrid und ihre Radien variieren zwischen ca. 2 und 100 nm. Die Federkonstanten der Federbalken liegen typischerweise im Bereich zwischen 0,01 N/m und 50 N/m. Ein piezoelektrisches Stellelement regelt die Bewegung der Spitze, wodurch eine sehr genaue Ansteuerung der Oberflächenbereiche möglich ist.

Piezo-Kristalle funktionieren dabei wie folgt: Entweder es wird durch Ausüben eines Druckes auf den Kristall ein elektrisches Dipolmoment erzeugt, welches auf Grund der Ladungsverschiebung im Kristall als Folge des Druckes ausgebildet wird. Alternativ besteht die Möglichkeit den umgekehrten Effekt zu nutzen; die Regelung der räumlichen Ausdehnung des Kristalls durch Anlegen einer elektrischen Spannung. Je nach Spannungsstärke dehnt sich das piezoelektrische Material dabei mehr oder weniger stark aus und ermöglicht so eine sehr feine und gezielte Ansteuerung der Probenoberfläche. Während des Rasterprozesses wechselwirken attraktive und repulsive Kräfte der untersuchten Oberfläche mit der Spitze des Federbalkens. Dadurch kommt es zu einer Verbiegung des Federbalkens, welche über das Lichtzeigerprinzip erfasst wird. Ein auf die Oberseite des Federbalkens fokussierter Laserstrahl wird reflektiert und die Reflektion über einen oder mehrere Ablenkspiegel auf einen Fotodetektor projiziert. Der Detektor ist dabei in der Regel in zwei oder vier Segmente unterteilt (Quadranten-Fotodiode), in denen die Lichtintensität der Reflektion erfasst wird. Durch die Unterteilung der Diode ist die Detektion der lateralen und der vertikalen Verbiegung des Federbalkens möglich. Der Fotodetektor liefert dabei ein Ausgangssignal, welches über eine Feedbackschleife mit der Kontrollelektronik des Piezokristalls verbunden ist, die während des Rasterns das Piezoelement in der Höhe nachregelt. Hierbei spielt es keine Rolle, ob das Substrat mit Flüssigkeit bedeckt ist oder sich an Luft befindet, wodurch auch biologische Proben in einem *in-vivo*-nahen Umfeld für die Messung zugänglich gemacht werden können. Eine schematische Darstellung des AFM-Aufbaus ist in Abbildung 15 gezeigt.

Allgemein gilt für alle Abbildungsmodi des AFM, dass die Tastspitze durch das Steuerelement für die X- und die Y-Achse (x,y-Piezo) Zeile für Zeile über das zu untersuchende Objekt gerastert und dabei über die Feedbackschleife das z-Piezoelement so nachgeregelt wird, dass das vorgegebene Detektorsignal („Setpoint“) konstant bleibt. Das „Setpoint“-Signal entspricht einem festen Abstand zwischen z-Piezoelement und Probenoberfläche, so dass man durch Auftragen der absoluten z-Position des Piezoelementes entlang der Rasterrichtung ein dreidimensionales Bild der Oberflächentopographie erhält.

Die Besonderheit der Rasterkraftmikroskopie liegt darin, dass neben der topographischen Information auch noch weitere Eigenschaften der Probe, wie z.B. Reibung und Viskosität, erfasst werden können. Das Rasterkraftmikroskop hält verschiedene Abbildungsmodi bereit, die in den nächsten Abschnitten genauer erklärt werden sollen.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung des AFM-Aufbaus.** Ein Laserstrahl wird auf die Oberseite des Federbalkens fokussiert und die Reflektion mittels einer Viersegment-Fotodiode detektiert. Darüber wird die Auslenkung des Federbalkens und somit das Höhenprofil der untersuchten Probe erfasst und über einen Regelkreis das Piezo-Stellelement nachreguliert.

### **Kontakt-Modus**

Bei der Verwendung des Kontakt-Modus wird die Spitze des Federbalkens in physikalischen Kontakt mit der Probenoberfläche gebracht. In diesem Modus kann zwischen zwei verschiedenen Anwendungs-Varianten unterschieden werden. Bei der Variante des „*Constant Height*“-Modus wird der Federbalken in einem konstant bleibenden Abstand zur Probenoberfläche gehalten, und die Auslenkung des Federbalkens in Z-Richtung, in Abhängigkeit zur X-Y-Position, detektiert. Besonders gut geeignet ist dieses Verfahren für sehr flache Proben, wohingegen für Proben mit besonders unregelmäßiger Oberfläche eine sehr starke

Wechselwirkung zwischen Messspitze und Probe auftritt. Dies kann zum einen zu Schädigungen der Federbalkenspitze führen, z.B. durch besonders harte und raue Proben, zum anderen kann eine Schädigung oder Beeinflussung der Probenoberfläche durch die dauernde Änderung des momentanen Anpressdrucks der Tastspitze erfolgen, was insbesondere für weiche, biologische Proben ein Problem darstellen kann. Der „*Constant-Height*“-Modus wird oft verwendet um Abbildungen im atomaren Maßstab von atomar ebenen Oberflächen zu erhalten, da dabei wegen der horizontalen Drift des Systems, mit sehr hohen Rastergeschwindigkeiten gearbeitet werden muss. Die Änderung der Auslenkung des Federbalkens, und somit die Variation der Auflagekraft, bleibt bei solchen Proben sehr klein.

Die zweite Variante ist der „*Constant-Force*“-Modus, bei der der Federbalken mit gleichbleibender Kraft über die Probe geführt wird. Kommt es hier zu einer Änderung der Höhe im Oberflächenprofil wird die Auslenkung des Federbalkens über den Regelkreislauf fortwährend nachreguliert. Die ausgeübte Kraft an einer Position der Probe wird dabei detektiert und über den Regelkreislauf so nachjustiert, dass für eine gleichbleibende Kraftausübung der Spitze auf die Probe gesorgt wird. Der gewünschte Sollwert für die wirkende Kraft wird dabei vor oder während der Messung eingestellt. Ein topographisches Profil der untersuchten Oberfläche bei gleichbleibender Kraftausübung wird hierbei erzielt.

### ***Nicht-Kontakt-Modus***

Im Nicht-Kontakt-Modus wird der Federbalken, wie auch im weiter unten beschriebenen Abtast-Modus (*Tapping-Mode*), zur Schwingung angeregt. Hierbei wird mit sehr kleinen Amplituden von weniger als 10 Nanometer gearbeitet. Bei diesem Modus berührt die Spitze nie die Oberfläche der Probe, sondern oszilliert während des Rasterprozesses frei über der Oberfläche. Die Interaktion des Federbalkens mit der Probe erfolgt dabei allein durch attraktive, beziehungsweise repulsive van der Waals-Kräfte, wobei erstere eine Reichweite von bis zu 10 Nanometern haben. Repulsive van-der-Waals-Kräfte treten dann auf, wenn sich der intermolekulare Abstand zwischen den beteiligten Interaktionspartnern auf wenige Angström (Å) verringert, und deren Elektronenwolken sich zu überlappen beginnen (Pauli-Prinzip bzw. Pauli-Repulsion). Ihre Reichweite ist wesentlich geringer als die der attraktiven Kräfte, und liegt im Sub-Nanometer-Bereich (wenige Angström). Durch die attraktiven Kräfte wird die Resonanzfrequenz des Federbalkens zu niedrigeren Frequenzen hin verschoben, was zu einer Verringerung der Schwingungs-Amplitude führt. Durch die Feedbackschleife wird das Piezo-

Stellelement in Z-Richtung so nachgeregelt, dass die vorher eingestellte „*Setpoint-Amplitude*“, also die maximale Auslenkung des Federbalkens in Z-Richtung, konstant bleibt, wodurch ein Topographiebild der Oberfläche generiert wird. Diese Technik besitzt den Vorteil, dass keine repulsive Kraft auf die Probenoberfläche ausgeübt wird, da die Spitze mit dieser nie in Kontakt kommt. Der Abstand zwischen Spitze und Probe limitiert allerdings die laterale Auflösung, die wesentlich schlechter ist als bei den beiden anderen Abbildungsmodi. Außerdem muss die Abbildungsgeschwindigkeit gegenüber Kontakt- und Abtast-Modus deutlich reduziert werden, um einen eventuellen Kontakt mit dem adsorbierten Flüssigkeitsfilm zu vermeiden. Der Nicht-Kontakt-Modus kann nur für extrem hydrophobe Proben, bei denen der Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche minimal ist, angewendet werden. Wenn diese Schicht zu dick ist, kann die Spitze von ihr eingefangen werden, was zu Instabilitäten bei der Abbildung führt. Aufgrund all dieser Nachteile sind die Anwendungsmöglichkeiten des Nicht-Kontakt-Modus sehr begrenzt und für die hier gemachten Experimente nicht wesentlich. Die Beschreibung dieses AFM-Modus wurde hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

### ***Abtast-Modus***

Beim Abtast-Modus, oder auch *Tapping-Modus*, *Intermittant-Contact-Modus* bzw. *AC-Modus*, wird der Federbalken zu einer Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Um die entsprechende Resonanzfrequenz zu finden wird vor der Messung ein sogenannter „*Frequency-Sweep*“ durchgeführt. Dabei wird die Amplitude und die Phasenverschiebung der Schwingung des Federbalkens bei jeder Frequenz ausgegeben und das Maximum der Amplitude (bzw. ein Phasendurchgang von  $2\pi$ ) dient der Identifikation der Resonanzfrequenz.

Wie im Kontakt-Modus auch, wird bei diesem Modus die Auslenkung über den Fotodetektor registriert. Daraus berechnet die Detektorelektronik die Wurzel des mittleren Auslenkungsquadrates (RMS), welche als Regelsignal für die Feedbackschleife verwendet wird. Die Schwingungsamplituden variieren typischerweise von 20 bis 100 nm, je nachdem wie groß die zu detektierenden Höhenunterschiede auf der Probe sind. Während des Rastens wird jeweils im Amplitudenminimum einer Schwingung die Probenoberfläche von der Spitze kurz berührt. Die dabei auftretende Wechselwirkung führt zu einer Dämpfung der Schwingungsamplitude des Federbalkens, die charakteristisch für einen bestimmten Abstand zur Oberfläche ist. Die Feedbackschleife regelt das Stellelement so nach, dass eine vorher

festgelegte „*Setpoint-Amplitude*“ konstant bleibt. Genauso wie im Kontakt-Modus kann man, durch Auftragen der Höhenänderung in Abhängigkeit zur lateralen Position auf der Probe, ein Bild der Oberflächentopographie erhalten. Ein Vorteil des Abtast-Modus sind die geringen lateralen Reibungskräfte, die durch den nicht-permanenten Kontakt der Spitze zur Oberfläche entstehen. Nicht fest adsorbierte Proben werden dadurch nicht mehr so leicht verschoben oder vom Substrat heruntergekratzt. Aus dem gleichen Grund kann auch die laterale Auflösung bei der Abbildung von leicht beweglichen und flexiblen biologischen Objekten deutlich erhöht werden. Ein Nachteil des Abtast-Modus besteht darin, dass die Abbildungsgeschwindigkeiten relativ klein gehalten werden müssen, da es durch die Regelschleife leichter zu Oszillationen kommen kann, wenn die Verstärkerstufen sehr hoch eingestellt werden. Außerdem kann diese Tatsache für die Untersuchung und Verfolgung von dynamischen Prozessen ein limitierender Faktor sein.

### 2.3.3 Quarzmikrowaage mit Dissipation

Die Quarzmikrowaage mit Dissipation (QCM-D - Quartz-Cystal-Microbalance with Dissipation) ist eine Methode zur Detektion von Veränderungen bezüglich Masse und Viskoelastizität an Oberflächen, die für die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens verschiedenster Materialien, wie Polymer- und Proteinfilme, aber auch Lipide oder Zellen verwendet werden kann [133]. Wie bei der Rasterkraftmikroskopie wird sich auch bei dieser Methode der piezoelektrische Effekt zu Nutze gemacht. Ein einzelner, dünner und scheibenförmiger Kristallquarz (AT-Cut) wird durch Anlegen einer elektrischen Spannung gepulst zum Schwingen angeregt, und die für den Kristall eigene Resonanzfrequenz wird detektiert. An Unter- und Oberseite des Kristalles sind Goldelektroden aufgedampft, die aktive Elektrode, sowie die Gegenelektrode (Abbildung 16).



Abbildung 16: Piezoelektrischer Kristall oder Schwingquarz mit aktiver Elektrode und Gegenelektrode (Firma Q-Sense, SE-426 77 Västra Frölunda, Schweden).

Durch Anlegen einer Wechselfspannung am Quarzkristall wird der piezoelektrische Effekt induziert, und der Kristall beginnt bei der für ihn charakteristischen Resonanzfrequenz in lateraler Richtung zu schwingen. Kommt es nun zur Anlagerung oder Ablösung von Material an der Detektionsfläche des Quarzes, erfolgt zum einen eine Änderung der Resonanzfrequenz und zum anderen eine Änderung der Eigenschaften der Schwingungsdämpfung. Durch Veränderungen der Resonanzfrequenz ( $\Delta f_R$ ) kann auf Veränderungen der angebundenen Masse an der Kristalloberfläche geschlossen werden. Sinkt die Resonanzfrequenz, nimmt die Masse an der Kristalloberfläche zu und umgekehrt. Durch die gepulste Anregung kann zusätzlich auf die Dämpfungseigenschaften des angelagerten Materials geschlossen werden. Dabei wird der zeitliche Abfall der Schwingungsamplitude in der schwingungslosen Phase der gepulsten Anregung gemessen und darüber auf die Dämpfungseigenschaften des angelagerten Materials geschlossen. Über Veränderungen im Dissipationsverhalten ( $\Delta D$ ) können somit Aussagen bezüglich der Viskoelastizität der aufgetragenen Schicht getroffen werden [133].

Ein kommerzielles Gerät das beide Prinzipien kombiniert und in dieser Arbeit verwendet wurde, stellt das QCM-D D300 System der Firma Q-Sense (Q-Sense, Västra Frölunda, Schweden) dar. Die hier verwendeten 5 MHz Schwingquarze werden periodisch zur Schwingung an ihrer Grundfrequenz, angeregt und dann von der antreibenden Spannungsquelle wieder getrennt. Diese Schwingung, sowie die Schwingungen beim dritten (15 MHz), fünften (25 MHz) und siebten (35 MHz) Oberton werden detektiert. Neben den erwähnten Goldoberflächen und den in dieser Arbeit verwendeten Silizium-Oberflächen können auch mit Titan, Platin oder Aluminium bedampfte Sensorkristalle genutzt werden, deren Oberflächen auch weitergehend chemisch modifiziert werden können.

Wie bereits erwähnt ist eine Veränderung der Resonanzfrequenz ( $\Delta f_R$ ) auf eine Änderung der angebundenen Masse ( $\Delta m$ ) zurückzuführen. Die Empfindlichkeit steigt dabei mit der Höhe des Obertons. Der quantitative Zusammenhang wird dabei über die Formel von Sauerbrey bestimmt. Darüber kann die Veränderung in der detektierten Resonanzfrequenz mit der Massenveränderung an der Kristalloberfläche in Bezug gesetzt werden. Da die Erfassung der Frequenzänderung mit einer sehr hohen Genauigkeit erfolgt, sind selbst geringste Massenänderungen messbar.

**Sauerbrey-Gleichung:**

$$\Delta m = -c * \frac{\Delta f R}{n}$$

m = Masse

c = Materialkonstante des verwendeten Schwingquarz

f<sub>R</sub> = Resonanzfrequenz

n = 1, 3, 5, 7 - Obertöne der Schwingung (Vielfaches von f<sub>R</sub>)

Nimmt die Resonanzfrequenz ab ( $\Delta f_R < 0$  MHz), so hat eine Anlagerung von Masse an der Kristalloberfläche stattgefunden. Nimmt die Resonanzfrequenz dagegen zu ( $\Delta f_R > 0$  MHz), kam es zu einer Abnahme der Masse an der Kristalloberfläche. Für nicht beschichtete Kristalle an Luft liegt die Messempfindlichkeit bei 1 ng/cm<sup>2</sup>, und in Flüssigkeiten bei 5 ng/cm<sup>2</sup>.

Für die Anwendung der Formel von Sauerbrey müssen allerdings folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. die angelagerte Masse muss als starrer und rutschfester Film vorliegen
2. die angelagerte Masse ist gleichmäßig in einem geschlossenen Film an der Kristalloberfläche verteilt
3. die angelagerte Masse ist wesentlich kleiner als die Masse des Quarz-Kristalls

Die zweite detektierte Größe ist wie oben erwähnt, das Dissipationssignal. Über die erhaltenen Werte für die Dissipation können Aussagen zu den viskoelastischen Eigenschaften des oberflächengebundenen Films getroffen werden. Die Werte für die Dissipation werden über folgende Formel ermittelt:

$$D = \frac{E_{lost}}{2\pi} * E_{stored}$$

- $D =$  Dissipation (Summe aller Mechanismen, die zur Dämpfung des schwingenden Systems beitragen)
- $E_{\text{lost}} =$  Energie die während des Abklingens der Oszillation verloren geht. Es können also formal mehr Effekte als nur die Trägheit des schwingenden Kristalls mit einfließen. Als Faustregel kann man aber davon ausgehen, dass Trägheit der maßgebliche Faktor ist.
- $E_{\text{stored}} =$  Energie der stabil etablierten Oszillation

Wächst das Dissipationssignal an ( $\Delta D_{\text{is}} > 0$ ), so wird das gesamte schwingende System in der Ausschwingphase stärker gedämpft. Das bedeutet, dass an der Kristalloberfläche eine Anlagerung von Molekülen oder Material stattgefunden hat, welches eine größere Trägheit aufweist als der Schwingquarz selbst (Proteine, Lipide, Polymere, Zellen etc.). Mit zunehmender Elastizität des Films kann eine steigende Dissipation erwartet werden.

Nimmt das Dissipationssignal dagegen ab ( $\Delta D_{\text{is}} < 0$ ), so ist das Gesamtschwingverhalten des Kristalls starrer. Dies kann z.B. durch die Ablösung eines dämpfend wirkenden Proteinfilms geschehen.

In dieser Arbeit wurde die Methodik der QCM-D hauptsächlich dazu verwendet, das Adsorptionsverhalten von Vesikeln unterschiedlicher Phospholipidzusammensetzung an Silizium-Oberflächen zu untersuchen. So sollte sichergestellt werden, dass für die relevanten Kompositionen eine Transformation vom vesikulären Zustand, zu einer Lipiddoppelschicht erfolgte.

### 2.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Mittels der Methode der Fluoreszenzmikroskopie sollten Phospholipid-Vesikel in einem alternativen Verfahren gegenüber der weiter oben beschriebenen AFM-Methode untersucht werden. Im Gegensatz zu den Experimenten mit AFM können mit dieser Methode nicht nur

oberflächenunterstützte Modellmembranen und deren Phasenseparationsverhalten untersucht werden, sondern auch frei in Lösung (Wasser oder Pufferlösung) befindliche Vesikel, welche in einer Größenordnung  $> 1 \mu\text{m}$  vorliegen müssen. Durch Anwendung dieser Methode sollten die Ergebnisse aus den AFM-Messungen verifiziert und etwaige Unterschiede zwischen den Versuchssystemen aufgezeigt werden. Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die sich bevorzugt in eine der auftretenden Lipid-Phasen einlagern, kann eine Domänenbildung innerhalb der Membran sichtbar gemacht werden. Außerdem ist es möglich die Bindung von Proteinen an bestimmte Bereiche der Modellmembranen aufzuzeigen. Das in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzmikroskop war ein BZ 8000K (Keyence, Siemensstraße. 1, 63263 Neu-Isenburg). Dabei handelt es sich um ein inverses Mikroskop. Für die Experimente wurden selbstgebaute Mikroskopie-Kammern verwendet, die aus einer Art Metalltrog aufgebaut waren, dessen Unterseite durch ein Deckglas gebildet wurde. In diese Kammern wurde die GUV-Lösung eingefüllt und eine gewisse Zeit im Dunkeln stehen gelassen, bis sich die Zirkulation in der Flüssigkeit beruhigt, und die GUVs sich zum Boden der Messkammer abgesenkt hatten. Dadurch wurde eine bessere Darstellung der Vesikel ermöglicht, ohne diese zusätzlich an der Glasoberfläche fixieren zu müssen.

**Tabelle 3: Verwendete Filter**

	TX Red	Dapi-B	GFP-B
Ex	560/40	360/40	470/40
DM	595	400	495
BA	630/60	460/50	353/50

### 2.3.5 Dynamische Lichtstreuung

Zur Bestimmung der Teilchengröße in einer Lösung kann die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) verwendet werden, wenn der Viskoelastizitätskoeffizient ( $\eta$ ) der Lösung bekannt ist. Die Probe wird bei der Messung mit einem Laser bestrahlt. Diese interagiert mit den Teilchen der zu untersuchenden Lösung, wobei Streulicht entsteht. Die Photonen des Streulichts pro Zeitintervall werden von einem Fotomultiplier in einem Winkel von  $2\theta$  erfasst. Durch die Diffusionsbewegung der streuenden Teilchen ändert sich die Anzahl der Photonen pro Zeitintervall die vom Detektor erfasst werden, woraus der Diffusionskoeffizient der Teilchen

abgeleitet werden kann. Dieser kann über die Stokes-Einstein-Gleichung mit dem hydrodynamischen Radius (Stokes-Radius  $R_s$ ) der Teilchen in Lösung in Zusammenhang gesetzt werden, worüber dann wiederum deren Größe bestimmt wird. Unter dem hydrodynamischen Radius versteht man den Radius der in Lösung vorliegenden Teilchen, einschliesslich deren Hydrathülle. Diese bewegt sich in Lösung zusammen mit den Teilchen, die sie umschließt.

Stokes-Einstein-Gleichung: 
$$D = \frac{kT}{6R\pi\eta R_H}$$

$D$ : Diffusionskoeffizient

$k$ : Boltzmann-Konstante

$T$ : Temperatur

$\eta$ : Viskoelastizität der Lösung

$R_H$ : Hydrodynamischer Radius der Teilchen

In der hier vorliegenden Arbeit wurde für alle DLS-Messungen der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg) verwendet, um die Größe von Vesikeln zu bestimmen. Vor jeder Messung wurden die Proben in der Küvette invertiert und diese anschließend in das Gerät eingebracht. Dort erfolgte für zwei Minuten eine Temperierung der Küvette auf 20°C bevor zwei Messreihen mit je 11 Läufen durchgeführt wurden. Der Wert für  $\eta$  lag bei den hier verwendeten wässrigen Lösungen bei 1,03. Der finale Radius lag für die später verwendeten Vesikel-Lösungen in der Regel im Bereich der vorgesehenen Größe von entweder 50 – 80 nm oder 100 - 140 nm.

### 2.3.6 Röntgenabsorptionsspektroskopie

Im Wesentlichen ist die Methodik der Röntgenspektroskopie bereits in der Einleitung beschrieben. Weitere Details finden sich bei Panzer 2007 [5]. Hier werden die Eigenschaften der eingesetzten Beamline und der Endstation *Liquidrom* kurz aufgezeigt.

Der Speicherring des Bessy II ist wie folgt aufgebaut. Als Vorbeschleuniger dient ein 50 MeV Mikrotron, im Booster-Synchrotron werden die Elektronen dann auf 1,7 GeV beschleunigt und dreimal täglich im Speicherring akkumuliert, bis ein Strahlstrom von ca. 300 mA erreicht ist.

Die Beamline U41-PGM ist eine von zwei Beamlines am Undulator U41. Ausschlaggebend für die Wahl von U41-PGM für unsere Versuche war die vorhandene Linearpolarisation und ausreichende Strahlintensität im relevanten Weichröntgenbereich [134].

### **2.3.7 Ultrazentrifugation**

#### ***Präparative Ultrazentrifuge***

Die präparative Ultrazentrifuge wurde zur Aufbereitung des Crustaceen-Hämocyanins aus *Homarus americanus* verwendet. Bei der verwendeten Ultrazentrifuge handelte es sich um eine L7-55 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter GMBH, Krefeld).

#### ***Analytische Ultrazentrifuge (AUZ)***

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation können Aussagen zur Reinheit von Proteinproben und deren Güte (nativer oder dissoziierter Zustand) getroffen werden. Außerdem ist es möglich Aggregationszustand und Molekulargewicht der Probe zu ermitteln [135]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe sedimentieren Proteine mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Beim sogenannten Sedimentationslauf lässt sich der Sedimentationskoeffizient in Svedberg (S) bestimmen. Bei der Verwendung des Gleichgewichtslaufs wird dagegen das Molekulargewicht der Probe bestimmt. In dieser Arbeit wurde die AUZ zur Untersuchung des Aggregationszustandes des Hämocyanins aus *Homarus americanus* verwendet.

Durch die hohe Zentrifugalbeschleunigung, der die Proteine in der Ultrazentrifuge ausgesetzt sind, sedimentieren sie wesentlich schneller als unter normalen Schwerkraftbedingungen. Beim Zentrifugationsprozess wirken dabei unterschiedliche Kräfte auf die zu untersuchende Probe. Zum einen die zur Rotormitte gerichtete Auftriebskraft und die Reibungskraft, zum anderen die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft. Detektiert wird der Sedimentationsverlauf mit Hilfe eines speziellen Detektionssystems. In dieser Arbeit wurde die Analytical Ultracentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld), ausgestattet mit einer Interferenz- und Absorptionsoptik verwendet, wobei durch letztgenannte der hier verwendete Sedimentationslauf verfolgt wird.

Die Sedimentationsläufe wurden bei 4°C und im Vakuum durchgeführt. Der verwendete Rotor war hier der AN 50 T Rotor (Beckman Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B 13, Krefeld). Für die hier durchgeführten Versuche mit Hämocyanin aus *Homarus americanus* wurde eine Rotorgeschwindigkeit von 25000 rpm, und eine Versuchsdauer von > 3h angewendet. Um die Sedimentationsfront mit Hilfe der Absorptionsoptik verfolgen zu können, musste die Proteinlösung jeweils so verdünnt werden, dass sie bei 280 nm eine OD von 0,5 - 1 aufwies. In der AUZ beträgt die zurückgelegte Weglänge des Lichts durch die Probe 1,2 cm. Im Gegensatz zur Weglänge durch die Küvette im Absorptionsspektrometer (1 cm), wodurch die in der AUZ gemessene Absorption etwas höher ist als bei vergleichbarer Lösung im Photometer.

Die Zusammensetzung der Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurde das sogenannte „12 mm Epon charcoal-filled centerpiece“, als Kernstück der Zelle, und Saphir-Gläser verwendet. Es wurden Messzellen mit jeweils zwei Kammern zusammengesetzt. Eine Kammer wurde als Referenz mit Pufferlösung befüllt, die andere, die sogenannte Probenzelle, enthielt die Proteinlösung. Um den Meniskus besser verfolgen zu können, wurden die beiden Zellen mit leicht unterschiedlichen Volumina versehen (Referenz: 420µl Puffer; Probe: 400 µl Proteinlösung). Ausgewertet wurden die Messungen mit der Software Ultra Scan Version 7.2 für Linux und der Van Holde-Weischet-Analyse [135]. In dieser Analysemethode werden die Sedimentationsfronten in Fraktionen unterteilt, und je Fraktion ein apparenter Sedimentationskoeffizient berechnet. Anschließend erfolgte die Extrapolation der Daten und ein linearer Fit, wodurch die Sedimentation gegen die Diffusion korrigiert wird. Als Folge erhält man den korrigierten Sedimentationskoeffizienten.

### **2.3.8 Absorptionsspektroskopie**

Die Absorptions- oder UV/Vis-Spektroskopie ist eine Methode die hier zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen (Hämocyaninen) angewandt wurde. Das verwendete UV-Spektrometer war ein Cary 1E UV-Visible-Spektrophotometer (Varian, Alsfelder Strasse 6, Postfach 111435, 64289 Darmstadt). Gemessen wurde dabei in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 700 nm. Es wurden Quarzküvetten (Suprasil®, Hellma Analytic, Mülheim) mit einer

optischen Weglänge von 1 cm verwendet. Mit Hilfe des Gesetzes von Lambert-Beer wurde die jeweilige Proteinkonzentration der Lösung bestimmt:

$$\lg \frac{I}{I_0} = E = \varepsilon * c * l$$

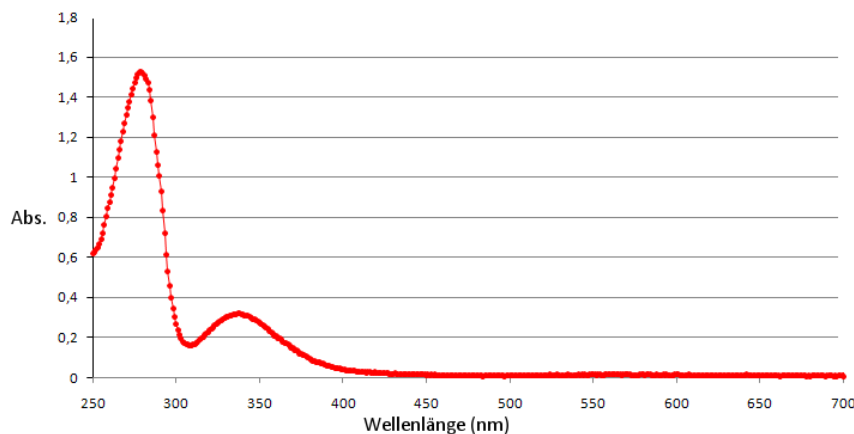
E = Extinktion

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [ $\frac{l}{mol} * cm$ ]

c = Konzentration [M] der absorbierenden Substanz

l = Lichtweg [cm] (oftmals auch d = Dicke)

Die Extinktion (E) ist eine einheitslose Größe. Der molare Extinktionskoeffizient ( $\varepsilon$ ) ist abhängig von der Wellenlänge des Lichts und der Temperatur. Das Verhältnis von I zu  $I_0$  ist ein Maß für die Lichtabschwächung innerhalb der Probe, wobei  $I_0$  die Lichtintensität vor der Probe, und I die Lichtintensität nach Probenaustritt bezeichnet. Das monochromatisierte Licht trifft auf die absorbierende Probe und nimmt beim Durchtritt um die Differenz zwischen  $I_0$  und I ab. Je kleiner I ist, umso mehr Licht wurde von der Probe absorbiert. Die Abschwächung ist umso stärker, je höher die Konzentration (c) der absorbierenden Teilchen und je länger der Lichtweg (d) ist.



**Abbildung 17: Typisches Absorptionsspektrum von Hämocyanin aus *Homarus americanus* (oxygeniert).** Der Peak bei 280 nm ist etwa um einen um Faktor 5 größer als der Peak bei 340 nm, was charakteristisch ist für Crustaceen-Hämocyanine.

### **2.3.9 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts und ihrer Ladung verwendet. Sie kann sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt werden. Das Grundprinzip der Elektrophorese ist es, Teilchen die eine Nettoladung besitzen im elektrischen Feld aufzutrennen. Wie weit die untersuchten Teilchen wandern, ist dabei abhängig von ihrer Größe und Form. Weiterhin spielen die Temperatur und der Widerstand, der den Teilchen im Trennmedium entgegengesetzt wird, eine Rolle [136].

Das Trennmedium für die Gelelektrophorese von Proteinen ist Polyacrylamidgel. Dabei wird die Gesamtmenge des Acrylamids im Gel angegeben. Je höher der prozentuale Anteil des Stoffes ist, umso geringer ist die Porengröße die im Gel ausgebildet wird, und umso besser können kleine Moleküle aufgetrennt werden

Weiterhin wird zwischen Sammelgel, das zur Konzentrierung der untersuchten Proben dient, und dem Trenngel, in dem die eigentliche Separierung der Moleküle stattfindet, unterschieden. Das Trenngel kann eine gleichförmige Zusammensetzung haben (homogenes Gel), oder einen Porengradienten besitzen (Gradientengel).

### 3 Ergebnisse alpha-Toxin

#### 3.1 Untersuchung des Porenbildungsmechanismus des $\alpha$ -Toxins aus *Staphylococcus aureus*

Dieser Teilabschnitt meiner Arbeit befasst sich mit der Interaktion des  $\alpha$ -Toxins aus *Staphylococcus aureus* mit PhosphoLipidmembranen. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxine werden vom Bakterium als wasserlösliche Monomere abgesondert und binden in dieser Form an die Zielmembran. Dort treffen sie auf weitere Monomere, interagieren mit diesen und lagern sich zu in der Regel heptameren Proteinkomplexen zusammen. Diese durchlaufen in der Folge eine Konformationsänderung und bilden schließlich eine die Membran durchspannende Pore aus [1]. Im Mittelpunkt des Interesses stand hier die Frage, ob eine Oligomerisierung, bzw. eine Porenbildung von  $\alpha$ -Toxin-Monomeren, bevorzugt an bestimmten, Raft-artigen Abschnitten der Membran erfolgt.

Durch Phasenseparation der Membran kommt es zum Auftreten unterschiedlich strukturierter Bereiche, den sogenannten Domänen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich Kopfgruppendichte und struktureller Zusammenlagerung der beteiligten Phospholipide, sowie oftmals auch durch ihre Schichtdicke. Hinweise waren gegeben, dass Unterschiede bezüglich der lokalen Dichte von Phosphocholin-Kopfgruppen, sowie eine strukturell unterschiedliche Umgebung innerhalb der jeweiligen Domänen, die Oligomerisierung der Toxine beeinflussen [137,2].

In diesem Zusammenhang sind zwei Arten von Bindestellen für das  $\alpha$ -Toxin beschrieben [137,2]. So weisen Kaninchen- Erythrozyten hochaffine Bindestellen auf, die bereits für nanomolare  $\alpha$ -Toxin-Konzentrationen sensitiv gegenüber dem Protein sind. Zellen mit niederaffinen Bindestellen, wie sie für humane Erythrozyten gefunden wurden, zeigen dagegen erst bei mikromolaren Konzentrationen ( $>1\mu\text{M}$ ) Sensitivität [137,2].

Bindungsstudien, durchgeführt an Vesikeln bestimmter Phospholipidzusammensetzung zeigten, dass sich hochaffine Bindestellen hauptsächlich aus Sphingomyelinen und Cholesterol zusammensetzen, wodurch eine spezielle räumliche Anordnung in der Membran, sowie die oben erwähnte laterale Verdichtung an Phosphocholin-Kopfgruppen auftritt [2]. Auf Grund dieser

Verdichtung der Toxin-Bindestellen, und möglicherweise auch wegen weiterer struktureller Besonderheiten dieser Membranbereiche, erfolgt eine Oligomerisierung der Toxin-Monomere zu Poren bevorzugt an diesen Membranabschnitten. Niederaffine Bindestellen werden dagegen von Bereichen der Membran gebildet, die zwar Phosphocholin präsentieren, aber keine so hohe Kopfgruppendichte aufweisen wie die hochaffinen Bindestellen. Sie können zum einen aus Phosphatidylcholinen, oder Phosphatidylcholinen die mit Cholesterol interagieren, aufgebaut werden. Zum anderen aber auch aus Sphingomyelinen denen kein Cholesterol als Interaktionspartner zur Verfügung steht, und deren Kopfgruppen deshalb eine geringere laterale Dichte aufweisen.

Die hier verfolgte Arbeitshypothese sah vor, oberflächenunterstützte phasenseparierte Modellmembranen mit diesen Eigenschaften auszubilden, die unterschiedlichen Domänen der Membran einzuordnen, und mittels Rasterkraftmikroskopie eine mögliche Clusterung von  $\alpha$ -Toxin-Molekülen an den hochaffinen Bindestellen darzustellen.

Zu diesem Zweck wurden oberflächenunterstützte Modellmembranen (SPBs) auf gereinigten Silizium-, bzw. frisch gespaltenen Micaoberflächen ausgebildet, und hinsichtlich Phasenseparation und Toxin-Interaktion untersucht. Diese beiden Oberflächentypen erwiesen sich hinsichtlich der Präparation von phasenseparierten SPBs mit den für uns relevanten Phospholipidzusammensetzungen als sehr gut geeignet. Außerdem waren ähnliche Versuche mit oberflächenunterstützten Membranen auf Mica [57,138,139,140,141,142,143,144,145,146] und Silizium [147,148,149,150,151,152] auch in der Literatur beschrieben.

Das Adsorptions-Verhalten der hier verwendeten Vesikel wurde mittels Quarz-Mikrowaage (QCM-D) auf Siliziumdioxid-Oberflächen ( $\text{SiO}_2$ ) verfolgt. Die dazu eingesetzten siliziumbeschichteten Schwingquarze waren kommerziell erhältlich (Q-Sense). Schwingquarze mit einer Mica-Beschichtung sind dagegen bisher nicht kommerziell verfügbar. Trotzdem kann man den Prozess der Vesikel-Spreitung theoretisch auch auf Micaoberflächen mittels QCM-D verfolgen. Dazu müssen kommerziell erhältliche Quarze mit einer Micaoberfläche versehen werden. Ein von Richter publiziertes Modifikations-Protokoll ist bekannt [153]. Eigene Versuche dieses Protokoll durchzuführen waren allerdings nicht erfolgreich. Es konnte keine stabile Resonanzfrequenz für die behandelten Schwingquarze etabliert werden. Die Abbildung der SPBs mit AFM wurde dagegen für bestimmte Systeme sowohl auf Silizium- als auch auf Micaoberflächen realisiert. Da beide Materialien sehr ähnliche Oberflächeneigenschaften aufweisen [59,154,155], und AFM-Vergleiche von SPBs gleicher Phospholipidzusammensetzung, sowohl auf Silizium als auch auf Mica sehr ähnliche Ergebnisse lieferten, kann davon

ausgegangen werden, dass tendenziell auf beiden Oberflächenmaterialien eine entsprechende Vesikel-Interaktion erfolgt.

Alle in der Folge beschriebenen QCM-D-Ergebnisse wurden demnach auf Silizium-Oberflächen erzielt, wohingegen Versuche mit AFM sowohl auf Silizium als auch auf Mica gemacht wurden. Die Ausbildung oberflächenunterstützter Modellmembranen erfolgte für die AFM-Experimente durch Überschichtung der jeweiligen Substratoberflächen, analog zu den Versuchen mit der Quarzmikrowaage. Welche Oberfläche im Einzelnen verwendet wurde ist dabei in den Bildunterschriften und im Text vermerkt.

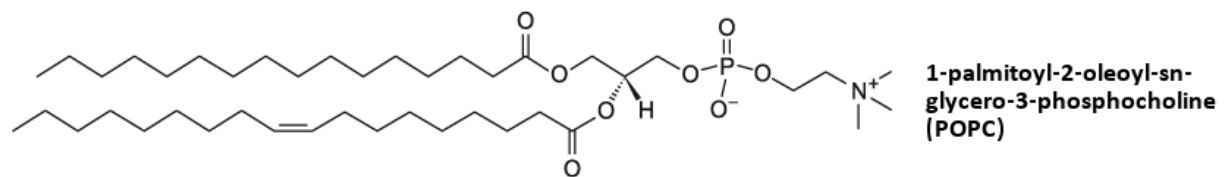
In den Experimenten wurden Modellmembranen verwendet, die aus einer, zwei (binär) oder drei (ternär) Phospholipid-Komponenten zusammengesetzt waren. Systeme aus einer Komponente, sowie binäre Phospholipidsysteme wurden zur Gewinnung der nötigen Expertise hinsichtlich SPB-Präparation und -Darstellung genutzt. Das Hauptaugenmerk lag aber auf ternären Systemen, welche sich für die Ausbildung phasenseparierter SPBs eigneten, und die aus einer für meine Versuche relevanten Phospholipid-Komposition zusammengesetzt waren. So konnten für bestimmte Kompositionen aus Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SM) und Cholesterol (Chol) verschiedene Lipid-Phasen innerhalb eines SPB dargestellt und voneinander unterschieden werden. Durch Zugabe von Toxin zu solchen phasenseparierten Membranen war es möglich das Bindeverhalten der Toxine zu studieren, eine bevorzugte Interaktion mit bestimmten Domänen darzustellen, und Aussagen bezüglich des Verhaltens der  $\alpha$ -Toxine gegenüber „Nachbildungen“ von hoch- bzw. niederaffinen Bindestellen zu treffen.

Weiterhin wurden ternäre Systeme untersucht, die anstelle der PC-Moleküle (ePC, DOPC oder POPC) DOPS bzw. DOTAP als Phospholipid-Komponente mit niedrigem Schmelzpunkt aufwiesen, und in Verbindung mit SM und Cholesterol ebenfalls Phasenseparation zeigten. Auch sie wurden auf ihr Verhalten hinsichtlich der Toxin-Interaktion im AFM untersucht.

Je komplexer ein solches Lipidsystem zusammengesetzt ist, desto schwieriger wird es die SPB-Ausbildung zu steuern, sowie die einzelnen Domänen der Doppelschicht einzuordnen und zu differenzieren. In den folgenden Abschnitten sind die Resultate bezüglich Schichtdicke der ausgebildeten Membran, Domänenbildung und Ko-Lokalisation mit den Toxinen beschrieben. Die dargestellten AFM-Aufnahmen stellen Höhenunterschiede im Oberflächenprofil über eine Farbcodierung dar. Dunkle Bereiche kennzeichnen tiefer gelegene Abschnitte, hellere dementsprechend erhöhte Regionen. In allen Abbildungen sind zusätzliche Höhenprofile eingezeichnet, welche die jeweiligen Höhenunterschiede verdeutlichen.

### 3.1.1 Oberflächenunterstützte Modellmembranen aus einer Phospholipid-Komponente

Zunächst wurden Vesikel untersucht, die nur aus einer Phospholipid-Komponente bestanden. Verwendung fanden hierfür aus Hühnereigelb isolierte L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine. Den polaren Anteil der Moleküle bildet eine Phosphocholin-Kopfgruppe, welche über ihren Phosphatrest mit Glycerin verestert ist. An diesen Phosphatrest sind außerdem zwei Kohlenwasserstoffketten über Esterbindungen angehängt (Abbildung 18). Charakteristisch für eine solche Mischung natürlich vorkommender Phosphatidylcholine ist ein Schmelzpunkt ( $T_M$ ) von ca. 4°C. So aufgebaute Vesikel waren ein einfaches und gut kontrollierbares System, um das Verfahren der SPB-Ausbildung zu testen und grundlegende Kenntnisse bezüglich dieses Vorgangs zu gewinnen. Es konnten SPBs hergestellt werden, die bei Raumtemperatur in der flüssig-ungeordneten Phase ( $l_d$ ) vorlagen.



**Abbildung 18: Strukturformel von Phosphatidylcholin.** Abgebildet ist 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-Phosphocholine (POPC) die Hauptkomponente der heterogenen Mischung des aus Eigelb gewonnenen Lipids. (Quelle: Avanti Polar Lipids - <http://www.avantilipids.com/>).

#### 3.1.1.1 Überprüfung des Spreitungsverhaltens mit QCM-D

Phospholipid-Vesikel aufgebaut aus ePC-Molekülen wurden mit QCM-D auf ihr Spreitungsverhalten getestet. Dabei zeigte sich das aus der Literatur bekannte Verhalten für solche Vesikel auf Siliziumoberflächen [156]. Der Prozess, der zur Ausbildung einer oberflächenunterstützten Membran führt lässt sich nach Reimhult in drei Phasen unterteilen und ist hier am Beispiel eines von mir durchgeführten Experiments dargestellt (Abbildung 19). Die schwarzen Pfeile markieren dabei den Zeitpunkt, an dem die Zugabe der Vesikel-Lösung in die Messkammer erfolgte.

In Abschnitt (I) erfolgt nach etwa fünf Minuten Messzeit die Adsorption und Interaktion der Vesikel mit dem Substrat. Durch die Massenlagerung kommt es zur Abnahme der Resonanzfrequenz ( $f$ ) und zu einer Zunahme der Dissipation ( $D$ ). Der Beginn von Abschnitt (II), der durch den Maximalwert von  $\Delta D$  bzw. den Minimalwert von  $\Delta f$  charakterisiert wird, markiert den Zeitpunkt, an dem eine kritische Konzentration von Vesikeln an der Oberfläche erreicht ist, und die Membran-Ausbildung einsetzt [157,156]. Dabei interagieren die Vesikel untereinander und mit der Substratoberfläche, und es kommt zu einer Krümmung der Vesikelmembran. Diese überschreitet schließlich einen kritischen Wert, wodurch es zum Aufreißen der Vesikel kommt. Das eingeschlossene Wasser bzw. die Pufferlösung, wird ins Umgebungsmedium abgegeben und die Membranen lagern sich planar an das Substrat an. Durch die Wasserabgabe kommt es zum Massenverlust an der Oberfläche, was durch die Zunahme der Resonanzfrequenz beschrieben wird. Die damit einhergehende Abnahme im Dissipationssignal erklärt sich durch die Transformation von flüssigkeitsgefüllten Vesikeln hoher Trägheit, zu mehr oder weniger starren Phospholipiddoppelschichten an der Substratoberfläche. Abschnitt (III) stellt dann den finalen Ausbildungsprozess der Modellmembran an der Oberfläche dar. Beide gemessenen Signale bleiben ab einem gewissen Zeitpunkt (ca. Minute 13) unverändert, was den Abschluss des Vorgangs beschreibt.

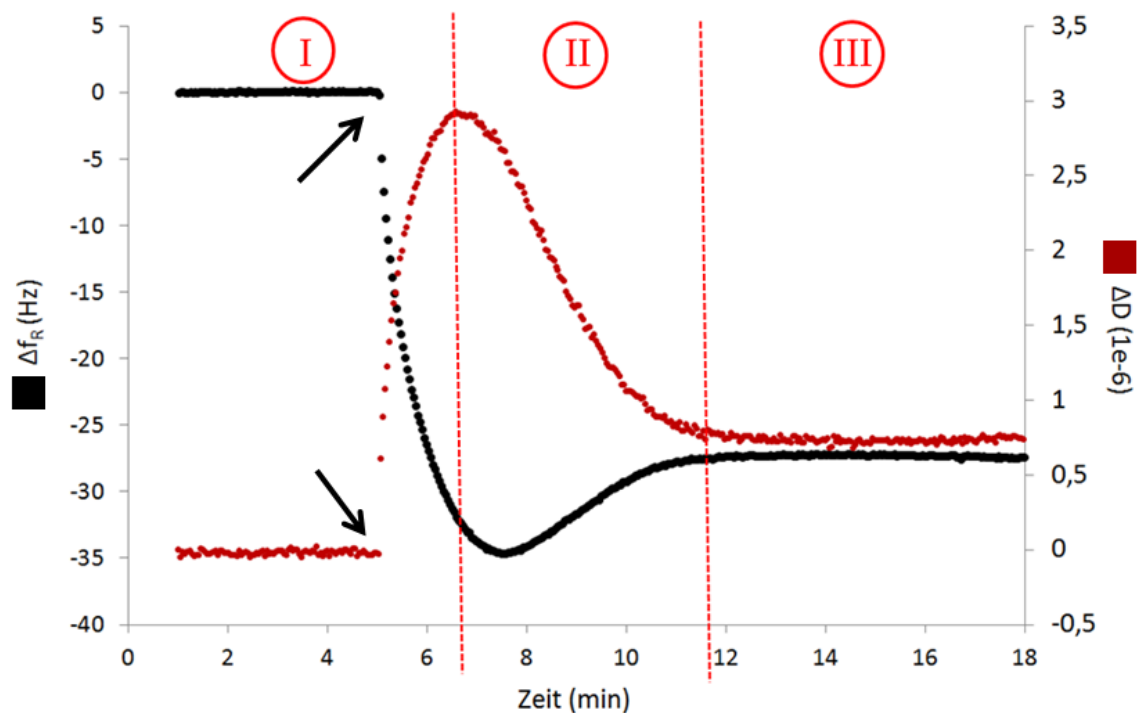


Abbildung 19: Typischer Verlauf einer Messkurve für die Ausbildung eines SPBs, hier dargestellt für Vesikel aus ePC auf einer Siliziumoberfläche. Die mit I, II und III markierten Bereiche entsprechen der Beschreibung im Text.

Im Vergleich zu den Messwerten aus den Publikationen von Reimhult et al 2003 zeigten sich in meinen Experimenten sehr ähnliche Resonanzfrequenz- und Dissipationssignale. Lediglich leichte Variationen im zeitlichen Verlauf und bezüglich der finalen Werte der Resonanzfrequenzänderung ( $\Delta f$ ) und der Änderung im Dissipationssignal ( $\Delta D$ ) traten auf. In den von mir durchgeführten Experimenten lief dabei die SPB-Ausbildung etwas langsamer ab als aus der Literatur bekannt. Dies kann unter anderem daran liegen, dass die dort dargestellte Abbildung für eine solche Messung sich auf Vesikel-Größen von ca. 30 nm bezieht, und in meinen Versuchen Vesikel der Größe von ca. 80 nm verwendet wurden. Es ist möglich, dass der verlangsamte Prozess in meinen Versuchen mit den unterschiedlichen Krümmungen der Membran der eingesetzten Vesikel zusammenhängt. Weitere Faktoren könnten leicht variable Oberflächeneigenschaften des eingesetzten Supports, sowie Vesikel-Konzentrationen sein.

Dass die Ausbildung einer oberflächenunterstützten Membran erfolgte ist auf Grund des Kurvenverlaufs eindeutig. Die durchschnittliche Resonanzfrequenz-Änderung ( $\Delta f$ ), als Folge der Adsorption und Aufspaltung von ePC-Vesikeln, lag für meine Versuche bei -28 Hz und die Änderung der Dissipation ( $\Delta D$ ) bei  $0,7 \cdot 10^{-6}$ . Die Werte sind demnach gegenüber den Literaturwerten leicht erniedrigt ( $\Delta f$ ) bzw. leicht erhöht ( $\Delta D$ ), was mit dem Zustand der ausgebildeten oberflächenunterstützten Membran zusammenhängen kann. Es ist sehr wahrscheinlich, dass noch intakte Vesikel an der Oberfläche vorlagen, die durch das in ihrem Inneren gebundene Wasser sowohl zur Masse (kleineres  $\Delta f$ ) als auch zur Dissipation des Systems (höheres  $\Delta D$ ) beitrugen. Abbildung 19 zeigt einen für eine SPB-Ausbildung typischen Kurvenverlauf, der zwar wahrscheinlich keinen perfekt ausgebildeten SPB repräsentiert, wie er in der Literatur beschrieben wird, für meine Untersuchungen aber als ausreichend befunden wurde.

### ***3.1.1.2 Darstellung oberflächenunterstützter Modellmembranen mit AFM***

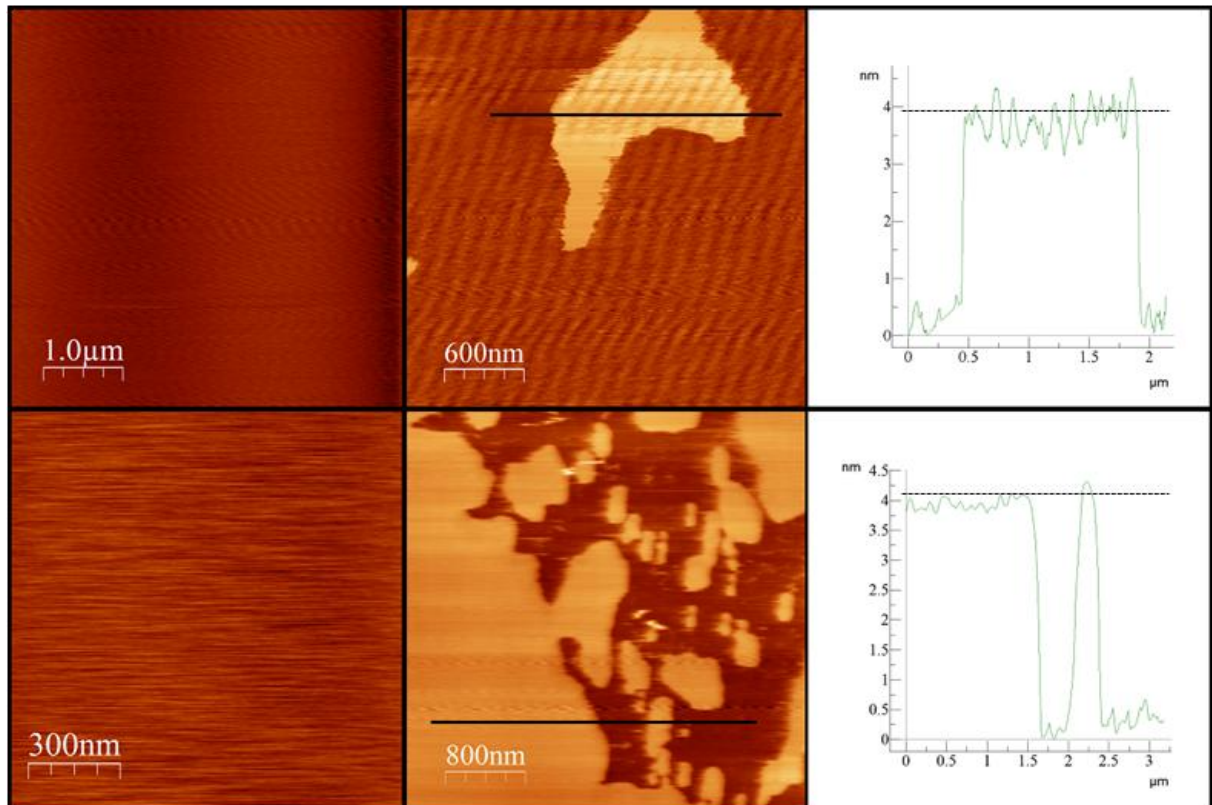
AFM-Untersuchungen an oberflächenunterstützten Modellmembranen, hergestellt aus ePC-Molekülen, wurden sowohl auf Mica als auch auf Silizium durchgeführt, und zeigten jeweils Schichtdicken von ca. 4 nm. Veröffentlichte Werte aus Neutronenstreu-Experimenten [158], sowie Ergebnisse oberflächenunterstützte Membranen betreffend [159,17] liegen ebenfalls in diesem Bereich. Allerdings sind auch Abweichungen bezüglich der Schichtdicke von SPBs in der

Literatur beschrieben. Je nach eingesetzter Lipid-Komposition, Präparationsmethode, Oberflächenmaterial, Federbalken und AFM-Abbildungsmodus können die Werte auch zwischen 3 und 6 nm liegen [58,160,145,161,140,141].

Abbildung 20 zeigt dazu eine vergleichende Darstellung zwischen Silizium- (untere Bildreihe) bzw. Micaoberflächen (obere Bildreihe) auf denen ein SPB aus ePC-Molekülen ausgebildet wurde. Substratoberflächen ohne ausgebildete Modellmembran sind jeweils links in der Bildreihe zu sehen. Substratoberflächen mit ausgebildeter Modellmembran sind in der Mitte dargestellt. Jeweils rechts finden sich Höhenprofile, die den schwarzen Balken der mittleren Darstellungen entsprechen. Die Höhendifferenz zwischen Substrat und Oberfläche der Membran beträgt für Versuche auf Mica ca. 3,5 – 4 nm, und auf SiO<sub>2</sub> ca. 4 nm. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt und die hier präsentierten Ergebnisse sind repräsentativ.

Generell kann die mittels AFM bestimmte Dicke der Modellmembranen etwas geringer ausfallen als die tatsächliche Schichtdicke. Durch die unterschiedlichen verwendeten Abbildungsmodi (Abtast- & Kontakt-Modus), und dem damit einhergehenden variablen Anpressdruck des Federbalkens auf die zu untersuchende Oberfläche, kann eine leichte Kompression bzw. Stauchung der Membran erfolgen. Je nachdem in welcher Phase die Lipide vorliegen, kann diese unterschiedlich stark ausfallen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass sehr spitze Tastspitzen tiefer in die Membranen eindringen als stumpfere. Auch hier kann je nach Lipid-Phase eine leichte Verfälschung der tatsächlichen Werte der Dicke der Membran bzw. der Höhendifferenzen zwischen verschiedenen Domänen, erfolgen.

Die Ausbildung eines SPBs für das Lipidsystem aus nur einer Komponente, bestehend aus Phosphatidylcholin, konnte somit, neben den dafür typischen QCM-D-Ergebnissen, auch durch AFM-Experimente nachgewiesen werden. Je nach Abbildungsbereich des AFM liegen teilweise gänzlich geschlossene Membranen-Abschnitte auf den Substratoberflächen vor. Diese können nur schlecht vom eigentlichen Substrat unterschieden werden. Daher ist es von großer Bedeutung solche Bereiche abzubilden, die kleinere Defekte in der ausgebildeten Membran, oder eine klare Stufenkante zwischen Membran und Substrat, aufweisen. Durch solche Defekte kann das Vorhandensein der Modellmembran verdeutlicht werden. In meinen Versuchen konnten Stufenkanten detektiert werden, die der Schichtdicke einer einfachen Membran entsprachen.

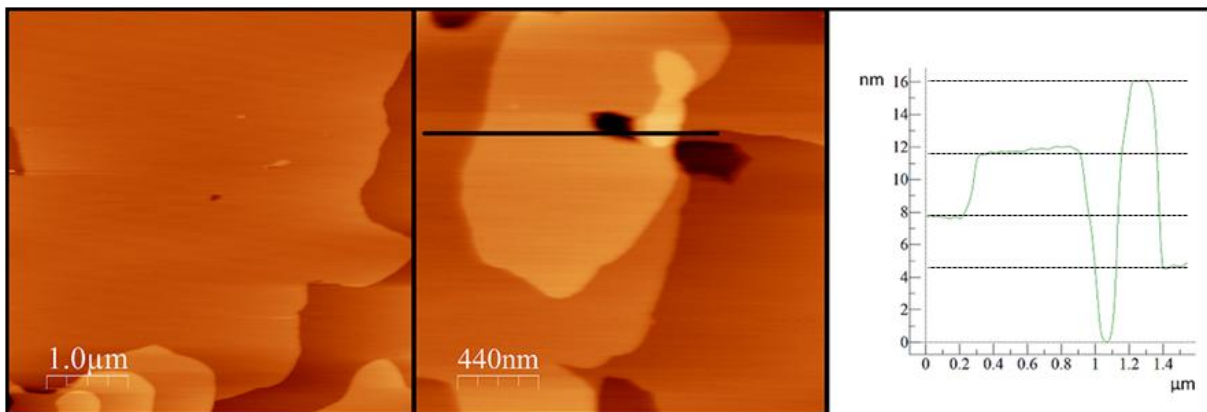


**Abbildung 20: Oberflächenunterstützte Phospholipid-Membran, hergestellt aus ePC-Molekülen, auf Mica (oben) und Silizium (unten).** Die linken Bilder zeigen die verschiedenen Oberflächentypen ohne ausgebildete Modellmembran. In der mittleren Darstellung sind ausgebildete SPBs zu sehen. Detektierte Membranschichtdicken betragen für beide Substrate ca. 4 nm. Ergebnisse mit und ohne SPB wurden an verschiedenen Proben erzielt. Rechts im Bild sind die Höhenprofile dargestellt, die den schwarzen Balken der mittleren Darstellungen entsprechen.

Sehr selten wurden außerdem Stapel von Membranen bzw. Membran-Überlappungen detektiert. Dieses Phänomen ist in Abbildung 21 dargestellt. Hier sind Stufenkanten von vier, acht, zwölf und sechzehn Nanometern im Höhenprofil zu sehen (rechtes Bild). In diesem Fall liegt also eine Überlagerung von bis zu vier Lipiddoppelschichten vor. Dieses Phänomen wurde bereits von Tokumasu et al. [141] für Vesikel bestehend aus DLPC publiziert. Solche Stapel entstehen entweder durch sehr lange Einwirkzeiten der Vesikel auf die Substratoberfläche, die aber in der Regel durch mehrfaches Spülen der Oberfläche mit Puffer-Lösungen gut zu entfernen sind [141], oder durch Überlagerungen der aufgebrochenen Vesikelmembranen bei der Ausbildung der SPBs.

Theoretisch fließen die oben liegenden Membranen dann seitlich zum Substrat hin ab und lagern sich an die bereits ausgebildeten Doppelschichten an, so dass eine weitestgehend aus einer Lage bestehende Modellmembran entsteht. Ist die Substratoberfläche allerdings bereits komplett

belegt bzw. die Freiräume zwischen bereits ausgebildeten Membranabschnitten nicht ausreichend groß, können Teilbereiche als Mehrfachlagen vorliegen.



**Abbildung 21: Membranstapel auf Siliziumoberflächen ausgebildet aus reinen ePC-Vesikeln.** Der schwarze Balken der mittleren Darstellung entspricht dem Höhenprofil rechts im Bild. Multilag sind zu sehen deren Stufenkanten 4, 8, 12 und 16 nm betragen.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente dienten als Vorversuche für die Präparation ternärer SPBs, sowie zur Gewinnung der nötigen Expertise die SPB-Ausbildung betreffend. Außerdem waren sie für die später beschriebenen Experimente bezüglich der Porenbildung des  $\alpha$ -Toxins von wesentlicher Bedeutung.

### 3.1.2 Ternäre Lipidsysteme aufgebaut aus Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Cholesterol

Ternäre Lipidsysteme sind, je nach eingesetzten Phospholipid-Komponenten und deren Mischverhältnis, gut geeignet um phasenseparierte und somit domänenausbildende Modellmembranen zu erzeugen. Allerdings zeigen sie nicht per se Phasenseparation. Es mussten ternäre Mischungen für die hier relevanten Lipid-Komponenten gefunden werden, die in der Lage waren Domänen auszubilden. Die angestrebte Darstellung der postulierten Ko-Lokalisation von Toxin-Molekülen und Membranabschnitten, welche die hochaffine Bindestelle repräsentieren, sollte so ermöglicht werden. Dazu wurden Vesikel, hergestellt aus verschiedenen Varianten von PC, SM und Cholesterol auf ihr Spreitungsverhalten an Oberflächen, sowie auf ihre Eigenschaft Domänen auszubilden, untersucht.

PC fungierte dabei als Phospholipid-Komponente mit niedrigem Schmelzpunkt, und SM als Phospholipid-Komponente mit hohem Schmelzpunkt. Die unterschiedlichen eingesetzten Phosphatidylcholone und Sphingomyeline variierten bezüglich des Sättigungsgrads ihrer Fettsäureschwänze (siehe Abbildung 23 und Tabelle 4), wodurch leichte Unterschiede bezüglich der jeweiligen Phasenseparation zu erwarten waren.

PC und SM tragen eine Phosphocholin-Kopfgruppe, wodurch sie prinzipiell beide als Bindestelle für Toxin-Monomere fungieren können. Auf Grund der bevorzugten Zusammenlagerung von SM und Cholesterol kommt es aber zur Ausbildung von Membranbereichen mit speziellen strukturellen Eigenschaften, die gegenüber den umliegenden Bereichen eine erhöhte Packungsdichte an Phosphocholin-Kopfgruppen aufweisen [40]. An diesen Abschnitten sollte, auf Grund der speziellen Struktur der Membran und der erhöhten Dichte an Bindestellen, eine gesteigerte Interaktion der Toxine mit der Membran erfolgen, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Proteinmonomere an der Oberfläche aufeinandertreffen, oligomerisieren und Poren ausbilden [2].

### ***3.1.2.1 Überprüfung des Spreitungsverhaltens zwitterionischer, ternärer Vesikel mit QCM-D***

Für die hier beschriebenen Experimente kamen die in Tabelle 4 aufgeführten ternären Phospholipid-Kompositionen zum Einsatz. Alle Versuche wurden dabei mindestens zweimal durchgeführt. Repräsentative Ergebnisse sind dargestellt.

Die Lipidsysteme I – III variierten nur in der Art der verwendeten Phosphatidylcholin- bzw. Sphingomyelin-Moleküle, in Bezug auf die angehängten Fettsäureketten und deren Heterogenität, nicht aber bezüglich ihrer Kopfgruppen. Diese waren in allen Fällen Phosphocholin-Kopfgruppen. Alle drei Systeme zeigten dabei ein Adsorptionsverhalten, welches dem eines Einkomponenten-Lipidsystems aus ePC-Vesikeln sehr nahe kommt (Abbildung 22). Im direkten Vergleich zwischen den ternären Systemen und dem Einkomponenten-System sind aber Variationen im Kurvenverlauf und in den Endwerten nach 30 Minuten Messdauer zu erkennen. Die leicht erhöhten Werte für  $\Delta f$  bzw. die leicht erniedrigten Werte für  $\Delta D$  sprechen dafür, dass für die hier eingesetzten ternären Systeme mehr intakte Vesikel an der Oberfläche verbleiben.

Grund dafür sind unter anderem die enthaltenen, phasenseparierenden Lipid-Komponenten und die durch Cholesterol verursachte erhöhte Flexibilität dieser Vesikel [162]. Diese Flexibilität führt dazu, dass eine größere Krümmung in der Vesikelmembran auftreten kann bevor diese aufreißt [162]. So bleiben mehr flüssigkeitsgefüllte Vesikel an der Substratoberfläche erhalten, was zu einer erhöhten Dissipation und einer erniedrigten Resonanzfrequenz beiträgt.

**Tabelle 4: Ternäre Phospholipidsysteme und ihre Komponenten.** Die Verhältnisse der eingesetzten Phospholipid-Komponenten in den einzelnen Systemen waren jeweils PC:SM:Chol - 0.35:0.35:0.3.

Ternäres System	Lipid 1 ( $T_M$ -low )	Lipid 2 ( $T_M$ -high )	Lipid 3 (Sterol)
I	ePC	eSM	Cholesterol
II	DOPC	PSM	Cholesterol
III	POPC	PSM	Cholesterol

Um Vergleiche bezüglich des Einflusses von Cholesterol auf den Vorgang der SPB-Ausbildung ziehen zu können, ist in Abbildung 22 zusätzlich ein binäres System, bestehend aus ePC und eSM (1:1) mit aufgeführt (Abbildung 22 - rot). Dessen Messkurvenverlauf ist fast identisch zum monomeren System (schwarz). Der Einfluss von Cholesterol auf die Flexibilität der Vesikelmembranen und auf das SPB-Ausbildungsverhalten wird dadurch deutlich.

Die Endwerte für die Resonanzfrequenz nach 30 Minuten Messdauer lagen für die ternären Systeme bei  $\Delta f = -38\text{Hz}$  (System I) und bei  $\Delta f = -32\text{ Hz}$  (System II & III). Das Einkomponenten-System sowie das binäre System wiesen dagegen Werte von  $\Delta f = -28\text{ Hz}$  bzw.  $-29\text{ Hz}$  auf. Eine perfekt ausgebildete Doppelschicht würde, ausgehend von Literaturwerten für ein Einkomponenten-System bestehend aus ePC-Molekülen, bei einer Resonanzfrequenzänderung von  $\Delta f = -25\text{ Hz}$  liegen [156,157].

Die Ausbildung einer oberflächenunterstützten Membran aus drei Lipid-Komponenten weist also Unterschiede gegenüber dem weiter oben beschriebenen nicht phasenseparierenden Einkomponenten-System auf. Für die ternären Systeme verbleiben wahrscheinlich mehr intakte Vesikel an der Oberfläche erhalten. Bezüglich der von uns angestrebten Untersuchungen dieser Lipidsysteme hinsichtlich ihres Domänenbildungsverhaltens spielt dieser Punkt aber eine untergeordnete Rolle, da intakte und an der Oberfläche verbliebene Vesikel oftmals durch die Interaktion mit der Tasts Spitze des Federbalkens im AFM aufreißen, und sich an bereits ausgebildeten Membranabschnitte anlagern oder in diese integrieren. Außerdem wird im AFM immer nur ein kleiner Bereich der präparierten Oberfläche erfasst, so dass es im Normalfall

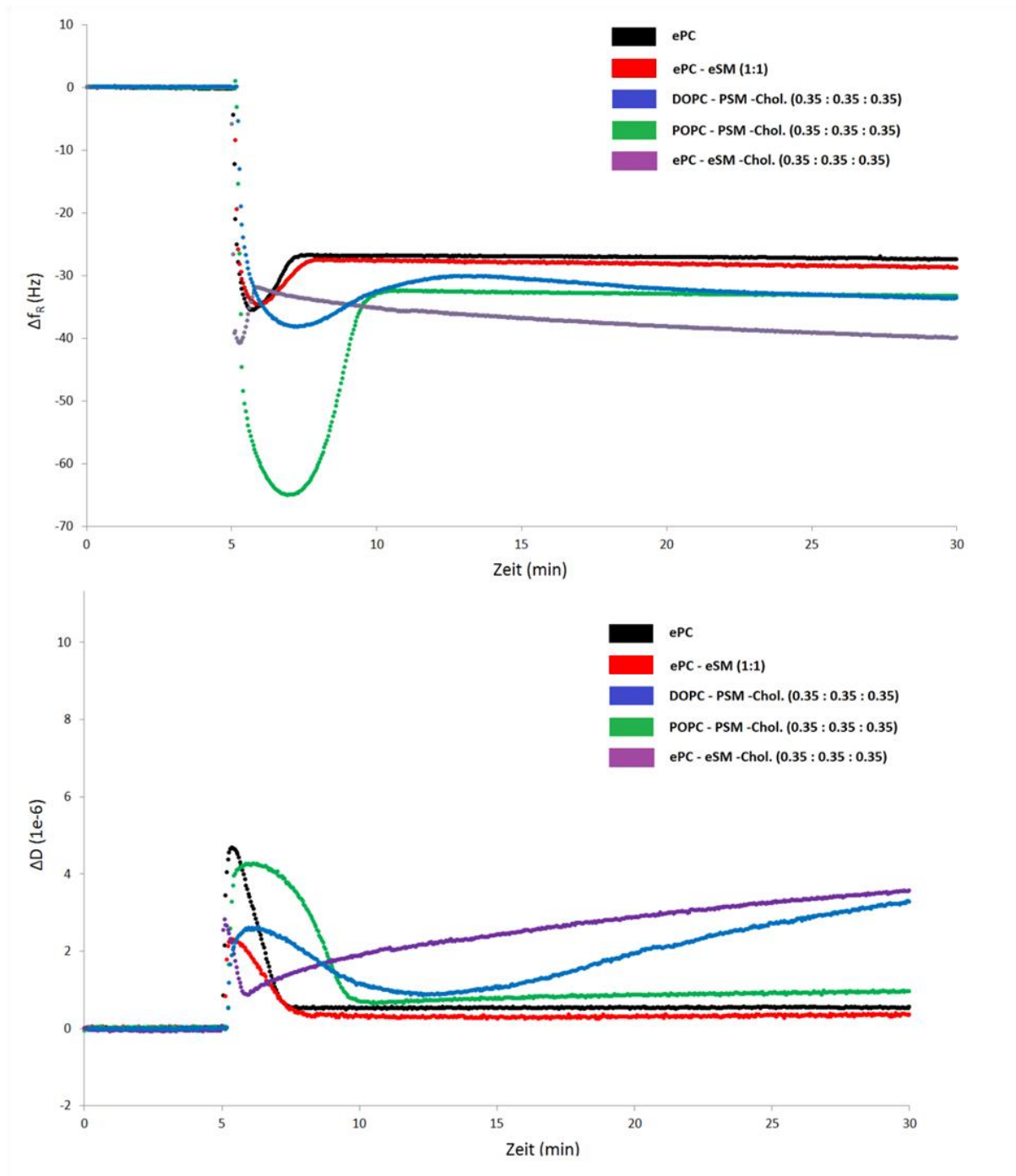
(durch Wechsel der Messposition o.ä.) kein Problem ist einen einschichtigen Abschnitt der Membran darzustellen.

Für die Dissipationssignale war ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Die finalen Werte für System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) & II (DOPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) lagen bei ca.  $\Delta D = 3,6 \cdot 10^{-6}$  und für System III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) bei  $\Delta D = 0,8 \cdot 10^{-6}$ . Das Einkomponenten-System und das binäre System (ePC:eSM – 1:1) zeigten dagegen Werte von  $\Delta D = 0,2 \cdot 10^{-6}$  und  $\Delta D = 0,3 \cdot 10^{-6}$ . Auch die Kurvenverläufe unterschieden sich zwischen den verschiedenen eingesetzten Lipidmischungen und je nach Anzahl und Art der Komponenten. Besonders augenscheinlich war dies im Fall von System III. Hier ist ein sehr großer Abfall der Resonanzfrequenz (Massenzunahme) zu beobachten, bevor der Prozess der Membranausbildung einsetzte.

System II zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf in Bezug auf den Beginn der Membranausbildung (Abbildung 22). Allerdings ist der dabei erfolgende Resonanzfrequenzabfall, also die Massenzunahme bzw. die benötigte kritische Oberflächenkonzentration der Vesikel, geringer als bei System III.

Beide Systeme (II & III) unterscheiden sich nur in einer Phospholipid-Komponente (DOPC vs. POPC). Die beiden Komponenten wiederum unterscheiden sich nur an Hand einer Fettsäurekette. DOPC besitzt zwei Oleinsäureketten, wohingegen POPC eine Oleinsäurekette und eine Palmitinsäurekette aufweist. Palmitinsäure ist gesättigt, Oleinsäure dagegen nicht (Abbildung 23). Sowohl DOPC als auch POPC sind Bestandteile des ePCs, wobei POPC die Hauptkomponente bildet.

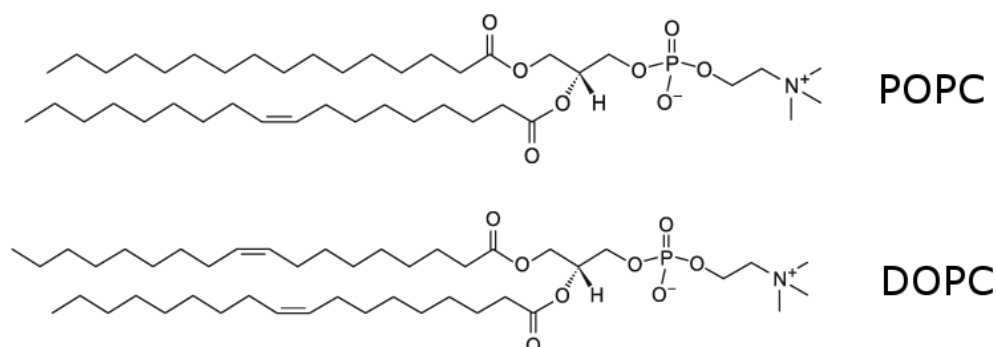
Diese Faktoren, bei ansonsten gleichbleibenden Parametern, scheinen einen sehr starken Einfluss auf die Interaktion der Vesikel mit dem Oberflächenmaterial zu haben. Ob dies der Hauptgrund dafür ist, dass sich die Kurvenverläufe für unterschiedliche Vesikel derart unterscheiden, ist unklar und auch nicht in der Literatur beschrieben. Die Messungen konnten auf Grund langer Defektzeiten der verwendeten QCM-Ds jeweils nur wenige Male durchgeführt werden und sind deshalb nicht statistisch verlässlich untersucht. Somit konnten keine konkreten Aussagen bezüglich dieser Frage gemacht werden.



**Abbildung 22: Übersicht SPB-Ausbildung verschiedener Lipid-Mischungen (oben: Resonanzfrequenz - unten: Dissipation).** Dargestellt ist das Adsorptionsverhalten für einkomponentige, binäre und ternäre Phospholipid-Mischungen. Der für die Ausbildung eines SPBs typische Kurvenverlauf ist mit Abstrichen für alle untersuchten Mischungen zu sehen.

Eine differenzierte Interaktion der Phosphatidylcholine und des Sphingomyelins mit Cholesterol kann eine wichtige Rolle spielen. Ein weiterer Grund für das hier gezeigte unterschiedliche Verhalten kann eine Variabilität im Messprozeß sein. Dabei können Variationen bezüglich Präparation der Vesikel und Aufreinigung der Substratoberflächen auftreten, wodurch SPBs

unterschiedlicher Güte ausgebildet werden. Solche „qualitativen Mängel“ können sich auch auf die Dauer des Ausbildungsprozesses niederschlagen. Wie die im Folgenden beschriebenen AFM-Ergebnisse für die ternären Systeme I – III zeigen, konnte aber in allen Fällen, sowohl auf Mica als auch auf Silizium, eine SPB-Ausbildung erzielt werden.



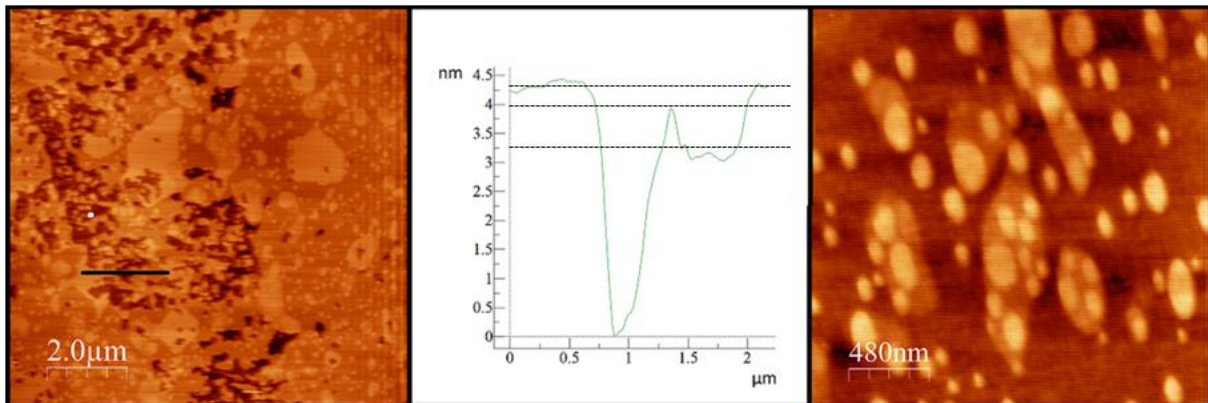
**Abbildung 23: Darstellung der beiden Hauptkomponenten des ePCs.** Die verschiedenen Phosphatidylcholine tragen Fettsäureschwänze, die sich in Kettenlänge und Sättigungsgrad unterscheiden. **Oben:** POPC - ein ungesättigter Fettsäureschwanz. **Unten:** DOPC - beide Fettsäureschwänze ungesättigt. (Quelle: Avanti Polar Lipids - <http://www.avantilipids.com/>).

### 3.1.2.2 Darstellung zwitterionischer, ternärer Modellmembranen mit AFM

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen ternären Phospholipidsysteme wurden für die Untersuchungen mittels AFM auf Silizium- sowie Micaoberflächen ausgebildet, und auf ihr Domänenbildungsverhalten hin untersucht. Zusätzlich wurden Versuche auf APTES-modifiziertem Mica vorgenommen. Zur Herstellung dieses Oberflächentyps wurde ein leicht modifiziertes Protokoll nach Leonenko et al [59] angewandt. Durch den Einsatz von APTES, einem kurzkettigen Silanmolekül, wurde die elektronegative Micaoberfläche durch die freie Aminogruppe des APTES, in eine elektropositive Oberfläche umgewandelt.

Für alle angegebenen Mischungen konnte mittels AFM Domänenausbildung an oberflächenunterstützten Membranen nachgewiesen werden. Abbildung 24 zeigt eine solche Modellmembran für System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) auf Silizium. Die dunklen (schwarzbraunen) Bereiche in der Abbildung stellen das Substrat dar, die helleren Bereiche die heterogene Modellmembran. An Hand des Höhenprofils (Abbildung 24 Mitte) wird deutlich, dass Membranbereiche unterschiedlicher Schichtdicke, sogenannte Domänen, vorlagen. Im linken

Teil der Abbildung ist eine Übersichtsdarstellung gezeigt. Der schwarze Balken entspricht dem Höhenprofil in der Abbildungsmitte. Für einen Teil der Membran beträgt die Schichtdicke ca. 3,4 nm, für andere Bereiche dagegen ca. 4,5 nm.

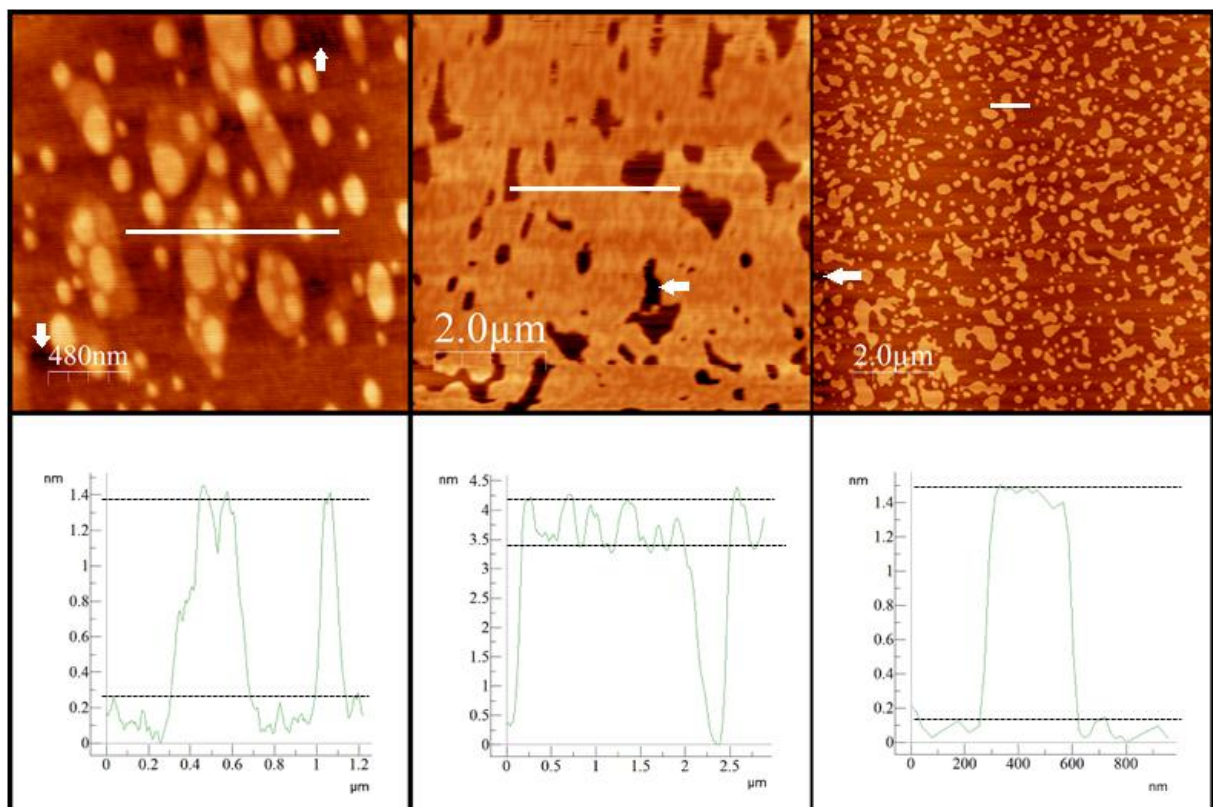


**Abbildung 24: SPB auf Silizium (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3).** Das Höhenprofil in der Mitte entspricht dem schwarzen Balken der linken Abbildung. Die Höhenlinien für die verschiedenen Schichtdicken der Membran sind eingezeichnet. Eine Domänenausbildung ist für diese Art SPB deutlich zu erkennen.

Die Schichtdickenunterschiede liegen in der lateralen Phasenseparation der Modellmembran, und der damit einhergehenden Domänenausbildung, begründet. Bereiche flüssig ungeordneter Phase ( $I_d$ ) lagen ebenso vor wie dichter gepackte Membranabschnitte der flüssig geordneten Phase ( $I_o$ ). Für die in diesen Versuchen eingesetzten Phospholipide entspricht die  $I_o$ -Phase den Abschnitten der Membran mit größerer Schichtdicke, und die  $I_d$ -Phase den Abschnitten geringerer Schichtdicke [163,164]. Betrachtet man den in Abbildung 24 rechts vergrößerten Ausschnitt genauer, so wird deutlich, dass sogar drei Membranbereiche (Domänen) unterschiedlicher Schichtdicke für dieses System auftraten. Entweder handelt es sich bei der dritten Domäne um eine feste Gel-Phase ( $s_o$ ) oder um eine zweite  $I_d$ - bzw.  $I_o$ -Phase. Diese Unterschiede können durch die heterogene Mischung der Fettsäureketten der verwendeten Lipide zu Stande gekommen sein. Für System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) kann also, zumindest teilweise, eine Modellmembran mit drei unterschiedlichen Domänen auftreten. Eine Zuordnung der unterschiedlichen Domänen zu bestimmten Lipidphasen konnte anhand von bereits publizierten Ergebnissen gemacht werden [17,165,141,166,167]. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich für Phospholipid-Mischungen, zusammengesetzt aus PC, SM und Cholesterol, eine  $I_d$ -Phase mit PC-Molekülen als Hauptkomponenten, und eine  $I_o$ -Phase, mit SM und

Cholesterol als Hauptbestandteile, ausbildet [163,164]. Dies war hier im Wesentlichen auch der Fall.

Alternativ zur Silizium-Oberfläche wurde reines Mica, sowie APTES-modifiziertes Mica, als Support für dieses System genutzt. Mica hat dabei ähnliche Oberflächeneigenschaften wie Silizium. Beide tragen eine negative Nettoladung an der Oberfläche [59,154]. Dagegen wird durch die APTES-Modifizierung auf der Micaoberfläche eine positive Ladung erzeugt. Aus der Literatur war bekannt, dass eine SPB-Ausbildung auf einer in dieser Weise modifizierten Micaoberfläche stattfinden kann. Leonenko et al beschreiben einen solchen Prozess für eine Einkomponenten-Modellmembran aus DOPC [59]. Für das hier beschriebene System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) konnten auf allen drei Oberflächentypen phasenseparierende Modellmembranen aus- und abgebildet werden. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt und repräsentative Resultate sind in Abbildung 25 im Vergleich gezeigt.



**Abbildung 25:** Vergleichende Darstellung der SPBs des Systems I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) auf Silizium (links), Mica (Mitte) und APTES-modifiziertem Mica (rechts). Die eingezeichneten Pfeile markieren Defekte im SPB, in der unteren Bildreihe gezeigte Höhenprofile entsprechen den weißen Linien in der oberen Bildreihe. Für alle Oberflächen ist eine Domänenausbildung deutlich zu erkennen. Die Höhendifferenzen zwischen den verschiedenen Lipidphasen liegen im Bereich um 1,2 – 1,4 nm (links), 0,8 – 1 nm (Mitte) und 1,2 - 1,4 nm (rechts). Der relative Anteil der Domänen variiert hier sehr stark. Gründe dafür können neben den unterschiedlichen Substraten auch die unterschiedlich langen Lagerungszeiten der untersuchten Proben sein.

Für die auf Silizium (Abbildung 25 – links) ausgebildeten ternären Lipidmembranen sind die bereits beschriebenen drei Domänenbereiche zu sehen. Hier lagen zwei Domänenformen vor, die im Höhenprofil gegenüber der sie umgebenden flüssig-ungeordneten Lipid-Domäne ( $I_d$ -Phase), um 1,2 nm bzw. 1,4 nm erhöht waren. Das gleiche System zeigte auch auf reinem, nicht modifiziertem Mica Phasentrennung (Mitte). In diesem Fall konnten jedoch nur zwei verschiedene Domänenformen unterschieden werden. Die Domänen der  $I_o$ -Phase lagen in diesem Fall nur um ca. 0,8 - 1,0 nm erhöht gegenüber denen der  $I_d$ -Phase vor.

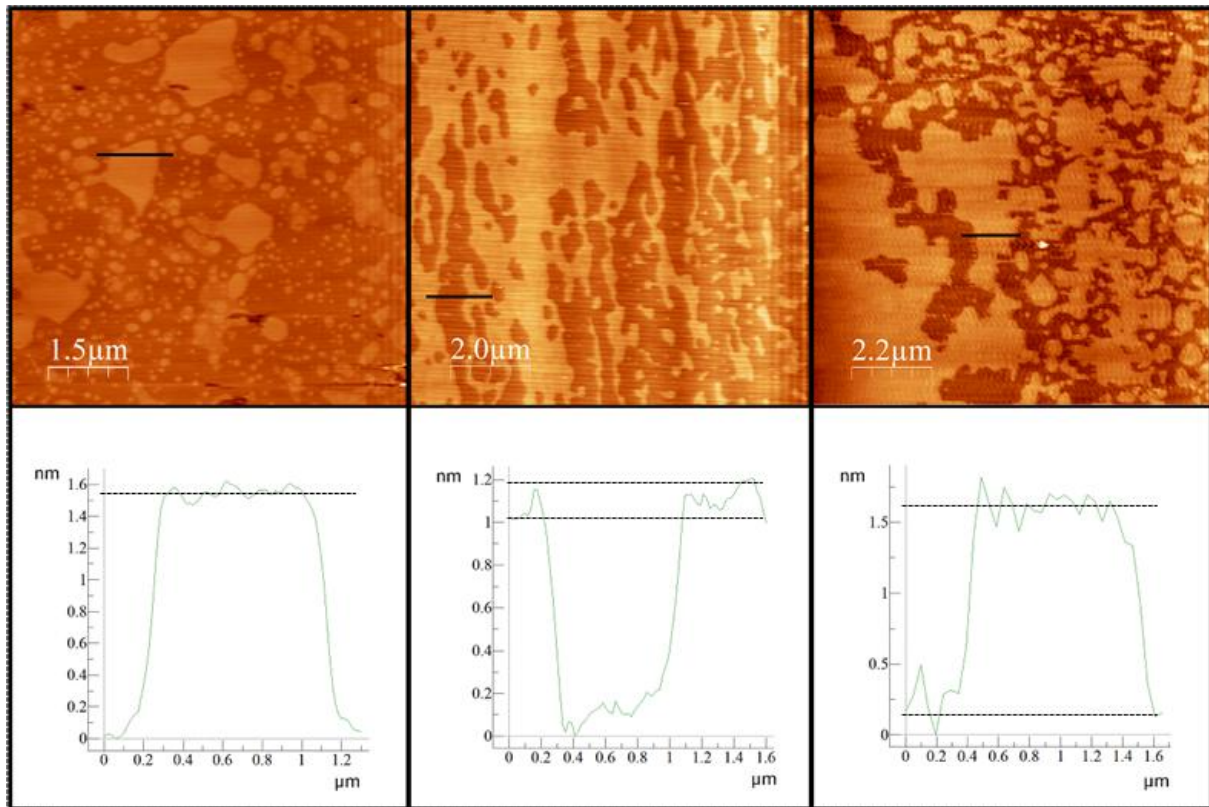
Für die mit APTES modifizierten Micaoberflächen (Abbildung 25 rechts) trat ebenfalls nicht die starke Heterogenität auf, die sich auf Silizium darstellte. Lediglich zwei unterscheidbare Domänen waren vorhanden, welche sich in ihrer vertikalen Ausdehnung um 1,3 – 1,4 nm unterschieden. Auf den unterschiedlichen verwendeten Oberflächen waren unterschiedlich große Bereiche an freiem Substrat zu sehen (Abbildung 25 – weiße Pfeile). Dies könnte auf Variationen bezüglich der Präparations- und Lagerungszeiten der Proben vor den Messungen zurückzuführen sein. Für Proben, die unmittelbar nach der Präparation untersucht wurden, traten dabei weniger freie Substratbereiche auf als bei Proben, die über Nacht oder ein bis zwei Tage gelagert wurden. Tendenziell verhielt es sich für meine Proben so, dass für längere Lagerungszeiten auch größere Membrandefekte zu finden waren. Ein solches Phänomen ist auch in der Literatur für einen SPB aus DOPC auf APTES-modifiziertem Mica beschrieben [59]. Dabei waren die auftretenden Defekte dynamisch, also in Form und Position leicht veränderbar, wurden aber nach einem gewissen Zeitraum (1,5 – 2h) nicht mehr größer. In allen Fällen in denen eine Lipiddoppelschicht aus ePC:eSM:Chol ausgebildet werden konnte, wurde auch eine Phasentrennung bzw. Domänenausbildung detektiert. Alle hier beschriebenen Versuchsansätze waren somit für unsere Zwecke geeignet.

Um den möglichen Einfluss der heterogenen Kettenlängen der unterschiedlichen verwendeten Phospholipide auf die Domänen-Ausbildung zu überprüfen, wurden Präparationen mit den Haupt-Phospholipid-Komponenten der in System I verwendeten Naturstoffe (ePC; eSM) gemacht (System II & System III). Dabei wurde ePC in einem Ansatz durch DOPC (System II), sowie im anderen Ansatz durch POPC (System III), ersetzt. Sphingomyelin aus Eigelb wurde in beiden Fällen durch dessen Hauptkomponente PSM ausgetauscht. Beide Kompositionen (II & III) zeigten auf Silizium ein für uns akzeptables Spreitungsverhalten (Abbildung 22). Ausgebildete oberflächenunterstützte Membranen wurden mit AFM untersucht und zeigten alle Phasentrennung. In Abbildung 26 ist ein Vergleich der Systeme I – III auf Silizium als Substratoberfläche dargestellt. Das eingesetzte Phospholipid-Mischverhältnis der

unterschiedlichen Komponenten war in allen Fällen gleich (PC:SM:Chol – 0,35:0,35:0,3). Die schwarzen Balken der in der oberen Bildreihe gezeigten Übersichtsdarstellungen entsprechen den darunter gezeigten Höhenprofilen.

Dabei fällt auf, dass im Vergleich zu System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3), für System II (DOPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) zwar Phasenseparation, und somit Domänen-Bildung auftrat, die Domänen in der  $l_o$ -Phase dabei aber bezüglich ihres Höhenprofils sehr homogen waren, und nicht zwei unterschiedlichen Arten von Domänen der  $l_o$ -Phase bzw. eine zusätzliche  $s_o$ -Phase auftraten. Dieser Sachverhalt könnte möglicherweise auf die definierte Länge der Fettsäure-Ketten für DOPC und POPC bzw. PSM in den Systemen II und III, im Gegensatz zu ePC und eSM im System I zurückzuführen sein. Für System II lag die durchschnittliche Erhöhung bei ca. 1,0 nm bis 1,2 nm und für System III bei ca. 1,4 nm. System I wies dagegen mehr Heterogenität auf. In Abbildung 25 und Abbildung 26 sind zwei verschiedene Proben für System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) dargestellt. Für beide Präparationen sind, zumindest partiell, drei Domänenformen zu sehen, was zu Höhendifferenzen gegenüber der  $l_o$ -Phase von ca. 1,0 nm bis 1,4 nm führt. Allgemein war es so, dass die ausgebildeten SPBs für System II (DOPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) homogenere Oberflächenprofile ausbildeten.

In Abbildung 26 tritt die unterschiedliche laterale Ausdehnung der Domänenregionen deutlich zu Tage. Eine bedeutende Ursache dafür kann der variable Zeitraum sein, der zwischen Präparation und Untersuchung der Modellmembranen lag. Über einen größeren Zeitraum könnten sich Domänen durch Diffusionsprozesse der Phospholipide in der Ebene der Membran zusammengelagert haben. Auffällig in Abbildung 26 sind die deutlich größeren Bereiche der geordneten Phase (hellere Abschnitte – größere Schichtdicke), die für die Lipidsysteme II und III (Mitte & rechts), im Vergleich zu System I (links) auftreten. Auch die vergleichende Abbildung 25 für System I auf variierenden Oberflächen, zeigt diese Varianz in der lateralen Domänenausdehnung. Verstärkt kommt eine solche netzartige Ausdehnung bei Domänen der  $l_o$ -Phase vor, wohingegen die  $s_o$ -Phase bevorzugt rundlichere Strukturen ausbildet [168].

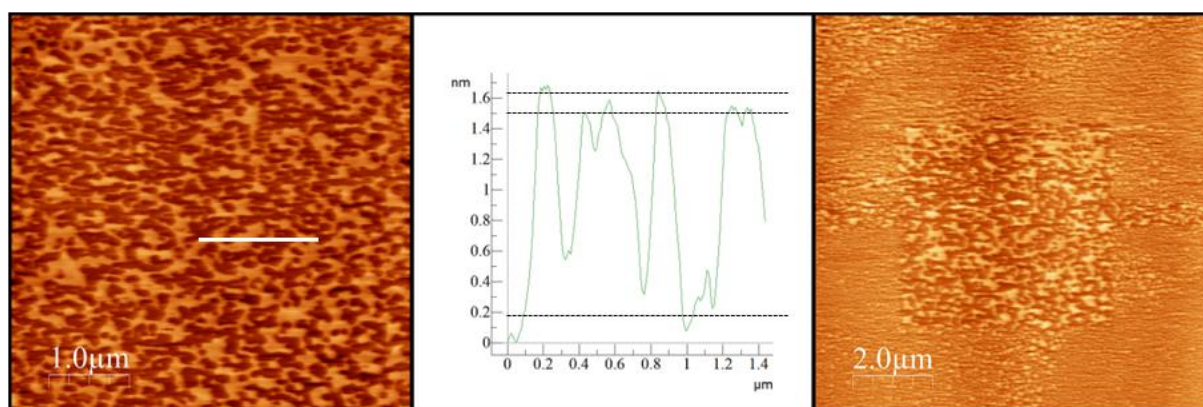


**Abbildung 26:** Vergleich der ternären Lipidsysteme I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3), II (DOPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3), ausgebildet auf Silizium (von links nach rechts). Phasenseparation ist für alle drei Systeme zu sehen. Die Höhenunterschiede zwischen der  $I_d$ -Phase (dunkle Membranbereiche) und der  $I_o$ -Phase (helle Bereiche) liegen für die unterschiedlichen Kompositionen zwischen 1 und 1,5 nm. Der relative Anteil der Domänen variierte auch hier relativ stark. Gründe dafür können ebenfalls die unterschiedlichen Substrate sowie die unterschiedlich langen Lagerungszeiten der untersuchten Proben sein. Für System I (links oben) traten auch hier drei Domänenformen auf.

### 3.1.2.3 Einfluss der AFM-Tastspitze auf das Phasenseparationsverhalten

Wie im vorhergehenden Abschnitt besprochen können verschiedene Faktoren Einfluss auf das Phasenseparationsverhalten von PhosphoLipidmembranen nehmen. So kann auch ein Einfluss der Tastspitze des AFM-Federbalkens auf die Strukturierung der Membran auftreten. Durch den Rasterprozess interagiert die Spitze mit der Oberfläche der Membran und wirkt so teilweise

beeinflussend auf die Phasenseparation. Dieses Phänomen konnte bei der Abbildung eines alternativen Mischverhältnisses der Lipid-Komponenten des Systems I beobachtet werden (ePC:eSM:Chol - 1:1:1). Die Position im Phasendiagramm für eine solche Zusammensetzung weist laut Literatur drei Phasen auf ( $l_d$ -,  $l_o$ -,  $s_o$ -Phase) [169,170]. Hier scheint es so zu sein, dass die Separation der Phasen innerhalb des Bilayers durch die Interaktion mit der Tastspitze induziert wurde. Durch die laterale Kraft, die auf die Probe wirkte, wurden die jeweiligen Lipide näher zu ihren Interaktionspartnern gleicher „Art“ gebracht, wodurch die Domänenausbildung beschleunigt wurde. Ein solcher Fall ist in Abbildung 27 dargestellt. Links im Bild ist die phasenseparierte Lipiddoppelschicht gezeigt. Der weiße Balken entspricht dem Höhenprofil im mittleren Bild. Die Höhendifferenz zwischen den beiden erkennbaren Phasen liegt bei 1,0 - 1,5 nm.



**Abbildung 27: Einfluss der Tastspitze auf die Domänenausbildung.** Links im Bild ist eine vergrößerte Ansicht des mittleren Quadranten des rechten Bildes gezeigt. Der weiße Balken entspricht dem Höhenprofil in der mittleren Darstellung. Der Einfluss des AFM-Tastspitze auf die Domänenausbildung ist hier eindrucksvoll zu sehen.

Das rechte Bild zeigt den in der linken Darstellung erfassten Bereich, vergrößert auf die doppelte Fläche („Zoom out“). Dabei fällt auf, dass der zuvor abgebildete und mehrfach gerasterte Abschnitt der Modellmembran (mittleres Quadrat im rechten Bild), gut erkennbar eine stärkere Phasenseparation aufweist, als die umgebenden Regionen. Dort sind zwar ebenfalls Höhenunterschiede im Oberflächenprofil der Membran zu sehen, jedoch sind diese Domänen deutlich kleiner als im mittleren Quadrat. Einflüsse der Tastspitze auf das abzubildende Objekt sind unter anderem beschrieben durch D’Acunto et al. [171].

Negative Konsequenzen für meine Untersuchungen waren auf Grund dieser Beobachtung nicht zu befürchten. Eine Vergrößerung der Domänenbereiche durch die Tastspitze sollten keine negativen Auswirkungen auf die angestrebten Ko-Lokalisationsexperimente mit den  $\alpha$ -Toxinen

haben. Die Domänengröße spielt in diesem Zusammenhang eher eine untergeordnete Rolle. Vielmehr waren die Domänenausbildung per se, und das damit einhergehende Auftreten der unterschiedlichen möglichen Bindestellen für das Toxin von Bedeutung. Dies konnte in allen Fällen erzielt werden. Außerdem handelte es sich bei dem hier dargestellten System nicht um das klassisch verwendete Lipid-Verhältnis (PC:SM:Chol - 0,35:0,35:0,3), sondern um eine alternative Präparation (PC:SM:Chol – 1:1:1). Die Position im Phasendiagramm für eine solche Zusammensetzung liegt wie erwähnt sehr nahe am Punkt für eine einheitliche  $L_o$ -Phase. Für die in dieser Arbeit klassischerweise eingesetzte Komposition war dies nicht nicht der Fall.

Weiterhin war es relativ unwahrscheinlich, dass durch die Interaktion mit der Tastspitze Domänen in Lipidsystemen induziert wurden, die eigentlich keine Phasenseparation ausgebildet hätten. Lediglich eine schnellere Ausbildung der Domänen wäre zu erwarten gewesen, was aber keinen Nachteil für meine Experimente darstellte.

#### ***3.1.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zwitterionischer, ternärer Lipidsysteme***

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit den hier besprochenen ternären Phospholipidsystemen, bestehend aus Sphingomyelin, Cholesterol sowie Phosphatidylcholin, wurden an GUVs und an ausgebildeten SPBs auf Glas als unterstützende Oberfläche gemacht. GUVs unterscheiden sich von SPBs hinsichtlich ihres Phasenseparations-Verhaltens insofern, dass ihre Membranen völlig frei in Lösung vorliegen und ihre Phospholipid-Bestandteile nur untereinander und mit den Lösungsmittelmolekülen interagieren. SPBs werden dagegen auf Oberflächen aufgebracht, wodurch zumindest die dem Substrat zugewandte Seite der Lipiddoppelschicht eine Beeinflussung durch die Oberfläche erfahren kann. Ob und wie stark sich diese Interaktion auf das Phasenverhalten auswirkt ist unklar.

Die Experimente sollten vergleichende Erkenntnisse zu den AFM-Aufnahmen liefern, und zur zusätzlichen Überprüfung der Domänenausbildung der ternären Kompositionen dienen. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde *DOPE-Lissamin-Rhodamin* verwendet. Der Farbstoff lagert sich bevorzugt in die  $I_d$ -Phase ein und wird von den anderen möglichen Phasen ( $s_o$ - bzw.  $I_o$ -Phase) größtenteils ausgeschlossen, so dass eine Unterscheidung der jeweiligen Membranabschnitte im Fluoreszenzmikroskop möglich wird.

GUVs wurden nach dem im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Prinzip der Elektroformation hergestellt. Alle ternären Systeme die PC, SM und Cholesterol als Komponenten enthielten wurden so untersucht (System I – III). Weiterhin wurde für System I eine SPB-Ausbildung auf gereinigten Glasoberflächen durchgeführt und ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

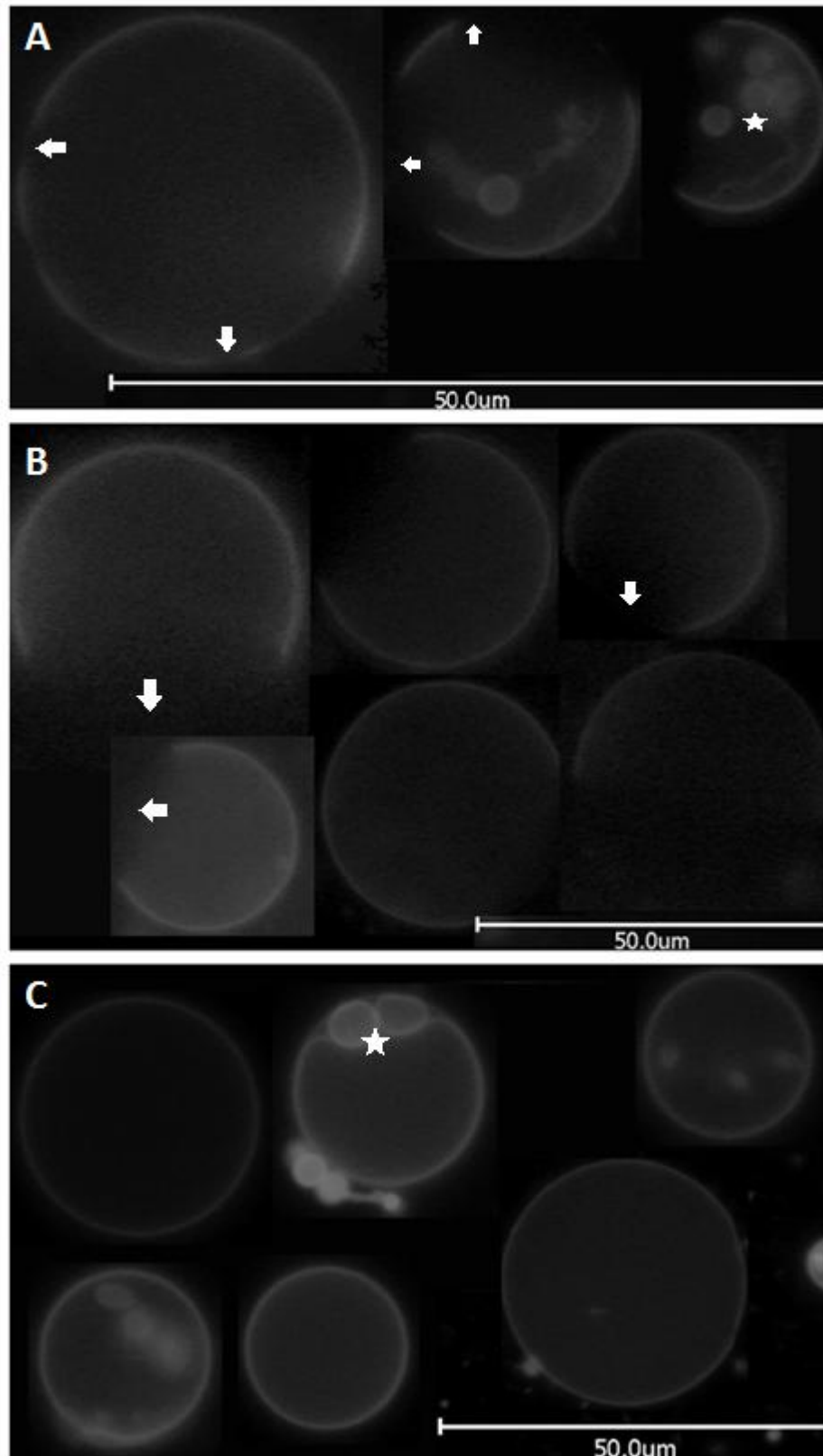
### ***3.1.2.5 Fluoreszenzmikroskopie an ternären Vesikeln***

Die Ergebnisse für die Versuche mit GUVs sind in einer Übersichtsdarstellung in Abbildung 28 zusammengefasst. System I (ePC:eSM:Chol - 0,35:0,35:0,3) & II (DOPC:PSM:Chol - 0,35:0,35:0,3) wiesen dabei Phasenseparation auf. System III (POPC:PSM:Chol - 0,35:0,35:0,3) dagegen zeigte ausschließlich Membranen, die homogen mit dem Fluoreszenzfarbstoff besetzt sind.

Eine Domänenbildung war nicht erkennbar. Dieses Phänomen fand bereits in der Literatur Erwähnung, da die in System III ausgebildeten Domänen aus PSM/Chol ( $l_o$ -Phase) nicht so groß werden (Größenordnung von Nanometern), um durch die relativ grobe Auflösung des Fluoreszenzmikroskops erfasst zu werden. Allerdings variieren die Aussagen je nach eingesetztem Phospholipid und Sättigungsgrad [172,173]. Im AFM konnten sie jedoch, auf Grund der besseren Auflösung, auch für dieses System detektiert werden.

Auffällig dabei war in diesem Zusammenhang, dass dieses Phänomen nur für das Lipid-Gemisch mit POPC als eingesetztes Phosphatidylcholin auftrat, nicht aber mit DOPC oder ePC.

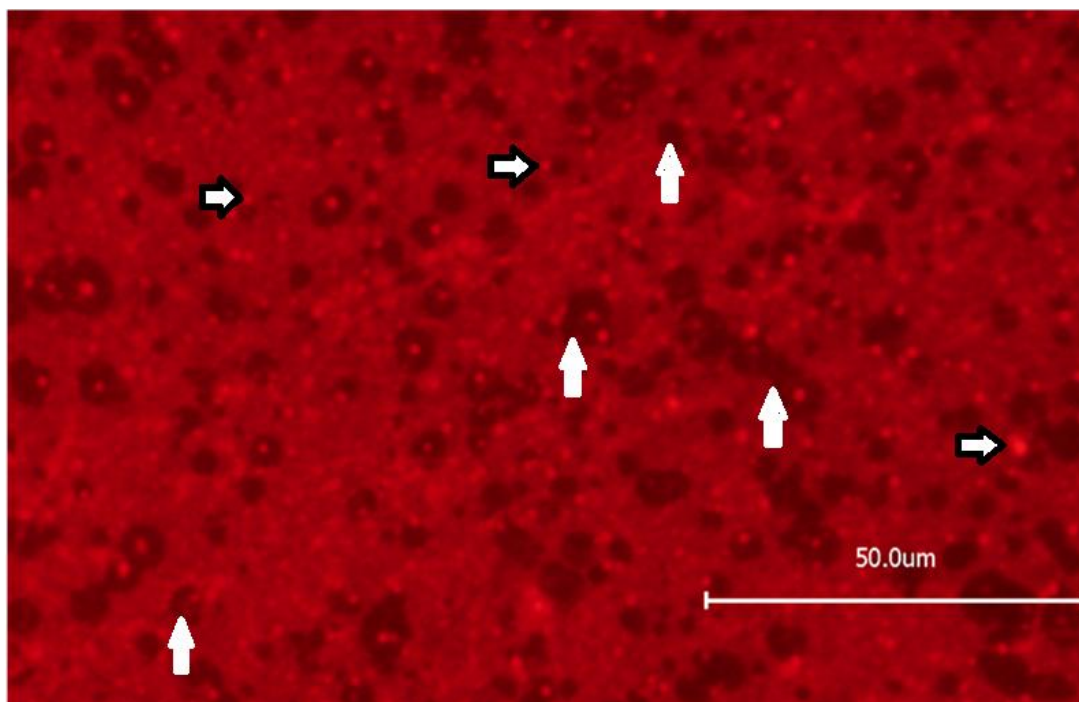
Alle hier dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (BZ 8000K) gemacht, welches im Vergleich zu normalerweise für solche Versuche eingesetzten konfokalen Fluoreszenzmikroskopen, eine relativ schlechte Auflösung aufweist.



**Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopie an GUVs.** Ein Vergleich der ternären Lipidsysteme I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3), II (DOPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.) ist von oben nach unten dargestellt. System I und II zeigen Phasentrennung, System III dagegen nicht. Weiße Pfeile markieren Membranbereiche ohne Fluoreszenzfarbstoff. Weiße Sterne markieren Einschlüsse in den GUVs.

### 3.1.2.6 Untersuchung zwitterionischer, ternärer Modellmembranen mit Fluoreszenzmikroskopie

Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten, oberflächenunterstützten Membranen wurden nur für System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) durchgeführt. Bei der Vorbehandlung des Substrats, wie auch beim Ausbildungsprozess der SPBs, wurde genauso vorgegangen wie bei den mit AFM untersuchten Modellmembranen. Abbildung 29 zeigt einen fluoreszenzmarkierten SPB für System I. Große Bereiche der ausgebildeten Modellmembran sind hellrot gefärbt. Dazwischen finden sich immer wieder Bereiche, die weniger Fluoreszenz zeigen (weiße Pfeile), oder solche die besonders stark und punktförmig fluoreszieren (Schwarz-weiße Pfeile). Phasenseparation und damit einhergehende Domänenbildung scheint auch hier zu erfolgen. Weiterhin war die Neigung der Domänen teilweise rundliche Strukturen einzunehmen auch in dieser Abbildung zu erkennen.



**Abbildung 29:** Phasenseparierter SPB aus ePC:eSM:Chol (0.35:0.35:0.3). Rote Bereiche sind Abschnitte der Membran die in der I<sub>d</sub>-Phase vorliegen. Dunkle Abschnitte liegen dagegen in der I<sub>o</sub>-Phase vor. Der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff war DOPE-liss-Rhod. Dieser lagert sich bevorzugt in die I<sub>d</sub>-Phase ein.

### 3.1.3 Ternäre Lipidsysteme aufgebaut aus Sphingomyelin und Cholesterol, sowie Phosphatidylserin bzw. DOTAP

Alternativ zu den oben beschriebenen ternären Lipidsystemen (I - III), die Phosphatidylcholine als Lipid-Komponente mit niedrigem Schmelzpunkt enthielten, wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Varianten untersucht. Diesbezüglich wurden jeweils nur ein bis zwei Messungen durchgeführt.

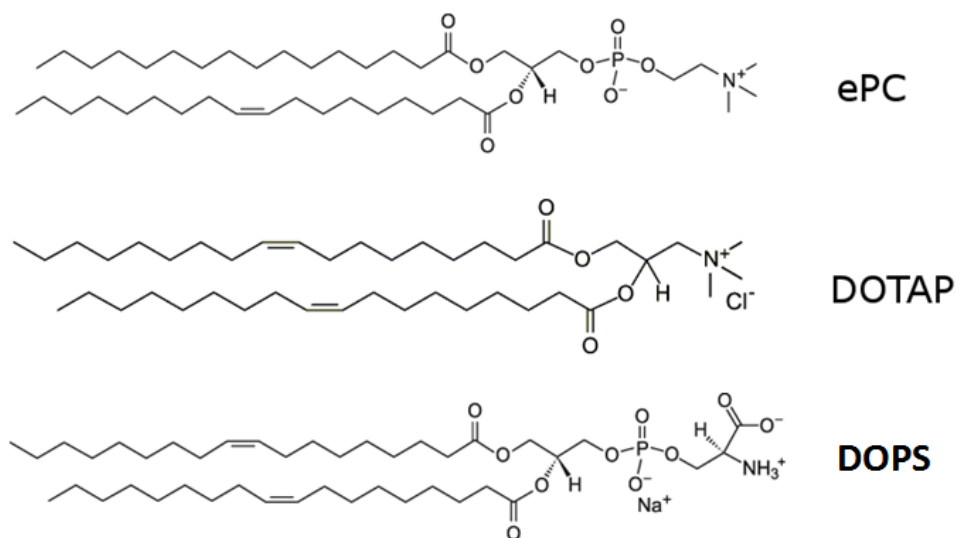
**Tabelle 5: Ternäre Lipidsysteme, die eine alternative Phospholipid-Komponente mit niedrigem Schmelzpunkt enthielten.** Hier werden DOPS und DOTAP als Alternative zu den in System I – III verwendeten PC-Molekülen eingesetzt. Die Verhältnisse der Lipid-Komponenten waren für System IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) und für System V (DOTAP:PSM:Chol - 1:1:1)

Ternäres System	Lipid 1 ( $T_M$ -low)	Lipid 2 ( $T_M$ -high)	Lipid 3 (Sterol)
IV	DOPS	PSM	Cholesterol
V	DOTAP	PSM	Cholesterol

Phosphatidylcholin wurde für diese Versuche durch Phosphatidylserin (PS) bzw. durch DOTAP ersetzt. Diese Lipide unterscheiden sich von PC wesentlich durch ihre Kopfgruppen und deren Eigenschaften. PC besitzt eine zwitterionische Phosphatidylcholin-Kopfgruppe, an die das *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin binden kann. DOTAP weist demgegenüber eine positive Kopfgruppenladung auf. Zwar ist der terminale Abschnitt ebenfalls aus drei Methylgruppen, koordiniert um ein zentrales Stickstoffatom, aufgebaut, allerdings fehlt gegenüber der Phosphocholin-Gruppe der Phosphatrest. Dieser kompensiert im Falle des PC durch seine negative Ladung die positive Teilladung des Cholins. PS wiederum trägt eine netto negativ geladene Serin-Kopfgruppe. In diesem Fall liegt eine negative Teilladung am Phosphatrest, sowie an der terminalen Carboxyl-Gruppe vor, wogegen nur eine positive Teilladung an der protonierten Aminogruppe zu finden ist. Die Strukturformeln der drei unterschiedlichen Lipide sind, zur besseren Vergleichbarkeit in Abbildung 30 zusammengestellt.

DOPS und DOTAP wurden als alternative Phospholipide zu PC eingesetzt und Co-Lokalisationsexperimenten mit  $\alpha$ -Toxin durchgeführt. Theoretisch sollte eine Bindung des Toxins bei diesen Mischungen (IV & V) nur an den mit Sphingomyelin angereicherten Domänen erfolgen

können, da  $\alpha$ -Toxin nicht an Phosphatidylserine bindet [39]. Eine Interaktion der Toxine mit DOTAP ist ebenfalls nicht bekannt und wurde auch in dieser Arbeit nicht untersucht. Auf Grund dessen müssten auftretende Strukturierungen der Membran durch das Toxin räumlich begrenzt sein. So sollten Hinweise erhalten werden, wie sich eine Toxin-Membran-Interaktion im AFM darstellt, wenn überhaupt nur ein bestimmter Bereich zur Bindung der Toxine zur Verfügung steht. Vergleichende Aussagen und Interpretationsansätze im Vergleich zur Toxin-Interaktion mit den anderen ternären Systemen (I – III), die in allen Membranbereichen potenzielle Toxin-Bindestellen aufweisen, sollten so möglich werden.



**Abbildung 30: Darstellung der drei hier besprochenen Phospholipid-Komponenten mit niedrigem Schmelzpunkt.**

Von oben nach unten: ePC, DOTAP und DOPS. (Quelle: Avanti Polar Lipids - <http://www.avantilipids.com/>)

Durch die negative Ladung der Serin-Kopfgruppe bzw. auf Grund der positiven Ladung an der Kopfgruppe des DOTAP, war mit einer Interaktion dieser Vesikel (System IV – V) an der Micaoberfläche zu rechnen, die sich vom Verhalten der anderen Vesikeltypen (System I – III) unterscheidet. Ein Einfluss der Ladungen auf das Adsorptionsverhalten war zu erwarten. Auf Grund der entgegengesetzten Ladungsverhältnisse der netto-negativ geladenen Micaoberfläche und der positiven DOTAP-Kopfgruppe, sollte eine verstärkte Interaktion der Vesikeloberfläche mit dem Substrat erfolgen. Im Fall von System IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) sollte dagegen, auf Grund der negativen Ladung der Serin-Kopfgruppen, eine abstoßende Wirkung zwischen den Vesikeln und der Micaoberfläche auftreten. Durch Zugabe bivalenter Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) zum verwendeten Puffer konnte diese Abstoßung aufgehoben bzw. umgekehrt werden. Dabei fungierten die Ionen als Linker, welche die sich abstoßenden negativen Ladungen der beiden

Interaktionspartner über ihre positiven Ladungen verbrückten. So sollte eine stärkere Interaktion zwischen Vesikel und Substrat erzeugt, und eine Ausbildung des SPBs gefördert werden.

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit dem Spreitungsverhalten dieser Phospholipidsysteme auf Silizium, sowie mit den entsprechenden AFM-Experimenten auf Mica.

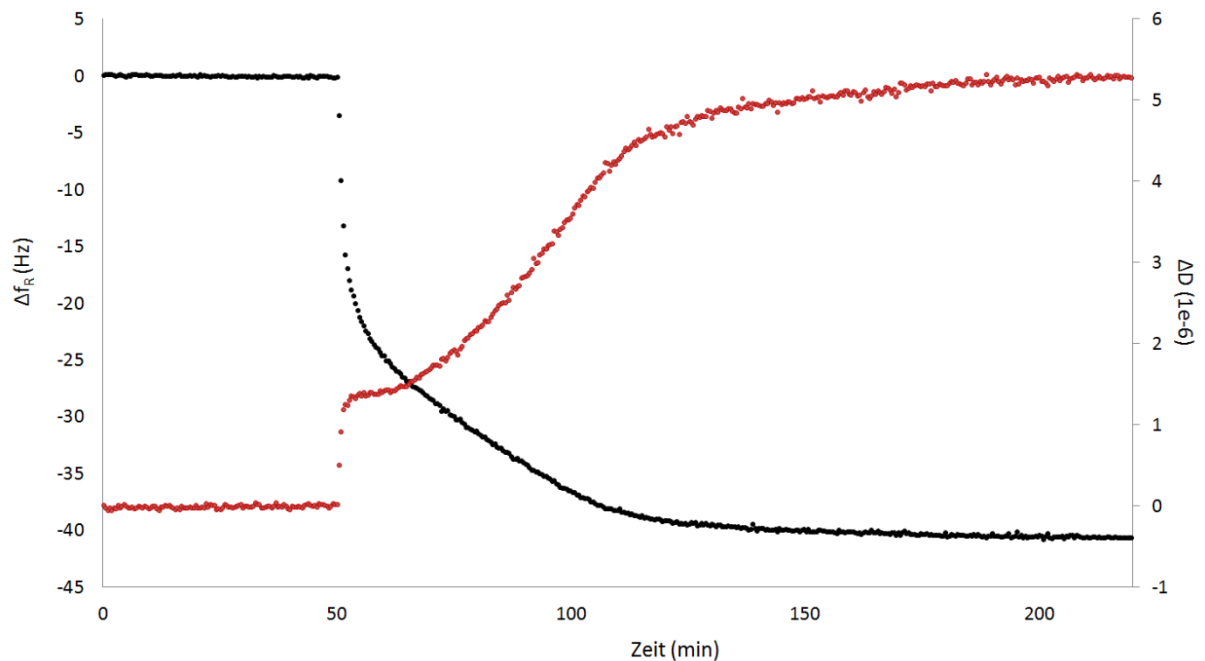
### ***3.1.3.1 Überprüfung des Spreitungsverhaltens geladener, ternärer Vesikel mit QCM-D***

Experimente zur Ausbildung oberflächenunterstützter Modellmembranen mit Vesikeln, die DOTAP als einzige Lipid-Komponente aufwiesen, wurden von Richter auf Silizium (Richter 2003) sowie auf Mica [174] durchgeführt. Im Gegensatz zum weiter oben beschriebenen Verhalten für ePC-Vesikel, wird dabei für DOTAP eine unmittelbare Ausbildung der Lipiddoppelschicht auf dem jeweiligen Substrat beschrieben, ohne dass zuvor eine kritische Belegung der Oberfläche mit Vesikeln stattgefunden haben muss [174]. Die unmittelbare Ruptur isolierter Vesikel ist dabei auf Mica ausgeprägter als auf Silizium [174]. In den beiden beschriebenen Fällen liegt die Änderung der Resonanzfrequenz ( $\Delta f$ ) bei ca. -20 Hz. Für das Dissipationssignal kommt es zu einer Änderung ( $\Delta D$ ) von  $0,5 - 0,8 \times 10^{-6}$ , je nach eingesetztem Oberflächentyp. Der Grund für diese direkte Aufspreitung der Vesikel ist die starke Interaktion der positiven Kopfgruppenladungen der DOTAP-Vesikel mit der elektronegativen Mica- bzw. Silizium-Oberfläche.

Verwendet man dagegen eine ternäre Mischung, mit DOTAP als Komponente mit niedrigem Schmelzpunkt, zusätzlich zu SM und Cholesterol, ist das Verhalten der SPB-Ausbildung ein anderes (siehe Abbildung 31). Ein solches Experiment ist meines Wissens in der Literatur nicht beschrieben. Für die in Abbildung 31 dargestellte QCM-D-Messung für dieses Lipidsystem V (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1) auf Silizium, zeigt sich eine Resonanzfrequenz-Änderung von -40 Hz und eine Änderungen im Dissipationssignal von  $5,2 \times 10^{-6}$ . Der typische, und in drei Abschnitte unterteilbare Kurvenverlauf, wie er für die weiter oben beschriebenen Lipidsysteme typisch war (Abbildung 19), trat hier nicht auf.

Die für dieses System gemessenen Werte entsprachen weder den Signaländerungen, die für eine ausgebildete Modellmembran beschrieben sind [156,160,162], noch solchen, die für die Ausbildung einer Schicht aus intakten Vesikeln an der Substratoberfläche sprechen [156]. Eine

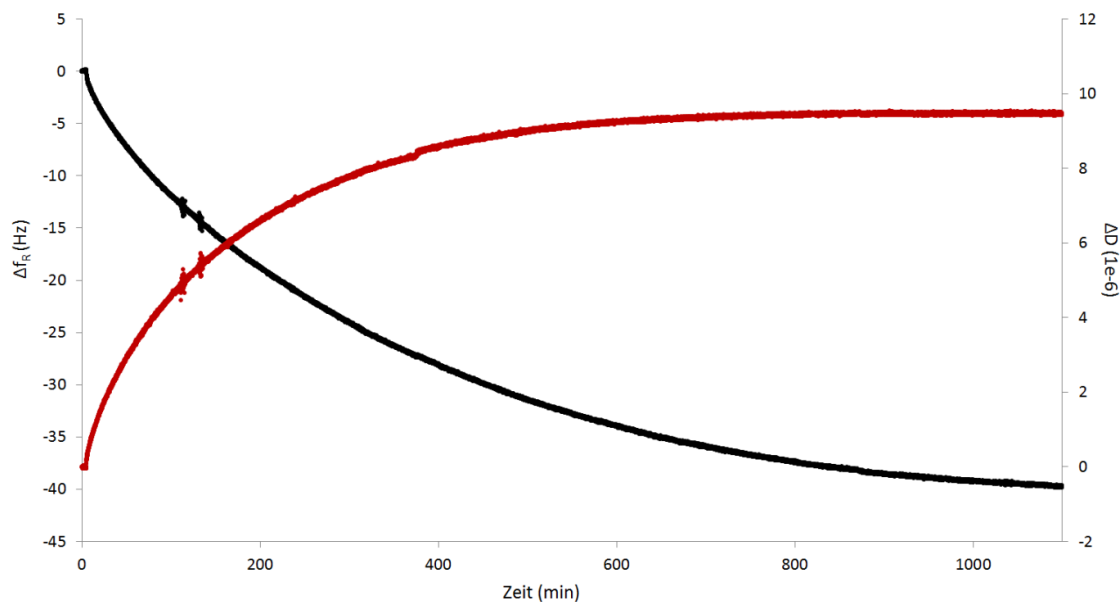
Oberflächenbelegung aus intakten Vesikeln würde Werte für  $\Delta f$  von bis zu -100 bzw. -150 Hz, sowie Werte zwischen  $5,5 - 7 \times 10^{-6}$  für das Dissipationssignal aufweisen. Dies ist zumindest für reine ePC-Vesikel auf Platin und Titan-Oberflächen als unterstützende Oberfläche so [156].



**Abbildung 31: Adsorption von DOTAP-enthaltenden ternären Vesikeln auf einer Siliziumoberfläche (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1).** Der Kurvenverlauf ist nicht typisch für eine SPB-Ausbildung. Die finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  entsprechen eher einer Mischform aus intakten, oberflächengebundenen Vesikeln und teilweise ausgebildeten oberflächennutzten Membranbereichen.

Der hier detektierte Wert von  $5,2 \times 10^{-6}$  für  $\Delta D$  kommt den in der Literatur beschriebenen Werten für einen Vesikellage auf Platin ( $7 \times 10^{-6}$ ) oder Titan ( $5,5 \times 10^{-6}$ ) relativ nahe. Allerdings liegt der in meinen Versuchen gemessene Wert für  $\Delta f$  bei weniger als 40 % gegenüber der aus der Literatur bekannten Frequenzabnahme für eine solche Vesikelschicht. Gegenüber den in Abbildung 19 und Abbildung 22 gezeigten Ergebnissen für eine SPB-Ausbildung auf Silizium, sind die hier erhaltenen Werte deutlich erhöht ( $\Delta D$ ) bzw. etwas erniedrigt ( $\Delta f$ ). Möglicherweise lag für das hier beschriebene System V (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1) eine Mischform aus intakten Vesikeln und ausgebildetem SPB vor.

Weiterhin wurden ternäre Vesikel mit DOPS als Phospholipid-Komponente mit niedrigem Schmelzpunkt, sowie PSM und Cholesterol als weitere Komponenten, auf ihr SPB-Ausbildungsverhalten hin untersucht (System IV).



**Abbildung 32: Adsorption von DOPS-enthaltenden ternären Vesikeln auf einer Siliziumoberfläche (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1).** Auch hier ist der Kurvenverlauf nicht typisch für eine SPB-Ausbildung. Die finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  lagen dabei in Bereichen, die eher einer Mischform aus intakten oberflächengebundenen Vesikel und teilweise ausgebildeten oberflächenunterstützten Membranbereichen entsprechen. Der Kurvenverlauf war ähnlich dem der ternären DOTAP-Vesikel, wenn auch der zeitliche Verlauf deutlich länger ausfiel.

In der Literatur sind keine Versuche beschrieben, die sich mit der Adsorption so zusammengesetzter Vesikel an Oberflächen befassen. Allerdings ist für Vesikel, hergestellt aus DOPC:DOPS (1:1), die Ausbildung von Lipiddoppelschichten auf Mica mit Hilfe bivalenter Ionen publiziert [174]. Dabei sind doppelt positiv geladene Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ ) zur Pufferlösung zugesetzt. Deren positive Ladungen vernetzen die negativen Kopfgruppen der Phosphatidylserine mit den negativen Mica- oder Silizium-Oberflächen, und verhindern eine Abstoßung der beiden Interaktionspartner. Die finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  liegen bei -25,5 Hz bzw.  $0,2 \times 10^{-6}$ . Diese Messgrößen wurden bei meinen Versuchen mit DOPS:PSM:Chol (2:1:1) nicht erzielt (System IV - Abbildung 32). Vielmehr zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie bei den Versuchen mit DOTAP-Vesikeln im ternären System V (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1), allerdings mit starken Variationen im zeitlichen Verlauf. Der Adsorptions-Vorgang der DOPS-Vesikel auf der Siliziumoberfläche nahm wesentlich mehr Zeit in Anspruch als für die DOTAP-Variante. Erst nach ca. 1100 Minuten ist ein Wert für  $\Delta f$  erreicht der bei -40 Hz liegt. Das Dissipations-signal wies zum

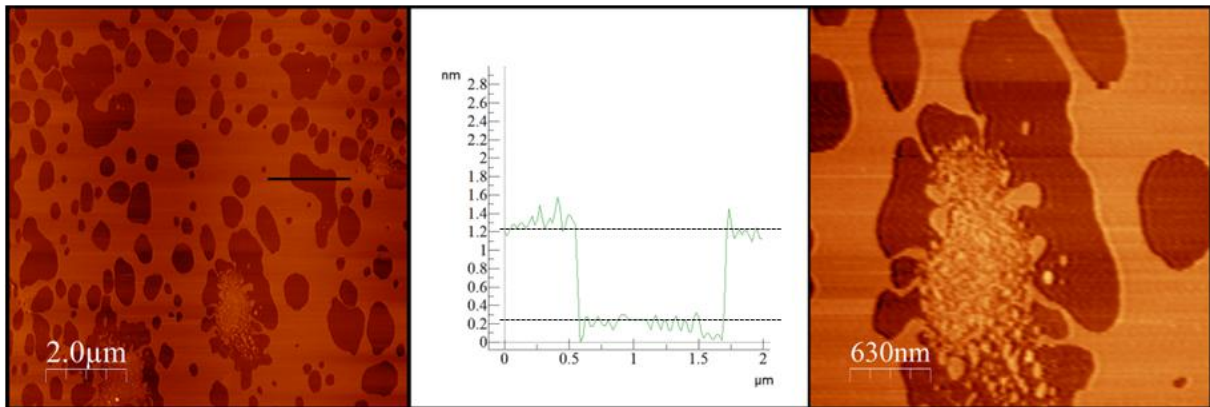
gleichen Zeitpunkt einen Wert für  $\Delta D$  von  $9,6 \times 10^{-6}$  auf (Abbildung 32). Dieser Wert variierte um ca.  $5 \times 10^{-6}$  gegenüber der Messung mit DOTAP.

Eine klare Aussage den Zustand der Vesikel an der Oberfläche betreffend, konnte ohne weiterführende Experimente nicht getroffen werden. Genau wie bei den Experimenten mit DOTAP-enthaltenden ternären Vesikeln war aber eine Mischform aus ausgebildetem SPB und intakten, oberflächengebundenen Vesikeln denkbar.

Um Aussagen über den tatsächlichen Zustand der für Lipidsystem IV und V hergestellten Vesikel an Oberflächen treffen können, wurden Versuche mittels AFM auf Micaoberflächen durchgeführt.

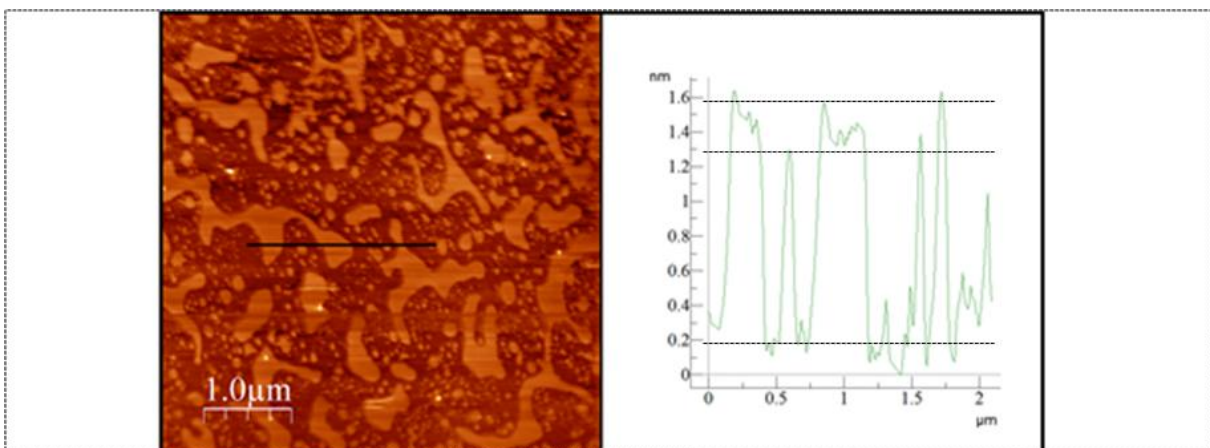
### ***3.1.3.2 Untersuchung geladener, ternärer Modellmembranen mit AFM***

Dieser Abschnitt beschreibt die AFM-Ergebnisse für oberflächenadsorbierte Vesikel mit geladenen Kopfgruppen. Für System V (DOTAP:PSM:Chol - 1:1:1) wurden diesbezüglich nur zwei Versuche auf Micaoberflächen durchgeführt. Es konnten Abbildungen gemacht werden die Merkmale einer phasenseparierten Membran aufwiesen (Abbildung 33). Intakte Vesikel waren nicht zu finden. Im linken Bild der Abbildung 33 ist eine Übersichtsdarstellung gezeigt. Der schwarze Balken entspricht dem Höhenprofil im mittleren Bild. Ganz rechts ist ein vergrößerter Teilausschnitt des linken Übersichtsbildes dargestellt. Die Strukturierung des Bilayers in der Bildmitte ist auffällig, aber nicht erklärbar. Dieses Phänomen wurde nur in diesem Fall beobachtet und trat weiterhin nicht auf. Die Höhenunterschiede zwischen den verschiedenen Regionen der Phospholipiddoppelschicht lagen im Bereich zwischen 1,2 – 1,4 nm. Intakte Vesikel waren nicht zu finden. Die auf Grund der QCM-D-Ergebnisse an diesem System vermutete Mischform aus oberflächenunterstützten Membran-Bereichen und intakten oberflächenadsorbierten Vesikeln bestätigte sich nicht.



**Abbildung 33:** Phasenseparierter SPB aus DOTAP:PSM:Chol (1:1:1) auf Mica. Phasenseparation im SPB ist zu sehen. Die unterschiedlichen Domänen unterscheiden sich im Höhenprofil um ca. 1,2 nm. Dabei entsprechen die dunkleren Membran-Bereiche sehr wahrscheinlich der  $I_d$ -Phase und die helleren der  $I_o$ -Phase.

System IV enthielt DOPS als Lipid-Komponente mit niedrigem Schmelzpunkt, sowie PSM und Cholesterol als weitere Bestandteile (DOPS:PSM:Chol – 2:1:1). Die AFM-Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt. Abschnitte einer oberflächenunterstützten Membran, welche Domänen mit Höhendifferenzen von 1,1 - 1,4 nm aufweist, sind erkennbar. Links ist eine Übersichtsdarstellung abgebildet. Der schwarze Balken entspricht dem rechts dargestellten Höhenprofil.



**Abbildung 34:** Phasenseparierter SPB aus DOPS:PSM:Chol (1:1:1). Phasenseparation im SPB ist zu sehen. Die unterschiedlichen Domänen unterscheiden sich im Höhenprofil um ca. 1,1 – 1,4 nm. Die dunkleren Membran-Bereiche entsprechen sehr wahrscheinlich auch für dieses System der  $I_d$ -Phase. Die helleren Abschnitte sind der  $I_o$ -Phase zuzuordnen.

Beide in diesem Abschnitt besprochenen Systeme (IV & V) waren in der Lage oberflächenunterstützte Membranen auf Mica auszubilden. Außerdem konnten in beiden Fällen heterogene Höhenprofile abgebildet werden, was klar für eine Phasenseparation der beteiligten

Lipid-Komponenten spricht. Sowohl für System IV (DOPS:PSM:Chol - 1:1:1), als auch für System V (DOTAP:PSM:Chol - 1:1:1) lag der Höhenunterschied zwischen den Membran-Bereichen (Domänen) bei 1,1 - 1,4 nm. Verglichen mit den im vorhergehenden Abschnitt besprochenen Lipidsystemen I - III, wiesen die Systeme IV und V sehr ähnliche Werte auf. Eine Eignung für die oben beschriebenen Ko-Lokalisations-Experimente mit  $\alpha$ -Toxinen war somit gegeben.

### 3.1.4 Höhenunterschiede zwischen Domänen der ternären Phospholipidsysteme

Tabelle 6: Übersichtstabelle über die wichtigsten Parameter der in dieser Arbeit verwendeten ternären Lipidsysteme.

<b>Ternäres Lipidsystem</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
<b>eingesetzte Lipidkomposition</b>	ePC:eSM:Chol 0.35:0.35:0.3	DOPC:PSM:Chol 0.35:0.35:0.3	POPC:PSM:Chol 0.35:0.35:0.3	DOPS:eSM:Chol (1:1:1)	DOTAP:PSM:Chol (1:1:1)
<b>Hauptkomponente der I<sub>d</sub>-Phase (Phase 1)</b>	ePC	DOPC	POPC	DOPS	DOTAP
<b>Hauptkomponente der I<sub>o</sub>-Phase (Phase 2)</b>	eSM/Chol	PSM/Chol	PSM/Chol	PSM/Chol	PSM/Chol
<b>Hauptkomponente der s<sub>o</sub>-Phase (Phase 3)</b>	evtl. SM	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
<b>Höhendifferenz I<sub>d</sub>- I<sub>o</sub>-Phase auf Mica</b>	0,8 – 1,0nm	---	---	1,1 – 1,4nm	1 – 1,3nm
<b>Höhendifferenz I<sub>d</sub>- I<sub>o</sub>-Phase auf Silizium</b>	1,2 – 1,4nm	1 – 1,2nm	1 - 1,4nm	---	---
<b>Höhendifferenz I<sub>d</sub>- I<sub>o</sub>-Phase auf APTES</b>	1,2 – 1,4nm	---	---	---	---

### 3.1.5 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit Modellmembranen

Dieser Abschnitt präsentiert die AFM-Experimente zur Interaktion der  $\alpha$ -Toxin Monomere mit oberflächenunterstützten Modellmembranen. Die Resultate zum Verhalten der Toxine an reinen ePC-Membranen, sowie die Resultate zur Ko-Lokalisation mit bestimmten Raft-artigen Bereichen phasenseparierter ternärer Modellmembranen sind dargestellt. In diesem Kontext sollte überprüft werden, ob das  $\alpha$ -Toxin präferiert an Membran-Domänen aus Sphingomyelin und Cholesterol bindet, die für die ternären Systeme I – III im vorherigen Abschnitt dargestellt werden konnten.

Zuerst wurden Modellmembranen aus ePC auf Micaoberflächen ausgebildet und mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie dargestellt. Wie weiter oben beschrieben, tragen diese Moleküle eine Phosphocholin-Kopfgruppe, welche als Bindestelle für  $\alpha$ -Toxine-Monomere bekannt ist [39]. Die Membranen wurden mit  $\alpha$ -Toxin-Monomeren überschichtet und anschließend mit AFM abgebildet. Eine Darstellung von Toxin-Poren bzw. deren Vorstufen, sollte so realisiert werden.

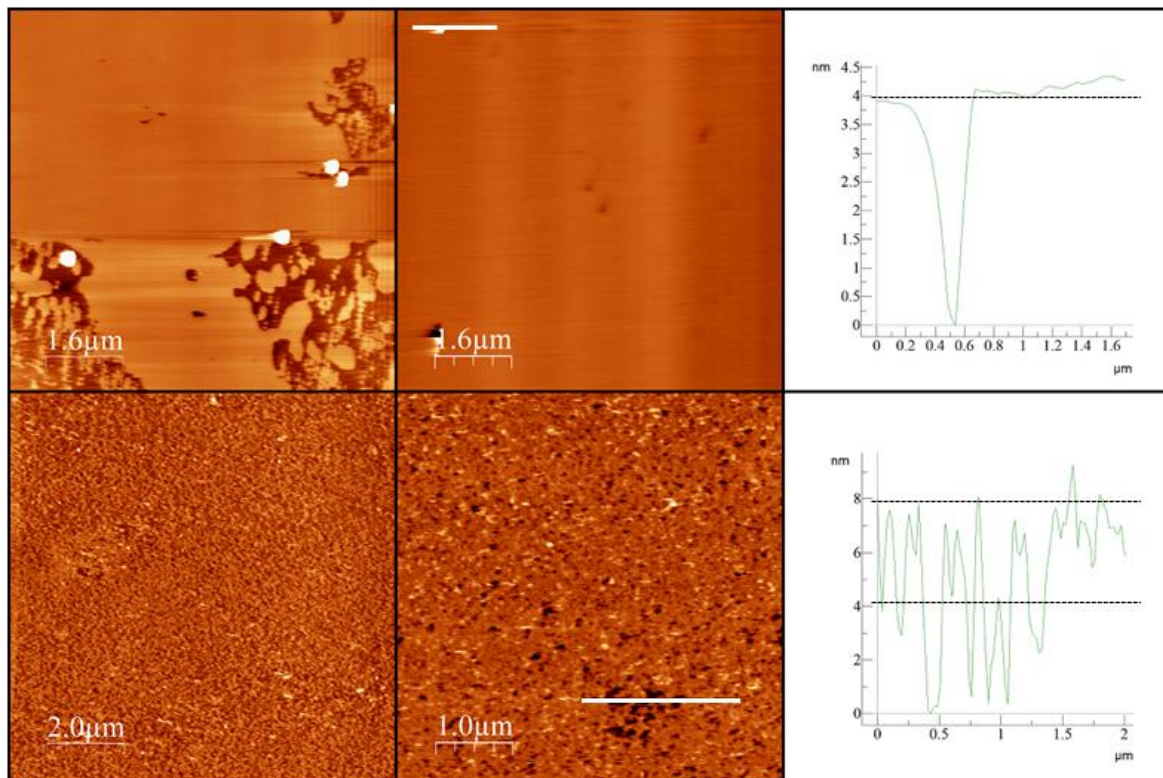
In der Literatur sind diesbezüglich bereits Experimente beschrieben. Diese wurden an SPBs durchgeführt, die aus ePC, sowie einem aus Rinderherz extrahierten Lipid-Gemisch, zusammengesetzt waren. Zweidimensional angeordnete Kristalle von  $\alpha$ -Toxin-Poren konnten für diese Modellmembranen gezeigt werden [159].

Meine Ergebnisse diesbezüglich sind im Folgenden zusammengestellt. Die Experimente dienten als Vorversuche hinsichtlich der Durchführbarkeit der geplanten Ko-Lokalisations-Experimente, sowie zur Gewinnung der nötigen experimentellen Erfahrung.

Weiterhin wurden phasenseparierte ternäre Modellmembranen (System I – III) ausgebildet und anschließend Toxin-Monomere in Konzentrationen von wenigen Nanomolar (20 nM bis 150 nM) zugegeben. In diesem Konzentrationsbereich sollte eine bevorzugte Interaktion mit den mutmaßlichen hochaffinen Bindestellen erfolgen [2]. So hergestellte Proben wurden mit AFM abgebildet und für manche Versuchsansätze zusätzlich, durch SDS-Behandlung mit anschließender Gelelektrophorese, auf die Ausbildung von Poren in der oberflächenunterstützten Membran hin untersucht.

### 3.1.5.1 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit oberflächenunterstützten Modellmembranen aus ePC

Oberflächenunterstützte Modellmembranen, aufgebaut aus ePC-Molekülen wurden auf Mica und Siliziumoberflächen ausgebildet, mit monomeren Toxinen überschichtet und die Toxin-Membran-Interaktion im AFM untersucht. Typische Ergebnisse für einen solchen Versuchsaufbau auf einer Silizium-Oberfläche sind in Abbildung 35 dargestellt. In der oberen Bildfolge sind zwei verschiedene Versuche zu sehen. Im linken oberen Bild weist die Membran deutliche Stufenkanten zum Substrat auf. Die Schichtdicke der Doppelschicht betrug dabei ca. 4 nm.



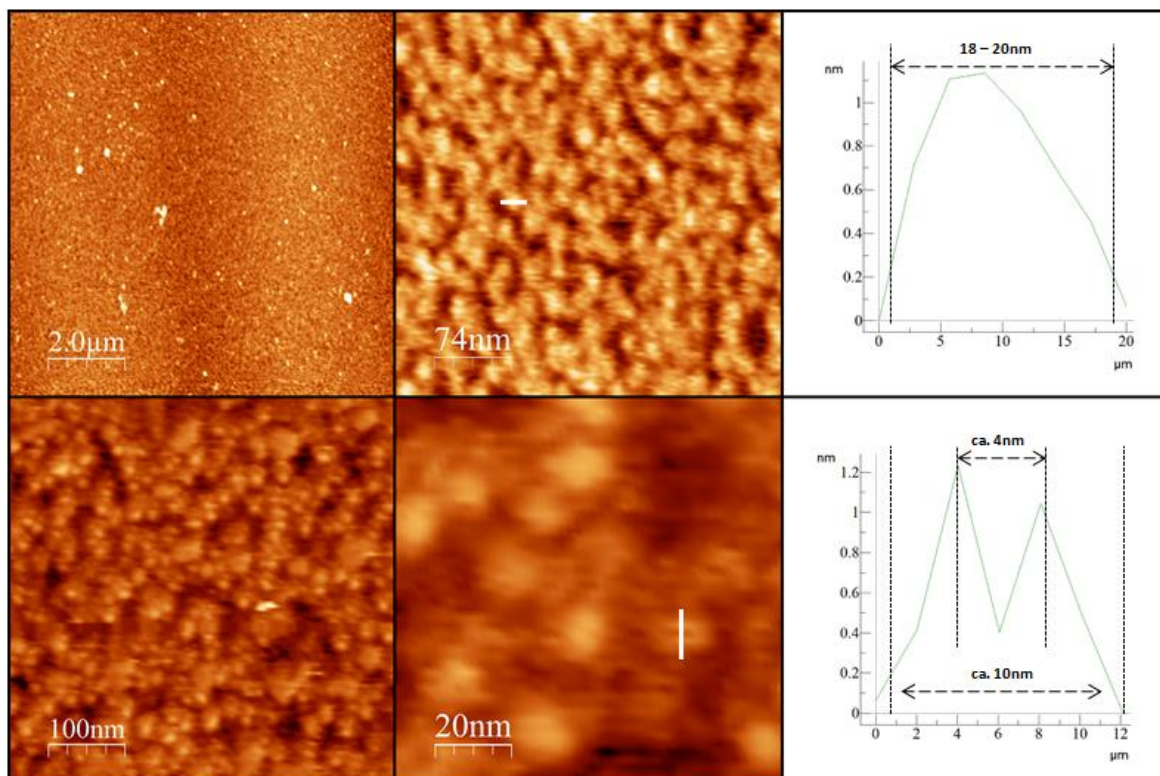
**Abbildung 35: Interaktion des  $\alpha$ -Toxins mit reinen ePC-Membranen. Obere Bildreihe:** monomere Modellmembran aufgebaut aus ePC-Molekülen auf Silizium. Das Höhenprofil ganz rechts entspricht dem weißen Balken in der Bildmitte. Die für eine solche Modellmembran typische Schichtdicke von 4 nm konnte dargestellt werden. **Untere Bildreihe:** Toxin-Interaktion mit einer solchen Lipiddoppelschicht. Toxin-Konzentration [1,2 μM]. Eine Strukturierung des SPB durch die  $\alpha$ -Toxine ist zu sehen. Das Höhenprofil rechts entspricht dem weißen Balken in der Bildmitte. Erhebungen die ca. 4 nm aus der SPB-Oberfläche herausragen wurden detektiert. Publierte Werte von Song et al. [31], die 4-5 nm für die aus der Membran herausstehende Kragendomäne der Pore angeben, entsprechen meinen Resultaten relativ gut.

Im mittleren Bild ist eine fast geschlossen ausgebildete Membran dargestellt, die nur wenige kleine Defekte aufwies. Der weiße Balken entspricht dabei dem Höhenprofil ganz rechts (Abbildung 35). In der unteren Bildreihe ist eine auf diese Weise aufgebaute Modellmembran nach Interaktion mit  $\alpha$ -Toxin-Monomeren gezeigt. Die hierfür eingesetzte relativ hohe Proteinkonzentration von  $1,2 \mu\text{M}$  lag im Bereich der für die Interaktion mit der unspezifischen, niederaffinen Bindestelle notwendigen Konzentration. Eine klare Strukturierung der Oberfläche der Modellmembran durch das Toxin ist erkennbar. Außerdem sind kleinere Defekte zu sehen die in der Abbildung dunkel erscheinen. Das linke untere Bild liefert eine Übersichtsdarstellung. Im mittleren Ausschnitt sieht man eine vergrößerte Darstellung des stark strukturierten SPB. Der eingezeichnete weiße Balken entspricht wiederum dem Höhenprofil im rechten Bild. Eine maximale vertikale Ausdehnung von  $8,5 \text{ nm}$  ist zu sehen. An manchen Punkten des Profils sind Höhenausmaße erkennbar, die  $3,5$  bis  $4 \text{ nm}$  über der Substratoberfläche liegen. Diese Werte entsprachen der Schichtdicke einer einfachen Membran, wodurch auf eine regulär ausgebildete Phospholipiddoppelschicht geschlossen werden konnte.

Integrierte Toxin-Poren überragen mit ihrer Kragendomäne die Membran-Oberfläche um weitere  $4$  bis  $5 \text{ nm}$  [31]. Die strukturierten Bereiche mit einer vertikalen Ausdehnung größer als  $4 \text{ nm}$  über der Membran-, und ca.  $8 \text{ nm}$  über der Substratoberfläche, waren mit diesen Werten gut vereinbar. Für die Struktur der Präpore ist nicht bekannt wie weit sie die Membran überragt. Anbindung, und zumindest teilweise Integration des Proteins in die Modellmembran, scheinen also stattgefunden zu haben. Dafür sprechen das klar veränderte Höhenprofil und dessen vertikale Spitzenwerte, sowie die deutlich strukturiertere Probenoberfläche, im Vergleich zu Toxin-unbehandelten Oberflächen der entsprechenden Modellmembranen.

Darüber hinaus zeigten weitere Aufnahmen an auf diese Weise präparierten Proben auf Mica ebenfalls deutlich heterogene Oberflächencharakteristika. Dabei ist die rundliche Struktur der angelagerten Proteinkomplexe klar erkennbar (Abbildung 36). Die Darstellung im linken oberen Bildausschnitt zeigt eine relativ gleichmäßige Strukturierung der oberflächenunterstützten Membran nach Behandlung mit Toxin-Monomeren. Sie ist vergleichbar mit dem linken unteren Bildausschnitt in Abbildung 35. In beiden Fällen wurde  $1,2 \mu\text{M}$  Protein eingesetzt. Kleinere, in den Abbildungen weiß erscheinende Bereiche sind zu sehen. Hierbei handelt es sich möglicherweise um aggregierte Proteine [159]. Alle anderen Teildarstellungen in Abbildung 36 zeigen an verschiedenen Positionen zweier verschiedener Präparationen vergrößerte Oberflächenbereiche. Rundliche Strukturen sind in beiden Fällen deutlich zu erkennen. Höhenprofile dieser Bereiche sind in der oberen und unteren Bildmitte eingezeichnet (weiße

Balken) und jeweils rechts davon aufgetragen. Während das Profil der oberen Bildreihe eine laterale Ausdehnung von ca. 20 nm aufweist, liegt die Ausdehnung für den unteren Ausschnitt nur bei etwas mehr als 10 nm. Dieser Wert ist mit dem einfachen Porendurchmesser vereinbar [159,31]. Des Weiteren trat ein Einschnitt im Höhenprofil für die untere Darstellung auf, der ziemlich genau in der Mitte der untersuchten Struktur lag. Dabei konnte es sich um den von der vollständig oligomerisierten Pore, und möglicherweise auch von deren Poren-Vorstufe, ausgebildeten Transmembran-Kanal handeln. Dieser ist beschrieben [31] und konnte mittels Rasterkraftmikroskopie auch dargestellt werden [175,159].



**Abbildung 36: Modellmembran aus ePC-Molekülen auf Mica nach Interaktion mit 1,2 µM Toxin.** Zwei verschiedene Proben sind dargestellt. Die weißen Balken in den mittleren Darstellungen entsprechen den Höhenprofilen rechts. Für die obere Bildreihe beträgt die Breite der abgebildeten runden Struktur ca. 20 nm. Für die untere Bildreihe ist dagegen eine Ausdehnung von lediglich 10 nm zu sehen, die zusätzlich einen Einschnitt in ihrer Mitte aufweist der ca. 4 nm breit ist. Die Resultate für die untere Bildreihe entsprechen den Ausmaßen einer Toxin-Pore. Die Resultate der oberen Bildreihe könnten durch die angewandte Scanrichtung im AFM verbreitert erscheinen oder möglicherweise eine Präporen-Struktur darstellen.

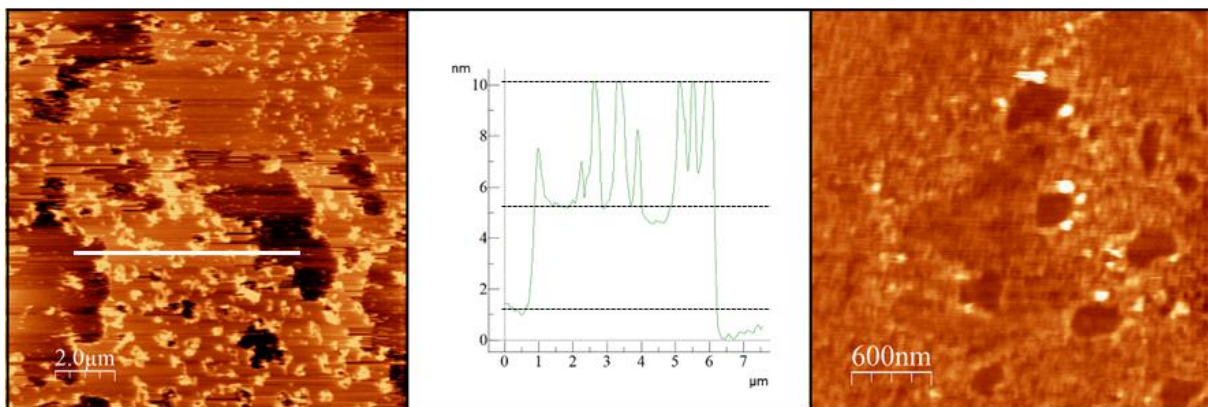
Auf Grund der unzureichenden Auflösung der Abbildungen sind genauere Aussagen hinsichtlich der lateralen Ausdehnung der Proteinkomplexe an der Membran-Oberfläche nicht machbar. Die hier gezeigten Abbildungen lassen aber auf eine, zumindest teilweise, erfolgte Porenbildung schließen. Im oberen Höhenprofil der Abbildung 36 ist eine Pore mit einer lateralen Ausdehnung

von ca. 20 nm zu sehen. Dies kann mit der schlechten lateralen Auflösung bei dieser Messung zusammenhängen oder aber auf eine Verbreiterung der Oberflächenstrukturen durch den verwendeten Tastspitze oder die Scan-Richtung zurückzuführen sein [176,177]. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass es sich bei diesen Strukturen um Porenvorstufen oder Präporen handelte, die sich im Prozess der Membran-Integration befanden und deshalb verbreitert erschienen. Moleküldynamische Simulationen, die in unserem Institut im Rahmen eines Fortgeschrittenen-Praktikums durchgeführt wurden, zeigten Hinweise auf einen Zwischenzustand im Verlauf des Integrationsprozesses, bei dem die Präpore einen Durchmesser von 15-20 nm ausbildete.

### 3.1.5.2 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit oberflächenunterstützten und phasenseparierten ternären Modellmembranen

#### 3.1.5.2.1 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit ternären oberflächenunterstützten Modellmembranen aus ePC, eSM und Cholesterol

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der  $\alpha$ -Toxin-Interaktion mit oberflächenunterstützten und phasenseparierenden Modellmembranen, aufgebaut aus drei Phospholipid-Komponenten, besprochen. Das Hauptaugenmerk lag dabei, auf Grund der sehr guten Reproduzierbarkeit und der zuverlässigen Präparation, auf Lipidsystem I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3). Dieses wurde zuvor gut untersucht und die verschiedenen Domänenbereiche konnten anhand bereits publizierter Ergebnisse [17,165,141,166,167,163,164] zugeordnet werden. Dabei entsprechen Membranbereiche größerer Schichtdicke der  $I_o$ -Phase, bevorzugt zusammengesetzt aus eSM und Cholesterol, und die dünneren Abschnitte der Membran der  $I_d$ -Phase, hauptsächlich aufgebaut aus ePC. Sowohl die Sphingomyeline als auch die Phosphatidylcholine tragen dabei, wie beschrieben, eine Phosphocholin-Kopfgruppe, die als Toxin-Bindestelle fungiert.



**Abbildung 37: Toxin-Interaktion mit ternärer oberflächenunterstützter Modell-Membran, aufgebaut aus ePC:eSM:Cholesterol (0.35:0.35:0.3) auf Silizium.** Die eingesetzte Proteinkonzentration lag bei [150 nM]. Im linken Bild ist eine Toxin-Anlagerung an den SPB innerhalb räumlich begrenzter Bereiche zu sehen. Teilweise scheint die Membran zerfetzt zu sein. Das Höhenprofil in der Mitte entspricht dem weißen Balken im linken Bild. Eine ca. 4 nm dicke Membran ist zu sehen, aus der Toxin-Strukturen um ca. 4-5 nm herausragen. Das rechte Bild zeigt einen solchen Membranabschnitt in der Vergrößerung. Auch hier sind strukturierte Membranbereiche und solche ohne Strukturierung zu sehen.

Dadurch wird ein direkter Vergleich zwischen strukturell unterschiedlich aufgebauten (gepackten) und Phosphocholin-tragenden Abschnitten der Modellmembran hinsichtlich ihrer Interaktion mit Toxin-Monomeren ermöglicht.

Die oberflächenunterstützte Modellmembranen wurden auf Mica und Silizium-Oberflächen ausgebildet und auf die Toxin-Interaktion mit der ausgebildeten Membran hin im AFM untersucht (Abbildung 37). Im linken Bildabschnitt ist eine Übersichtsdarstellung gezeigt. Der schwarze Balken entspricht dem im mittleren Bildausschnitt dargestellten Höhenprofil. Ausgebildete Membranbereiche mit einer Höhendifferenz von ca. 3,5 – 4 nm zum Substrat hin sind deutlich erkennbar. Strukturierungen innerhalb der Membranen zeigten eine vertikale Ausdehnung von ca. 4 nm. Auch in diesem Fall kann es sich um ausgebildete Toxin-Poren, evtl. auch um Präporen handeln, die mit ihrer „Cap“-Region 4-5 nm aus der Membran herausragten. Hier detektierte Erhebungen über die Oberfläche der Membran stimmen also in etwa mit diesen bereits publizierten Werten überein [31]. Die eingesetzte Toxin-Konzentration betrug 150 nM. Erkennbar strukturierte Abschnitte sind räumlich begrenzt und eine gleichmäßige Strukturierung der Modellmembran durch die Proteine, wie sie in

Abbildung 35 & Abbildung 36 für eine, nur aus einer Lipid-Komponente bestehende Modellmembran dargestellt ist, tritt nicht auf. Dies spricht für die bevorzugte Interaktion der  $\alpha$ -Toxin-Monomere mit bestimmten, räumlich begrenzten Bereichen der Doppelschicht. Zu beachten ist dabei außerdem, dass für die hier gezeigten Versuche eine, im Vergleich zu den in Abbildung 35 & Abbildung 36 dargestellten Versuchen, eine fast zehnfach kleinere Toxin-Konzentration eingesetzt wurde.

Der rechte Bildausschnitt in Abbildung 37 zeigt einen Teil der Membran, an dem Toxine gebunden sind. Hier sind ebenfalls rundliche Strukturierungen der Membran-Oberfläche erkennbar, die, im Gegensatz zu den umliegenden Abschnitten, keine Interaktion mit den Toxinen aufweisen. Bei den unstrukturierten Bereichen handelte es sich wahrscheinlich um die in der I<sub>d</sub>-Phase vorliegenden Domänen, bevorzugt aufgebaut aus ePC-Molekülen. Außerdem finden sich Abschnitte, die im Bild als weiße Punkte erscheinen. Dabei kann es sich um Aggregate des Toxins handeln, die sich an den Domänenrändern anhäuferten (Abbildung 37 – rechtes Bild). Eine höher aufgelöste Darstellung dieser Membranabschnitte konnte, auf Grund der Instabilität des Systems im unteren Nanometerbereich, nicht realisiert werden. Für die im linken Bild der Abbildung 37 dargestellten Membranbereiche sah es so aus, als wären Teile davon herausgelöst worden oder als sei die Membran zerfetzt. Diese Interpretation ist durchaus plausibel, da die

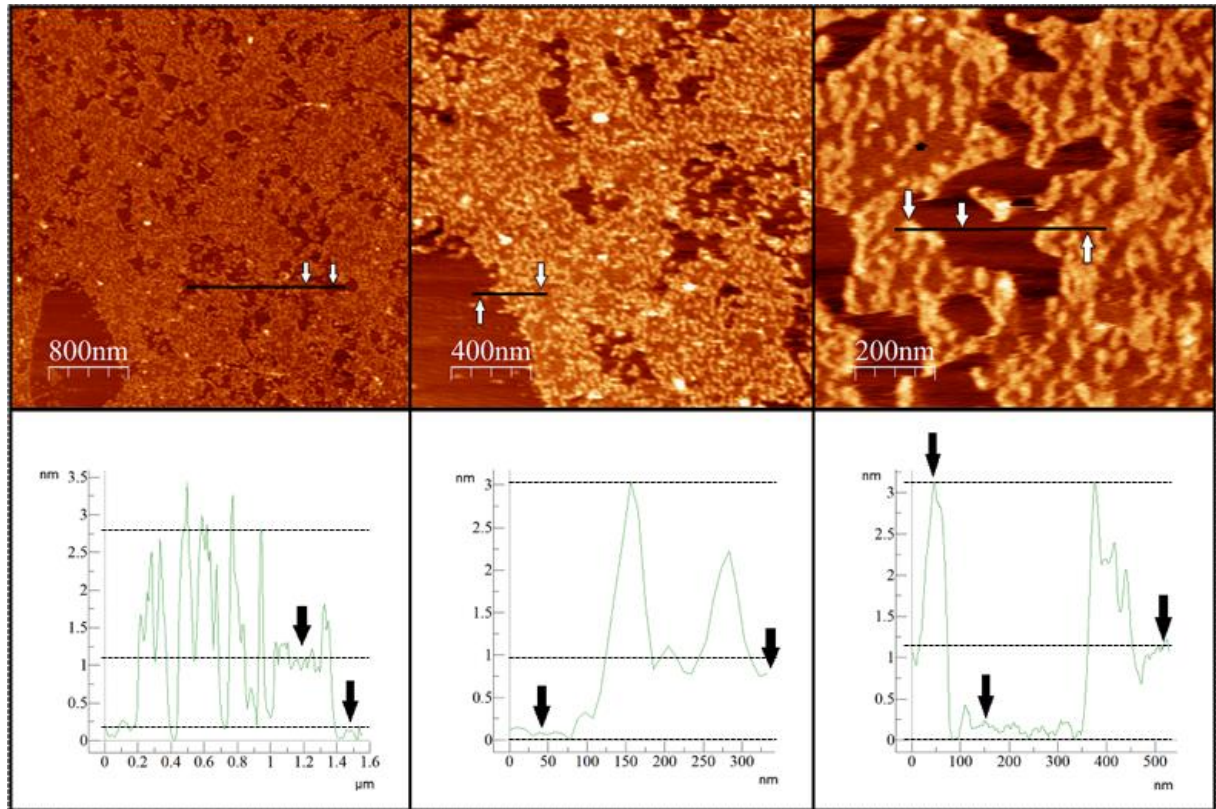
Toxine durch ihre Porenausbildung den SPB destabilisieren können, so dass z.B. beim Spülen der Probe auftretende Scherkräfte diese instabilen Bereiche herauslösen konnten.

Für den beschriebenen Versuchsaufbau mit dem gleichen ternären Lipidsystem I (ePC:eSM:Cholesterol - 0.35:0.35:0.3) und 150 nM Toxin, wurden außerdem Experimente auf Mica als unterstützendes Oberflächenmaterial durchgeführt. Auf Grund der schnelleren und stabileren Präparation auf diesem Oberflächentyp, wurde hierauf das Hauptaugenmerk gelegt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt. Schwarze Balken in den Abbildungen der oberen Bildreihe entsprechen den darunter dargestellten Höhenprofilen. Wie bei den zuvor besprochenen Ergebnissen auf Silizium, waren auch auf Mica als unterstützende Oberfläche lokal begrenzte Strukturierungen der Membranoberfläche zu sehen. Große unstrukturierte Bereiche traten auf (Abbildung 38 links oben), deren Membranoberfläche im Höhenprofil ca. 1 nm unter der Oberfläche der strukturierten Abschnitte lagen (Abbildung 38 - Pfeile im linken mittleren Bild, sowie dem entsprechenden Höhenprofil). Die Werte entsprachen den weiter oben dargestellten Höhenunterschieden der unterschiedlichen Domänen für das hier verwendete ternäre Lipidsystem. In beiden Fällen betrug die Differenz ca. 1 nm. Es liegt daher nahe, dass die Strukturierung an Abschnitten der Membran erfolgte, die der I<sub>o</sub>-Phase zuzuordnen waren. Dies würde für eine bevorzugte Interaktion der Toxin-Moleküle mit in Clustern vorliegenden Phosphocholin-Kopfgruppen sprechen. Rundliche Strukturen, sowie deren „kettenförmige Zusammenlagerungen“, waren deutlich erkennbar. Allerdings überragten die strukturierten Bereiche die Membranoberflächen im Maximalfall nur um 2 – 2,5 nm (linkes und rechtes Höhenprofil).

Vollständig ausgebildete bzw. vollständig integrierte Toxin-Poren hätten etwa 4,5 – 5 nm aus der Membran herausragen müssen. Hier besprochene Versuche wurden mehrfach durchgeführt. Typische Resultate sind dargestellt.

Möglicherweise lagen hier keine wirklichen Poren vor. Es ist möglich, dass durch den geringen Abstand der Lipiddoppelschicht zum Substrat, der Integrationsprozess der Pore nicht vollständig ablaufen konnte. Eine verringerte vertikale Ausdehnung des „gefangenen“ Zwischenzustandes könnte auf Grund dessen aufgetreten sein. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Stauchung des abgebildeten Systems durch die Interaktion mit der Tastschleife des Federbalkens. Da die Struktur der Präpore nicht bekannt ist, können an dieser Stelle aber keine weiteren Aussagen diesbezüglich gemacht werden.

Anhand der durchgeführten AFM-Experimente war nicht eindeutig zu klären, ob eine Porenbildung tatsächlich stattgefunden hatte. Deshalb wurden zusätzlich zu den AFM-Untersuchungen weitere Experimente durchgeführt, die eine solche Porenbildung in oberflächenunterstützten Modellmembranen belegen sollten.



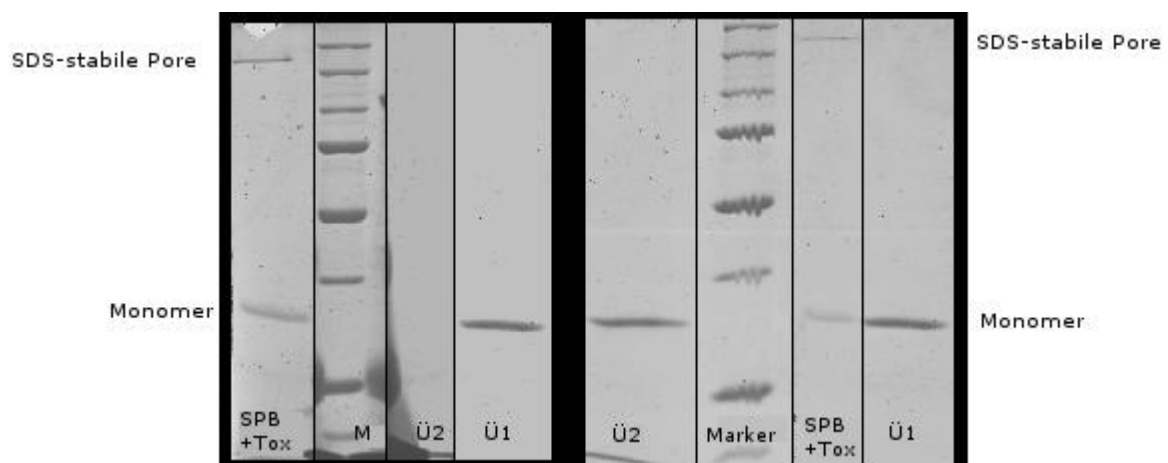
**Abbildung 38: Oberflächenunterstützte Modellmembran aus ePC:eSM:Cholesterol (0.35:0.35:0.3) auf Mica.** Strukturierte, räumlich begrenzte Membranabschnitte sind zu erkennen. Die eingesetzte Toxin-Konzentration lag bei 150 nM. Die Pfeile markieren die Höhenunterschiede zwischen der  $I_d$ -Phase und der  $I_o$ -Phase. Dieser beträgt ca. 1 nm. Strukturierungen der  $I_o$ -Phase durch die Toxine ragen ca. 2 – 2,5 nm aus der Membran heraus. Die Proteininteraktion erfolgte verstärkt an Membranabschnitten dieser Phase.

Die hier beschriebenen Versuche mit SDS-Lösungen an Toxin-enthaltenden SPBs sollten deshalb aufzeigen, welche Form von Toxin-Aggregation vorlag. Dazu wurden parallel mehrere Proben nach dem oben beschriebenen Verfahren präpariert. An diesen wurden zum einen AFM-Aufnahmen, zum andern aber auch gelelektrophoretische Untersuchungen durchgeführt.

10%ige SDS-Gele ohne Kochschritt wurden verwendet, um somit die SDS-stabile Poren von Toxin-Monomeren, bzw. den nicht SDS-stabilen Porenvorstufen zu unterscheiden. Die eingesetzte Proteinkonzentration lag bei 1 μM, die Einwirkzeit betrug zwei Stunden. Als Folge lagen oberflächenunterstützte Membranen vor, an denen Proteininteraktionen und

Porenausbildung stattgefunden hatten. Nach Abschluss der Einwirkzeit wurde der Proteinüberstand abgenommen (Ü1), die Probe mit Pufferlösung gespült und die resultierende Waschlösung aufgenommen (Ü2). Anschließend wurde der SPB mit 10%-iger SDS-Lösung aufgelöst, und so die Toxin-Poren ins Puffermedium freigesetzt. Das erhaltene Gemisch (SPB + Tox) wurde ebenfalls für die Untersuchungen verwendet, und alle drei Überstände wurden zusammen mit einem Marker (M) auf das Gel aufgetragen. Resultate von zwei auf diese Weise untersuchten Proben sind in Abbildung 39 dargestellt.

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Banden für Überstand 1 dem Molekulargewicht des monomeren  $\alpha$ -Toxin-Moleküls entsprachen (34 kDa). Die jeweils zweiten Überstände zeigen dagegen keine Banden. Für die mit Toxin behandelten Modellmembranen sind dagegen zwei deutliche Bande zu erkennen. Eine davon entspricht dem monomeren Toxin, die andere der heptameren Pore (ca. 240 kDa). Alle nicht als Pore vorliegenden Vor- bzw. Zwischenstufen der Proteinoligomerisierung wurden durch das eingesetzte SDS aufgelöst, so dass im Gel nur die Monomere, sowie die finalen Porenstrukturen auftreten. Da bei diesem Vorgang der sonst übliche Kochschritt nicht durchgeführt wurde, blieben die heptameren Poren erhalten. Für beide Proben waren hochmolekulare Banden zu erkennen, die der Porenform des Toxins entsprechen. Zusammen mit den weiter oben dargestellten AFM-Ergebnissen an dieser Art SPB, ist es sehr wahrscheinlich, dass die rundlichen Strukturen in Abbildung 39 tatsächlich die finale Porenstruktur repräsentierten.



**Abbildung 39:** SDS-Gelelektrophorese an zwei verschiedenen SPBs des Systems I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) nach Interaktion mit  $1\mu\text{M}$  Toxin. Für die SPBs sind sowohl Banden für die Monomere als auch für die SDS-stabile Pore zu finden. Die Überstände enthalten lediglich Monomere. Eine Porenausbildung in den Modellmembranen ist demnach erfolgt. (Bandenmuster des Markers siehe: Kapitel 12).

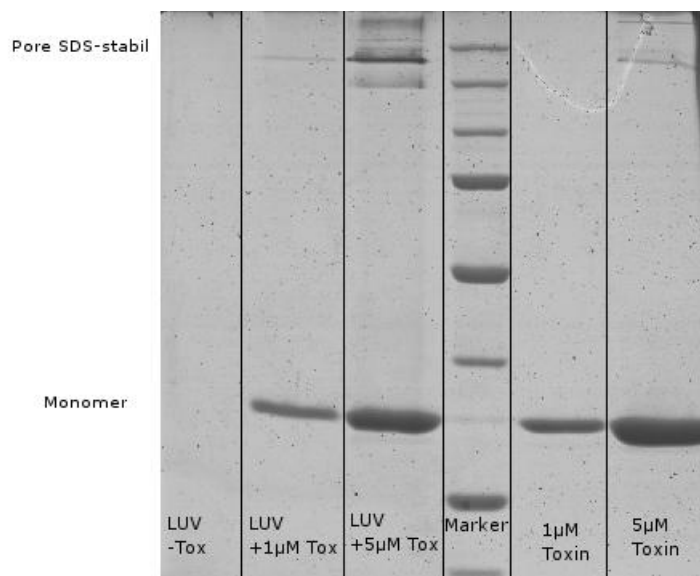
Die Monomer-Banden, die für die ersten Überstände gefunden wurde, lassen sich auf in Lösung oder an der Membran-Oberfläche verbliebene Proteinmonomere bzw. teilweise aggregierte Zwischenstufen, die nicht in die Membran integriert wurden, zurückführen. Für die Waschlösungen (Ü2) wurde in beiden Fällen keine Proteinbande gefunden. Dies liegt entweder daran, dass alle Proteinrückstände schon mit Überstand 1 entfernt wurden, oder aber daran, dass die Anzahl der noch in Lösung vorliegenden Proteine nicht ausreichte, um auf dem Gel detektiert zu werden.

Zur weiteren Untersuchung der Interaktion der  $\alpha$ -Toxin-Monomere mit diesem Phospholipidsystem wurden auch gelelektrophoretische Untersuchungen an frei in Lösung vorliegenden Vesikeln (LUVs) durchgeführt. Dabei handelte es sich um den gleichen Vesikel-Typ, der auch für die Ausbildung der zuvor beschriebenen SPBs verwendet wurde. Die Vesikel wurden dabei mit 1  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M Toxin versetzt, interagieren lassen, und anschließend auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde noch eine Vesikel-Lösung ohne Toxin, sowie Lösungen mit 1  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M Toxin ohne Vesikel, auf das Gel aufgebracht. Das resultierende Gel ist in Abbildung 40 gezeigt.

Für die Proben, die Vesikel und Toxin enthielten, waren wiederum zwei Banden erkennbar, eine starke Monomer-Bande, sowie eine Bande die der heptameren Pore entsprach. Für die Probe mit 5  $\mu$ M eingesetztem  $\alpha$ -Toxin erscheinen die Banden deutlich ausgeprägter, als bei der entsprechenden Probe mit lediglich 1  $\mu$ M zugesetztem Toxin. Dies liegt an der fünffach höheren Protein-Konzentration. Die Kontrollprobe mit Vesikeln ohne Toxin zeigte erwartungsgemäß keine Proteinbanden, wohingegen für reines Toxin der Konzentration 1  $\mu$ M eine Monomer-Bande, und für reines Toxin der Konzentration 5  $\mu$ M eine Monomer-Bande, sowie eine weitere, der SDS-stabilen Pore entsprechende Bande, zu sehen ist. Für letztere scheint die Proteinkonzentration in der Pufferlösung so hoch gewesen zu sein, dass eine teilweise Oligomerisierung bereits in Lösung erfolgte. Dies kann theoretisch auch für die 1 $\mu$ M-Lösung erfolgt sein, ist auf dem Gel aber auf Grund der nicht ausreichend hohen Konzentration nicht sichtbar.

Vergleicht man die beiden Gele in Abbildung 39 und Abbildung 40, so fällt auf, dass die hochmolekularen Banden, die den Toxin-Poren entsprechen, für die Experimente an SPBs deutlich ausgeprägter waren, als bei den Experimenten mit LUVs. Für den LUV-Ansatz waren dagegen die Monomer-Banden auf dem Gel deutlich ausgeprägter als für die SPBs. Grund dafür sollte sein, dass alle vorhandenen Monomere aus der Toxin-Lösung zu den entsprechenden Bande beitrugen ((LUV + 1 $\mu$ M Tox) & (LUV + 5 $\mu$ M Tox)), wohingegen man für einen geeigneten

Vergleich die Monomer-Banden der SPB-Präparation aus den Lauffronten von (Ü1), (Ü2) und (SPB + Tox) aufsummieren müsste. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Ansätze wohl auch bezüglich der final vorliegenden Lipid-Konzentration und somit bezüglich der möglichen Toxin-Bindestellen.



**Abbildung 40:** SDS-Gelelektrophorese an LUVs des System I (ePC:eSM:Chol – 0,35:0,35:0,3). LUVs mit 1 µM bzw. 5 µM wurden aufgetragen, genauso wie LUVs ohne Toxin, sowie reines Toxin in Konzentrationen von 1 µM und 5 µM. Hochmolekulare Banden, die der Toxin-Pore entsprechen sind für die LUV-Proben mit Toxin, sowie für die hochkonzentrierte Toxin-Probe (5 µM) zu sehen. (Bandenmuster des Markers siehe: Kapitel 12).

### 3.1.5.2.2 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit ternären oberflächenunterstützten Modellmembranen aus DOPS, PSM und Cholesterol

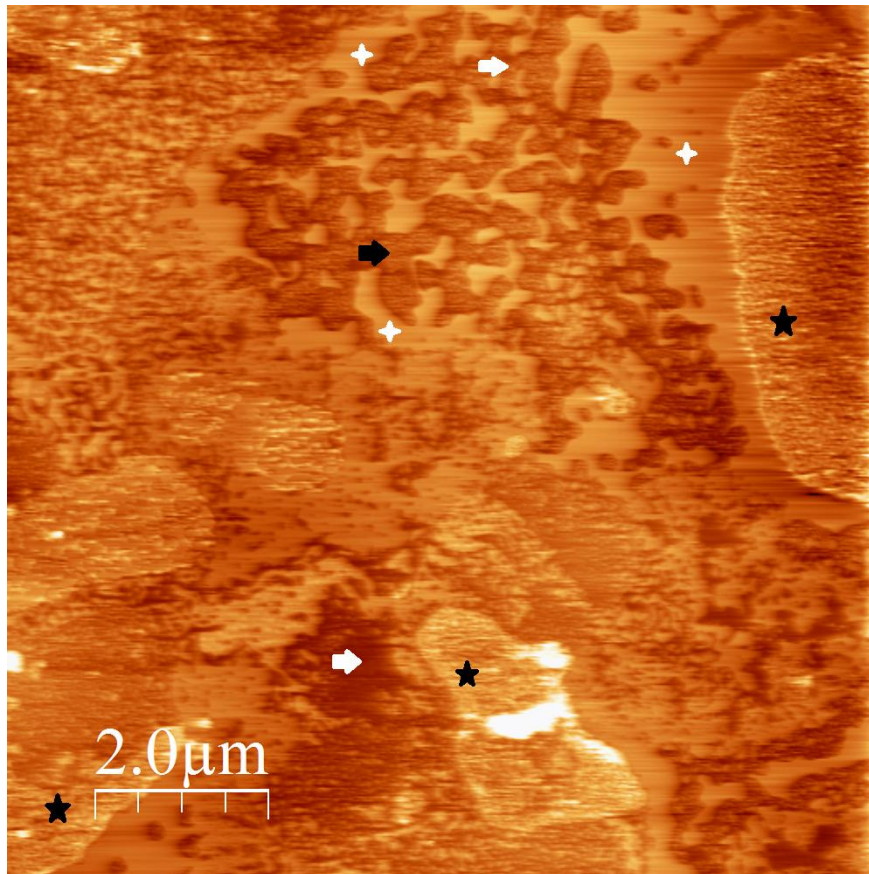
Alternativ zu den Untersuchungen an Lipidsystem I (ePC:eSM:Chol – 0,35:0,35:0,3) wurde auch Lipidsystem IV (DOPS:PSM:Chol – 2:1:1), welches an Stelle des neutralen ePC das negative geladene DOPS enthielt, mittels AFM und Gelelektrophorese auf die Porenbildung des Toxins hin untersucht.

Wie in Abbildung 34 dargestellt, konnte auch für dieses System eine SPB-Ausbildung erzielt, und außerdem eine Phasenseparation gezeigt werden. Höhenunterschiede der flüssig-geordneten gegenüber der flüssig-ungeordneten Phase lagen im Bereich von ca. 1,2 nm. Eine Interaktion der Toxin-Moleküle mit den oberflächenunterstützten Membranen sollte in diesem System nur an den flüssig-geordneten Membranabschnitten, im wesentlichen aufgebaut aus Spingomyelin und Cholesterol, stattgefunden haben, da nur diese eine Phosphocholin-Kopfgruppe als Bindestelle für die Proteine zur Verfügung stellten. In der umliegenden flüssig-ungeordnete Lipid-Phase lagen dagegen zum größten Teil Phosphatidylserin-Moleküle ohne Phosphocholin-Anteil vor.

Die Probenpräparation erfolgte wie bei den anderen Proben auch, wurde aber in einem alternativen Puffer durchgeführt, der sowohl  $Mg^{2+}$  als auch  $Ca^{2+}$  enthält. Für dieses Phospholipidsystem wurden ebenfalls AFM-Experimente und gelelektrophoretische Untersuchungen durchgeführt. Die eingesetzte Proteinkonzentration lag in diesem Fall bei [20 nM].

Entsprechende AFM-Ergebnisse sind in Abbildung 41 und Abbildung 42 dargestellt, wobei Abbildung 41 eine Übersichtsdarstellung zeigt. Verschiedene Bereiche der Membranoberfläche sind zu unterscheiden. Im Vergleich zu Abbildung 37 und Abbildung 38, die eine Interaktion der Toxine mit System I darstellen, lagen hier deutlich mehr unterschiedlich strukturierte Bereiche vor. Teilweise traten einfache, unstrukturierte Membranabschnitte auf (weiße Sterne), die sich etwa 3,5 nm über das Substrat erhoben. Davon abgegrenzt finden sich deutlich strukturierte Bereiche, die von ihrer vertikalen Ausdehnung ebenfalls einer PhosphoLipiddoppelschicht entsprachen (schwarze Sterne).

Ihre Strukturierung kann durch eine Anbindung der Toxin-Monomere erfolgt sein, die relativ ungeordnet an der Membran-Oberfläche vorlagen, oder aber, in den Grenzbereichen der beiden Domänenregionen, Aggregate aus Toxin-Oligomeren ausbildeten [17]. Dabei ist es unklar und schwer zu unterscheiden, ob und wobei es sich um monomere bzw. heptamere Toxin-Strukturen handelte. Erkennbare rundliche Strukturen, die für Poren oder evtl. auch für Präporen-Strukturen sprechen würden, waren nicht klar auszumachen.



**Abbildung 41: Übersichtsdarstellung System IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) mit 20nM Toxin.** Unterschiedlich strukturierte Bereiche sind zu erkennen. Teilweise sind reine, unstrukturierte SPB-Abschnitte zu sehen (weiße Sterne), teilweise traten räumlich begrenzte Bereiche von strukturierten SPBs auf (schwarze Sterne). Außerdem sind Bereiche sichtbar, die das Substrat zeigen (Pfeile). Teile davon erscheinen unstrukturiert (weiße Pfeile), wohingegen andere Bereiche eine Strukturierung aufweisen (schwarze Pfeile).

Die vertikale Ausdehnung der mit Toxin versetzten Membranabschnitte schwankte gegenüber den angrenzenden, unstrukturierten Membranbereichen zwischen ca. + 1 nm (zentrale Bereiche der strukturierten Domänen-Region – schwarze Sterne) und ca. + 4nm (Grenzfläche zwischen strukturierten und unstrukturierten Domänenregionen), was auch in den Höhenprofilen der Abbildung 42 zu sehen ist. Weiterhin finden sich Bereiche, an denen das Substrat zu Tage trat (schwarze und weiße Pfeile), und von denen ebenfalls einige Strukturierungen aufwiesen (schwarze Pfeile).

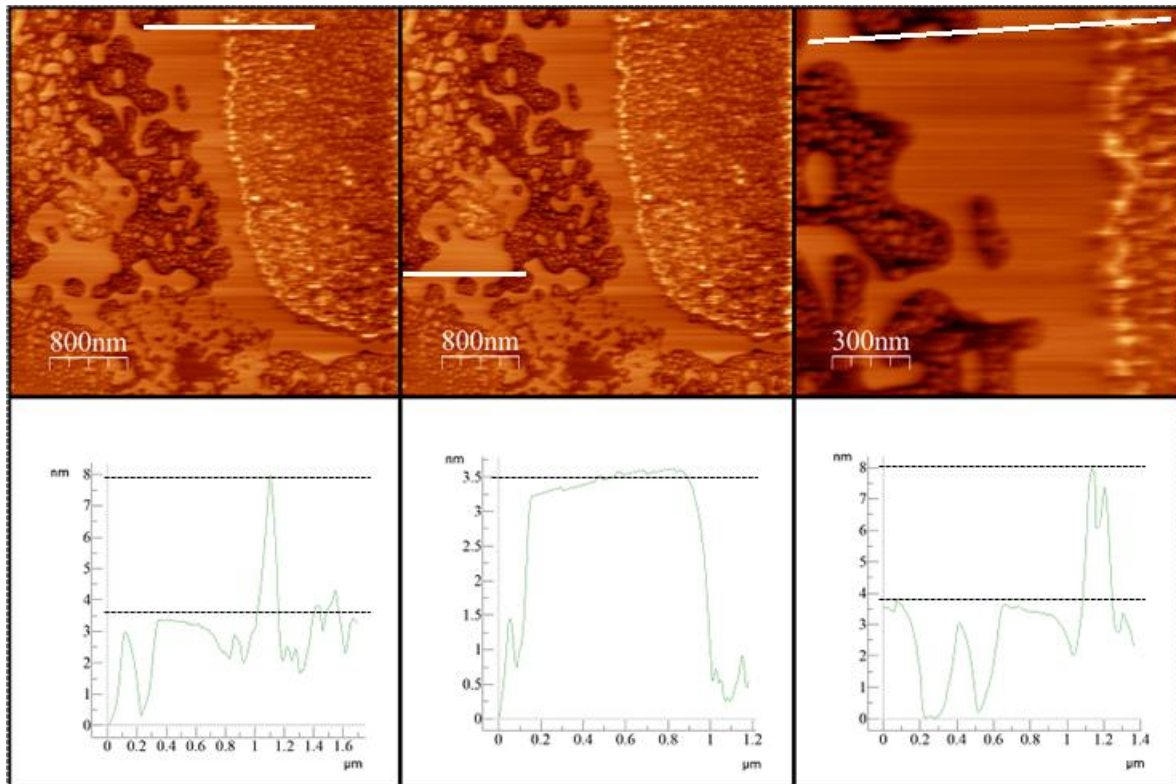
Abbildung 42 stellt die Höhenprofile dreier verschiedener Oberflächenregionen desselben Systems (IV) dar. Das oben beschriebene Auftreten von Membranabschnitten unterschiedlicher Strukturierung, sowie die Substratregionen sind zu sehen. Im rechten oberen Bild der Abbildung wird ein Substratabschnitt gezeigt, der rundliche Strukturen aufweist. Möglicherweise handelte

es sich um Toxin-Aggregate, die mit der freien Micaoberfläche interagierten. Vergleichende Experimente, die die Interaktion des Toxins mit reinen Micaoberflächen zeigen, werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

Für diese Art ternäres System (IV - DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) konnten also vier verschiedene Oberflächenbereiche unterschieden werden. Diese sind in Abbildung 41 markiert und werden hier nochmals aufgelistet. In Klammern steht die Codierung für die in Abbildung 41 entsprechend eingezeichneten Bereiche.

1. Reines Substrat (weiße Pfeile).
2. Substratabschnitte, die mit Toxin-Molekülen interagiert hatten (schwarze Pfeile).
3. Einfache unstrukturierte Bereiche der Modellmembran ohne Toxin-Moleküle (weiße Sterne). Diese Abschnitte waren wahrscheinlich hauptsächlich aus DOPS-Molekülen aufgebaut und lagen in der  $I_d$ -Phase vor
4. Modellmembran-Abschnitte mit gebundenen Toxin-Molekülen (schwarze Sterne). Hier ist zu beachten, dass sich die Strukturierung zwischen dem Inneren der Membran-Domänen und deren Randbereichen unterschieden. Dies kann ein Hinweis auf unterschiedliche Aggregationszustände des Proteins an der Membranoberfläche sein.

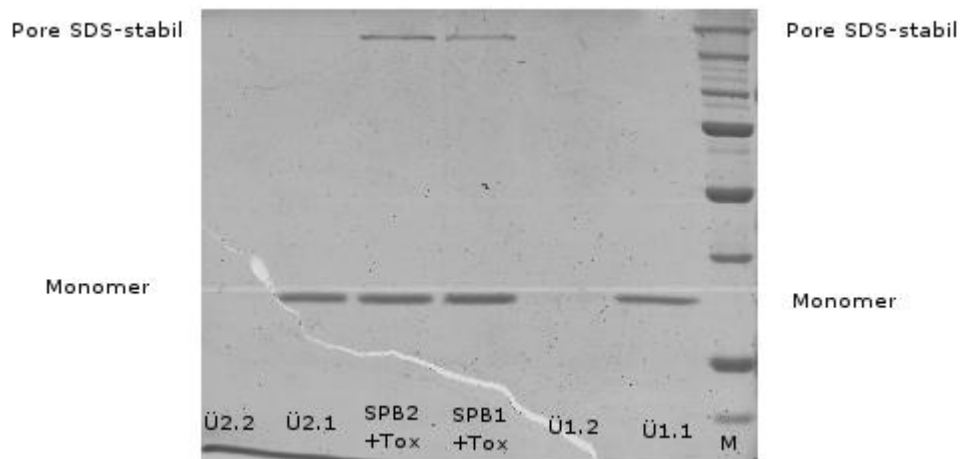
Auch für das ternäre Lipidsystem IV wurden Untersuchungen bezüglich der tatsächlich erfolgten Porenbildung im SPB gemacht. Die Vorgehensweise war dabei äquivalent zu den beschriebenen Untersuchungen an Lipidsystem I. Abbildung 43 zeigt ein Gel, auf dem die SDS-behandelten Probenoberflächen (SPB 1 & 2 +Tox), jeweils zwei Überstände pro Probe (Ü1.1 & 1.2 bzw. Ü2.1 & 2.2), sowie der Marker (M) aufgetragen wurden.



**Abbildung 42: Höhenprofile unterschiedlicher Oberflächenbereiche des Systems IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) mit 20 nM Toxin.** Strukturierte sowie unstrukturierte Membranbereiche sind zu erkennen. Außerdem kam es zur teilweisen Strukturierung des Substrats. Eine Interaktion des Toxins erfolgte demnach mit Membranabschnitten der I<sub>o</sub>-Phase, sowie teilweise mit der Micaoberfläche.

Für beide untersuchten Probenoberflächen sind zwei Banden zu erkennen, wovon jeweils eine für die Toxin-Monomere und die andere für die heptamere Pore, charakteristisch ist. Porenbildung hatte also auch für dieses Lipidsystem stattgefunden. Die jeweils zuerst abgenommenen Überstände (Ü1.1 & Ü2.1) zeigen erneut eine Monomer-Bande, wohingegen die Spüllösungen (Ü1.2 & Ü2.2) keine Proteinbanden im Gel aufweisen. Final ausgebildete Poren müssen sich daher durch Interaktion mit der an der Oberfläche vorliegenden Modellmembran ausgebildet haben, und können nicht auf eine etwaige Oligomerisierung in Lösung zurückgeführt werden.

Vergleicht man die Gele für die untersuchten SPBs für Lipidsystem I (ePC:eSM:Chol - 0,35:0,35:0,3) und IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) der Abbildung 39 und der Abbildung 41, so zeigt sich, dass für beide Sorten oberflächenunterstützter Modellmembranen Toxine in der Porenform auftraten. In den Überständen lagen dagegen lediglich Toxine in der monomeren Form vor. Zusammen mit den AFM-Ergebnisse für diese beiden Systeme scheint es eindeutig, dass  $\alpha$ -Toxin-Poren an der Oberfläche ausgebildet wurden.



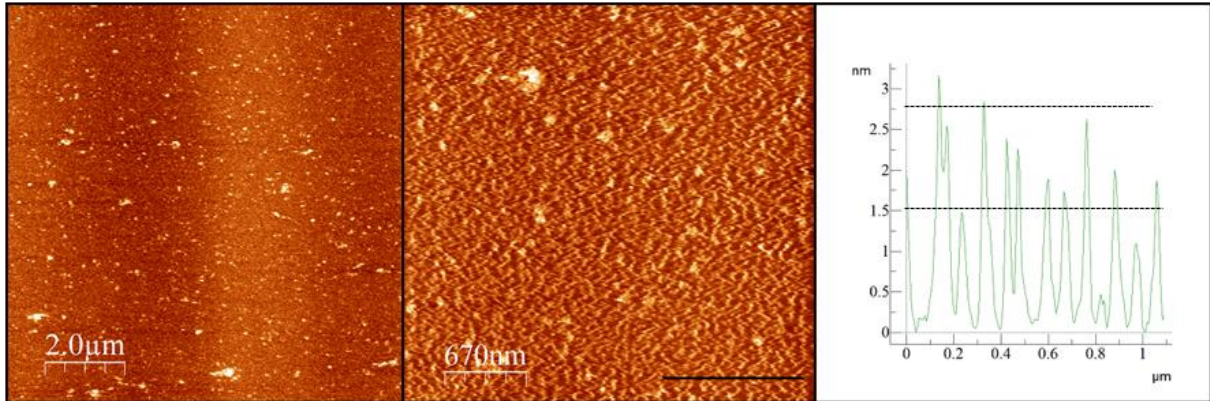
**Abbildung 43: SDS-Gelelektrophorese an zwei verschiedenen SPBs des Systems IV nach Toxin-Interaktion.** Für die SPBs sind sowohl Banden für die Monomere als auch für die SDS-stabile Pore zu finden. Die Überstände enthalten lediglich Monomere. Die eingesetzte Toxin-Konzentration betrug 1  $\mu$ M. (Bandenmuster des Markers siehe: Kapitel 12).

### 3.1.5.2.3 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit unbehandelten Micaoberflächen

Von Interesse war auch die Frage, wie und ob Toxin-Moleküle mit unbehandelten Micaoberflächen interagieren. Dazu wurden Mica-Plättchen frisch gespalten und anschließend mit einer 500 nM Toxin-Lösung überschichtet. Die Interaktion erfolgte wie immer außerhalb der AFM-Messzelle und die Proben wurden anschließend mit Pufferlösung gespült, um überschüssige Toxin-Moleküle zu entfernen. Die Messungen wurden dann wie gehabt in wässrigem Medium durchgeführt. Eine Ergebnisübersicht ist in Abbildung 44 dargestellt.

Interaktion und Anlagerung der Toxine mit dem Substrat erfolgte, wobei es zu einer relativ homogenen Strukturierung der Oberfläche mit teilweiser Aggregat-Bildung kam (weiße Flecken). Rundliche bis längliche Strukturen sind zu erkennen. Die Proteine schienen sich teilweise zu Ketten aneinanderzureihen und keine klaren Strukturen auszubilden (mittleres Bild). Das Höhenprofil in der rechten Darstellung entspricht dem schwarzen Balken im mittleren Bild. Maximale Erhebungen von ca. 2,5 nm über die Substratoberfläche sind erkennbar. Demzufolge

interagierten die Proteine mit der Micaoberfläche. Es kam dabei zu einer mehr oder weniger homogenen Verteilung und es konnten keine Stufenkanten detektiert werden, die dem Höhenprofil einer Membran entsprachen.



**Abbildung 44: Toxin-Interaktion mit reiner, un behandelter Micaoberfläche.** Toxin-Konzentration [500nM]. Es zeigen sich klare Strukturierungen an der Oberfläche, welche auf die Interaktion der Toxine mit dem Mica zurückzuführen sind. Eine relativ homogene Verteilung der Toxine ist zu erkennen.

Eine Unterscheidung gegenüber Oberflächen mit ausgebildeter ternärer Modellmembran und anschliessend erfolgter Toxin-Interaktion ist demnach möglich.

## 4 Diskussion alpha-Toxin

Für  $\alpha$ -Toxin-Moleküle aus *Staphylococcus aureus* wurden seit längerer Zeit zwei verschiedene Formen der Membranbindung postuliert. Nach Hildebrand et al. können zwei Arten Bindestellen auftreten, welche sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Toxinen unterscheiden. Dabei unterscheidet man eine hochaffine und eine niederaffine Form der Bindestelle [137]. Im Fall der niederaffinen Bindestelle erfolgt eine signifikante Bindung bzw. eine Toxin-induzierte Lyse der Zielmembranen erst bei einer Toxin-Konzentration von mehr als 1  $\mu$ M [137]. Die hochaffinen Bindestellen sind demgegenüber schon ab Konzentrationen im einstelligen nanomolaren Bereich anfällig gegenüber dem Toxin [137]. Die Differenzierung bzw. erstmalige Beobachtung des Auftretens dieser beiden Bindestellenformen wurden an Erythrozyten unterschiedlicher Organismen gemacht [137]. Weiterführende Untersuchungen diesbezüglich wurden an Lipid-Vesikeln durchgeführt und deuteten darauf hin, dass eine präferierte Interaktion der Toxine bzw. eine bevorzugte Porenbildung, an bestimmte Raft-artigen Membrandomänen erfolgt [2], welche die hochaffine Bindestelle darstellen. Diese Raft-artigen Membrandomänen sind vorwiegend aus Sphingomyelin und Cholesterol aufgebaut und unterscheiden sich strukturell gegenüber anderen Membranbereichen. Zu beachten ist hierbei, dass man zwischen Raft-artigen Membranabschnitten von Modellsystemen (Vesikel; SPBs) und in Zellmembranen auftretenden Rafts unterscheidet. Für die Funktionsweise letztgenannter können, zusätzlich zu den strukturellen Besonderheiten der Sphingomyelin-Cholesterol-Zusammenlagerung, noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, so z.B. das Zytoskelett der Zelle oder auch Raft-integrierte Proteine [178].

Ziel dieser Arbeit war es nun mittels AFM zu überprüfen, ob diese postulierte bevorzugte Interaktion der  $\alpha$ -Toxine mit Raft-artigen Domänen von Modellmembranen tatsächlich stattfindet.

Um dieses Vorhaben umzusetzen wurde folgende Vorgehensweise gewählt: Zuerst wurden Vesikel bestimmter Lipid-Zusammensetzung hergestellt und aus diesen oberflächenunterstützte Modellmembranen (SPBs) auf verschiedenen Oberflächentypen aufgebaut. Der Prozess der Vesikel- zu SPB-Transformation wurde dabei mittels der Methode der QCM-D verfolgt und so überprüft, ob die Ausbildung einer oberflächenunterstützten Modellmembran für die jeweilige

Lipid-Komposition stattfand. In der Folge wurden die für meine Zwecke geeigneten Lipid-Kompositionen, die in der Lage waren eine oberflächenunterstützte Modellmembran auszubilden, mit AFM untersucht. Dabei sollte die SPB-Ausbildung verifiziert und die SPBs auf ihre domänenbildenden Eigenschaften hin überprüft werden. Mehrkomponenten-Lipidsysteme, die eine Domänenbildung zeigten, sollten weiterhin auf ihr Interaktionsverhalten mit  $\alpha$ -Toxin-Molekülen aus *S. aureus* untersucht werden. Geeignete oberflächenunterstützte Modellmembranen wurden zu diesem Zweck mit einer  $\alpha$ -Toxin-Lösung definierter Konzentration überschichtet und die Folgen der Interaktion zwischen Toxinen und SPB mittels AFM sichtbar gemacht. Durch diese Vorgehensweise sollte überprüft werden, ob eine Porenausbildung der Toxin-Moleküle bevorzugt an den erwähnten Raft-artigen Membranabschnitten auftritt.

#### 4.1 Adsorptionsverhalten von Vesikeln unterschiedlicher Phospholipid-Komposition

Im Wesentlichen können für die Interaktion von Phospholipid-Vesikeln mit Substratoberflächen vier Interaktionsprozesse mittels QCM-D unterschieden werden:

1. Es erfolgt keine Adsorption der Vesikel an der Substratoberfläche, z.B. auf Grund von Abstoßungsprozessen. Eine solche Interaktion kann für Vesikel, aufgebaut aus mehr als 50% Phosphatidylserin (PS), auf Mica oder Silizium erfolgen wenn keine zweiwertigen Kalziumionen zugegen sind [179]. Hier wird eine Interaktion auf Grund der gegenseitigen Abstoßung zwischen den negativen PS-Kopfgruppen an der Vesikeloberfläche und der nettonegativen Gesamtladung der Mica- bzw. Siliziumoberflächen verhindert.
2. Eine Vesikeladsorption an der Substratoberfläche erfolgt und ein SPB wird ausgebildet. Im Laufe des Interaktionsprozesses binden zuerst intakte Vesikel an die Substratoberfläche. Im weiteren Verlauf kommt es dann zur Interaktion der Vesikel untereinander und mit der Oberfläche. Dieser Vorgang setzt sich fort bis eine kritische Oberflächenbelegung mit Vesikeln erreicht ist. Die Werte der QCM-D-Parameter  $\Delta f$  und  $\Delta D$  erreichen an diesem Punkt ihr Minimum bzw. Maximum. In der Folge kommt es zum

Aufreißen der Vesikel und zur Abgabe des in ihnen enthaltenen Flüssigkeitsvolumens ins Umgebungsmedium. Aus den Membranen der aufgeplatzten Vesikel bildet sich nun ein oberflächenunterstützte Modellmembran (SPB) an der Oberfläche aus. Am Ende des Prozesses ist im Idealfall ein „perfekter“, geschlossener SPB ausgebildet worden und die Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  liegen bei ca. -25 Hz bzw.  $0,2 \cdot 10^{-6}$  [180,156]. Verbleiben trotz erfolgter SPB-Ausbildung noch vereinzelte Vesikel an der Oberfläche, kann es allerdings zu erhöhten Werten für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  kommen. Dieser Ablauf ist auf Mica- bzw. Siliziumdioxid-Oberflächen vor allem für Vesikel beschrieben, die im wesentlichen zwitterionische Kopfgruppen, in der Regel Phosphatidylcholin, tragen [180,156,162].

3. Ein alternativer Prozess der SPB-Ausbildung wurde von Richter et al für DOTAP-Vesikel mit positiver Kopfgruppenladung auf nettonegativ geladenen Siliziumdioxid-Oberflächen postuliert[174]. Dabei kommt es unmittelbar nach Interaktionsbeginn der Vesikel mit der Substratoberfläche zum Einsetzen der SPB-Ausbildung. Dabei muss zuvor keine kritische Oberflächenbelegung an Vesikeln erfolgt sein. In der erwähnten Publikation liegen die finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  bei ca. -22 Hz bzw.  $0,2 \cdot 10^{-6}$  [174].
4. Eine Interaktion zwischen den Vesikeln und der Oberfläche erfolgt. Dabei kommt es aber nicht zur Ausbildung einer oberflächenunterstützten Modellmembran, sondern lediglich zur Adsorption intakter Vesikel und zur Ausbildung einer vesikulären Schicht (SVL – Supported Vesicle Layer). Für diesen Prozess ist die Interaktion zwischen Vesikeloberfläche und Substrat nicht ausreichend, um ein Aufreißen der Vesikel zu induzieren und eine SPB-Ausbildung auszulösen. Beschrieben wurde ein solcher Vorgang für ePC-Vesikel auf oxidierten Platin- bzw. auf Titanoberflächen[156]. Die erhaltenen finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  lagen dabei für Titanoberflächen bei -110 Hz bzw.  $5,5 \cdot 10^{-6}$ . Für Platinoberflächen lagen die entsprechenden Werte bei -150 Hz und  $7 \cdot 10^{-6}$ .

Diese vier aus der Literatur bekannten Interaktionsformen wurden als Grundlage für die Interpretation meiner Versuche verwendet.

#### 4.1.1 QCM-D-Versuche zum Adsorptionsverhalten von Vesikeln unterschiedlicher Lipid-Komposition

Ziel der von mir durchgeführten Experimente war es SPBs aus Vesikeln auszubilden, die sich aus unterschiedlichen Phospholipid-Mischungen zusammensetzten, und die zum großen Teil in dieser Form zuvor nicht untersucht worden waren. Ternäre Lipid-Kompositionen unterschiedlicher Zusammensetzung wurden dazu verwendet, darunter ternäre Lipidsysteme, aufgebaut aus Phosphatidylcholin ( $T_M$ -low), Sphingomyelin ( $T_M$ -high) und Cholesterol (PC:SM:Chol) im Verhältnis 0.35:0.35:0.3. Wie mittels verschiedener Methoden erstellte Phasendiagramme für Vesikel, zusammengesetzt aus diesen drei Lipid-Komponenten, zeigen [169,170,172,181], weist dieses Lipid-Gemisch bei Raumtemperatur in der Regel zwei Phasen ( $I_d$ - &  $I_o$ -Phase) auf. Die  $I_d$ -Phase wird dabei in der Hauptsache aus Phosphatidylcholin aufgebaut, wohingegen sich die  $I_o$ -Phase im Wesentlichen aus Sphingomyelin und Cholesterol zusammensetzt. Solche Domänen der  $I_o$ -Phase werden in der Regel als Raft-artige Domänen bezeichnet [169].

Bei der Erstellung von Phasendiagrammen kann immer eine gewisse Ungenauigkeit auftreten, da durch die Limitierung der verwendeten Methoden teilweise nicht alle auftretenden Domänenformen detektiert werden. So können z.B. mittels Fluoreszenzmikroskopie keine Phasenseparationen detektiert werden, die zur Ausbildung von Domänen der Größenordnung von nur wenigen Nanometern führen. Auf Grund solcher Einschränkungen, und auf Grund dessen, dass die Phasendiagramme oftmals mit unterschiedlichen Methoden erstellt werden, kann es zu Abweichungen hinsichtlich der beschriebenen Phasenverteilungen für ein und dieselbe Lipid-Zusammensetzung kommen.

Da in dieser Arbeit die Phasenseparation mittels AFM untersucht wurde und Phasendiagramme, die allein auf dieser Methode basieren meines Wissens nicht beschrieben sind, musste untersucht werden welche Phospholipid-Kompositionen in der Lage sind phasenseparierte oberflächenunterstützte Modellmembran auszubilden. Zur Gewinnung der nötigen experimentellen Expertise wurden zuerst reine ePC-Vesikel verwendet, für die aus der Literatur bekannt war, dass eine SPB-Ausbildung auf Mica bzw. Siliziumdioxid als Substratoberfläche erfolgt [182,156,180] und die bei Raumtemperatur nur in einer Phase, der  $I_d$ -Phase, vorliegen [175,17].

Die von mir erhaltenen finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  für die Interaktion dieses Vesikel-Typs mit Siliziumdioxid lagen bei -28 Hz respektive  $0,7 \cdot 10^{-6}$  und waren somit gut mit Literaturwerten [182,156] vereinbar (Tabelle 8 & Tabelle 9). Es konnte davon ausgegangen werden, dass eine SPB-Ausbildung erfolgte. Geringfügige Unterschiede gegenüber den Literaturwerten traten auf. Diese Abweichungen deuteten darauf hin, dass in meinen Experimenten noch ein kleiner Anteil intakter Vesikeln an der Substratoberfläche verblieben war. Auf Grund des Wassers bzw. Puffervolumens, welches in den intakt an der Oberfläche verbliebenen Vesikeln gebunden vorlag, war der Wert für die angelagerte Masse gegenüber einer reinen oberflächenunterstützten Membran erhöht, was mit einem um ca. 3 Hz erniedrigten Wert für  $\Delta f$  einherging. Die im Vergleich zur Literatur um ca.  $0,5 \cdot 10^{-6}$  erhöhten Werte für das Dissipationssignal resultieren aus dem gleichen Grund. Durch die an der Oberfläche verbliebenen flüssigkeitsgefüllten Vesikel besaß das angelagerte Material, gegenüber einer flach am Substrat anliegenden „perfekten“ Membran, eine erhöhte Trägheit (Tabelle 8 & Tabelle 9).

Die verschiedenen in dieser Arbeit eingesetzten ternären Phospholipidzusammensetzungen wiesen bezüglich ihres Adsorptions- und Spreitungs-Verhaltens noch stärkerer Unterschiede gegenüber dem in der Literatur beschriebenen reinen ePC-System auf [182,156,180]. Verwendung fanden dabei, die aus Gründen der Übersichtlichkeit in Tabelle 7 nochmals zusammengefassten Phospholipid-Kompositionen, die im Folgenden mit Lipidsystem I – V bezeichnet werden.

**Tabelle 7: Ternäre Phospholipidsysteme und ihre Komponenten.** Die Verhältnisse der Phospholipid-Komponenten für System I - III sind jeweils PC:SM:Chol (0.35:0.35:0.3). Für System IV wurde die Komposition DOPS:PSM:Chol (2:1:1), und für System V die Komposition DOTAP (1:1:1) verwendet.

Ternäres System	Lipid 1 ( $T_M$ -low )	Lipid 2 ( $T_M$ -high )	Lipid 3 (Sterol)
I	ePC	eSM	Cholesterol
II	DOPC	PSM	Cholesterol
III	POPC	PSM	Cholesterol
IV	DOPS	PSM	Cholesterol
V	DOTAP	PSM	Cholesterol

Die ternären Systeme I – III setzten sich alle aus Phosphatidylcholinen, Sphingomyelinen und Cholesterol zusammen und unterschieden sich jeweils nur durch die Länge und den Sättigungsgrad ihrer Fettsäureschwänze. Bezüglich ihres Adsorptionsverhaltens wiesen sie sowohl untereinander, als auch gegenüber dem reinen ePC-System, Unterschiede auf. Die

Ergebnisse sind in Abbildung 22 zusammengefasst. Für alle drei Systeme wurde zwar mehr oder weniger der Kurvenverlauf detektiert, der für die Ausbildung eines SPB des jeweiligen Vesikeltyps charakteristisch ist, allerdings mit leichten Variationen im Kurvenverlauf.

Ausgehend von dem typischen Adsorptions- und SPB-Ausbildungsprozess für Vesikel mit zwitterionischen Kopfgruppen (s.o.) traten für ternäre Systeme aus PC, SM und Cholesterol (0.35:0.35:0.3) Variationen bezüglich Zeitpunkt des Beginns der Spreitung und hinsichtlich der finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  auf. Für System I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) lag der Zeitpunkt, an dem die Ruptur der Vesikel eintrat, bei ca. einer Minute. Für die Lipidsysteme II (DOPC:PSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) war der Zeitraum bis zum Beginn der Vesikelruptur demgegenüber leicht vergrößert. Die Ruptur setzte erst nach zwei bis drei Minuten ein. Außerdem trat für System III eine, gegenüber den anderen Systemen, gesteigerte Massenzunahme (kleineres  $\Delta f$ ) auf. Eine höhere kritische Konzentration von Vesikeln an der Substratoberfläche war demnach notwendig, um das Aufreißen zu induzieren (Tabelle 8 & Tabelle 9). Diese Unterschiede können auf Grund leichter Variationen bezüglich der Hydrophobizität der Substratoberflächen oder hinsichtlich der Größe der eingesetzten Vesikel resultieren. Auch können sie auf Unterschiede bezüglich der Flexibilität der Membran (auf Grund der Unterschiede bezüglich der verwendeten PC-Moleküle) zurückzuführen sein. Wesentlich für meine Versuche war dabei aber auch nicht der detaillierte zeitliche Ablauf des SPB-Ausbildungsprozesses, sondern dass dieser Prozess in einem überschaubaren zeitlichen Rahmen überhaupt stattfand und die ausgebildeten SPBs für die Experimente zur Toxin-Interaktion genutzt werden konnten.

Ein für meine Ziele viel wesentlicherer Unterschied im Adsorptionsverhalten dieser Lipidsysteme waren die finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$ . Diese waren für die ternären System I – III im Vergleich zum ePC-System in allen Fällen erniedrigt ( $\Delta f$ ) bzw. erhöht ( $\Delta D$ ) (Tabelle 8).

In der Literatur finden sich bezüglich des Adsorptionsverhaltens ternärer Phospholipid-Kompositionen nicht viele Studien. Lediglich eine von Sundh et al. publizierte Arbeit aus dem Jahr 2010 beschreibt die Interaktion ternärer Phospholipid-Mischungen, zusammengesetzt aus PC, SM und Cholesterol, auf Siliziumdioxid-Oberflächen.

**Tabelle 8: Übersicht über die erhaltenen QCM-D-Werte bezüglich der Interaktion der verschiedenen Lipidsysteme mit Siliziumdioxid-Oberflächen.** Die in Klammern gesetzten Ziffern weisen auf die jeweilige Interaktionsform hin, wie sie in der Aufzählung weiter oben beschrieben ist.

Lipid-System	Phospholipid-Komposition	Vermutete Interaktionsform	$\Delta f_{\text{Min}}$	$\Delta D_{\text{Max}}$	$\Delta f_{\text{final}}$	$\Delta D_{\text{final}}$	Zeit bis zum Erreichen des Endwerts
<b>0</b>	ePC (100%)	Vesikel zu SPB Transformation (2)	-36 Hz	$5,1 \cdot 10^{-6}$	-28 Hz	$0,7 \cdot 10^{-6}$	ca. 30 min
<b>I</b>	ePC:eSM:Chol – (0.35:0.35:0.3)	Vesikel zu SPB Transformation (2)	-42 Hz	$2,8 \cdot 10^{-6}$	-38 Hz	$3,9 \cdot 10^{-6}$	ca.30 min
<b>II</b>	DOPC:PSM:Chol (0.35:0.35:0.3)	Vesikel zu SPB Transformation (2)	-38 Hz	$2,8 \cdot 10^{-6}$	-32 Hz	$3,8 \cdot 10^{-6}$	ca.30 min
<b>III</b>	POPC:PSM:Chol (0.35:0.35:0.3)	Vesikel zu SPB Transformation (2)	-68 Hz	$4,2 \cdot 10^{-6}$	-32 Hz	$0,9 \cdot 10^{-6}$	ca.30 min
<b>IV</b>	DOPS:PSM:Chol 2:1:1	Mischform SPB – SVL (2,3,4)	-40 Hz	$9,8 \cdot 10^{-6}$	-40 Hz	$9,8 \cdot 10^{-6}$	ca.1100 min.
<b>V</b>	DOAP:PSM:Chol 1:1:1	Mischform SPB – SVL (2,3,4)	-40 Hz	$5,3 \cdot 10^{-6}$	-40 Hz	$5,3 \cdot 10^{-6}$	ca.230 min

Diese Arbeit zeigt eine mit meinen Resultaten vergleichbare Interaktion der Vesikel mit der Siliziumoberfläche. Auch in dieser Studie kommt es für ternäre Systeme aus PC, SM und Cholesterol anfänglich zum Abfall der Resonanzfrequenz und zum Anstieg der Dissipation. Nach Erreichen eines Minimums ( $\Delta f$ ) bzw. eines Maximums ( $\Delta D$ ) tritt der für eine SPB-Ausbildung zwitterionischer Vesikel typische Prozess des Aufreißens ein. Dies äußert sich im Abfall der Dissipation und im Anstieg der Resonanzfrequenz, was beides aus dem Verlust der in den Vesikeln gebundenen Flüssigkeit ins Umgebungsmedium resultiert [182,156,180,162]. Anschließend kommt es zum Einsetzen der Ausbildung der Modellmembran und zu einem erneuten Anstieg bzw. Abfall der Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$ , gefolgt von einer erneuten Abnahme ( $\Delta f$ ) bzw. Anstieg ( $\Delta D$ ). Die in dieser Studie erhaltenen Werte  $\Delta f_{\text{Min}}$  und  $\Delta D_{\text{Max}}$  unterscheiden sich

dabei zwar gegenüber den von mir erhaltenen Werten (Tabelle 8 & Tabelle 9), allerdings war der grundlegende Kurvenverlauf der Messungen, sowie die erhaltenen finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$ , eindeutig einzuordnen [162].

Durch den Einbau von SM und Cholesterol kommt es für bestimmte Mischverhältnisse zum Auftreten unterschiedlicher Lipid-Phasen ( $I_d$  &  $I_o$ ) [169,172,181]. Dies äußerte sich in meinen Versuchen dadurch, dass sich die Flexibilität der ternären Vesikelmembranen gegenüber reinen ePC-Membranen unterschied, und eine höhere kritische Oberflächenbelegung notwendig wurde, damit die Ruptur der Vesikel, und in der Folge die SPB-Ausbildung, einsetzte. Ein vergrößerter Zeitraum und eine erhöhte Massenzunahme als Voraussetzung für den Beginn der Ruptur, wie sie auch in meinen Versuchen für die ternären System II (DOPC:PSM:Chol - (0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) auftraten, sind in der Publikation von Sundh et al für solche Kompositionen beschrieben [162]. All diese Punkte ließen sich darauf zurückführen, dass neben einer Interaktion der Vesikel mit der Substratoberfläche auch noch eine verstärkte Interaktion der adsorbierten Vesikel untereinander erfolgt sein musste, um die SPB-Ausbildung zu induzieren [162]. Cholesterol nimmt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle ein, da das Molekül in der Lage ist sich innerhalb der Modellmembran schnell umzulagern und sich an den gekrümmten Randbereichen der deformierten Vesikel anzusammeln, wodurch die Flexibilität innerhalb der Vesikelmembran erhöht, und die Ruptur erschwert wird.

Die große Ähnlichkeit in der Lipid-Zusammensetzung der von mir verwendeten ternären Systeme I – III mit den von Sundh et al. eingesetzten Kompositionen, äußert sich auch hinsichtlich des Phasendiagramms. In der Literatur finden sich dazu verschiedene Publikationen [169,172,181]. Für die hier eingesetzten Systeme I - III lagen demnach mindestens zwei Lipid-Phasen vor, die der  $I_d$ - und die  $I_o$ -Phase zuzuordnen waren [169,172,181,170]. Dies untermauert die Vermutung, dass für die in meinen QCM-D-Experimenten eingesetzten ternären Vesikel auf Grund des Auftretens der Raft-artigen  $I_o$ -Phase eine erhöhte Flexibilität der Modellmembran, einhergehend mit einer erhöhten Robustheit gegenüber dem Aufreißprozess, auftrat. Dadurch erklärte sich die erhöhte Biessamkeit der Membranen auf Grund derer der detektierte Kurvenverlauf resultierte.

Die erhöhte Flexibilität der Membran führte also dazu, dass insgesamt mehr intakte Vesikel an der Oberfläche zurückblieben und kein reiner SPB ausgebildet wurde. Die verbliebenen intakten Vesikel trugen durch das in ihnen enthaltene Puffervolumen sowohl zur Masse, als auch zur

Dämpfung bei, was die gegenüber einem reinen SPB leicht erhöhten finalen Werten für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  in meinen Versuchen erklärt (Tabelle 2 & 3).

**Tabelle 9: Übersichtstabelle für in der Literatur beschriebene Vesikel-Adsorptionsprozesse.** Die in Klammern gesetzten Ziffern weisen auf die jeweilige Interaktionsform hin, wie sie in der Aufzählung weiter oben beschrieben ist.

Literatur	Phospholipid-Komposition	Substrat	Interaktionsform	$\Delta f_{\text{Min}}$	$\Delta D_{\text{Max}}$	$\Delta f_{\text{final}}$	$\Delta D_{\text{final}}$
<b>Keller 1998</b>	ePC (100%)	SiO <sub>2</sub>	Vesikel zu SPB Transformation (2)	-70 Hz	2 *e <sup>-6</sup>	-26 Hz	0 *e <sup>-6</sup>
<b>Keller 1998</b>	ePC (100%)	oxidiertes Gold	Vesikel zu SVL Transformation (4)	-90 Hz	3 *e <sup>-6</sup>	-90 Hz	3 *e <sup>-6</sup>
<b>Reimhult 2003</b>	ePC (100%)	SiO <sub>2</sub>	Vesikel zu SPB Transformation (2)	-60 Hz	1,7 *e <sup>-6</sup>	-27 Hz	0,15 *e <sup>-6</sup>
<b>Reimhult 2003</b>	ePC (100%)	Oxidiertes Platin	Vesikel zu SVL Transformation (4)	-150 Hz	6,7 *e <sup>-6</sup>	-150 Hz	6,7 *e <sup>-6</sup>
<b>Reimhult 2003</b>	ePC (100%)	TiO <sub>2</sub>	Vesikel zu SVL Transformation (4)	-110 Hz	5,5 *e <sup>-6</sup>	-110 Hz	5,5 *e <sup>-6</sup>
<b>Richter 2005</b>	DOPC/DOPS (4:1)	SiO <sub>2</sub>	Vesikel zu SPB Transformation (2)	-60 Hz	2,4 *e <sup>-6</sup>	-25 Hz	0,1 *e <sup>-6</sup>
<b>Richter 2005</b>	DOPC/DOPS (1:1)	SiO <sub>2</sub>	Vesikel zu SVL Transformation (4)	-58 Hz	3 *e <sup>-6</sup>	-58 Hz	3 *e <sup>-6</sup>
<b>Richter 2005</b>	DOPC/DOPS (1:2)	SiO <sub>2</sub>	Keine Adsorption (1)	0 Hz	0	0 Hz	0
<b>Richter 2005</b>	DOTAP (100%)	SiO <sub>2</sub>	Vesikel zu SPB Transformation (3)	-21 Hz	0,8 *e <sup>-6</sup>	-21 Hz	0,1 *e <sup>-6</sup>
<b>Sundh 2010</b>	POPC/PSM/Chol (Diverse)	SiO <sub>2</sub>	Vesikel zu SPB Transformation (2)	-50 bis -150 Hz	6 bis 18 *e <sup>-6</sup>	-25 bis -28 Hz	2 bis 4 *e <sup>-6</sup>

Für das in dieser Arbeit angestrebte Ziel phasenseparierte SPBs auszubilden, die in der Folge mittels AFM und Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich Domänenbildung und Toxin-Interaktion untersucht werden sollten, war das Vorkommen von noch intakten Vesikeln an der Oberfläche kein entscheidendes Problem. Zum einen können verbliebene Vesikel-Rückstände durch

mehrfaches Spülen mit Pufferlösung entfernt werden [60,162], zum anderen kann es durch die Interaktion der AFM-Tastspitze mit noch intakten Vesikeln zum Aufreißen der Vesikel kommen, so dass sich ihre Membranen in den bereits vorhandenen SPBs eingliedern können [183,184,185,148]. Weiterhin wurden mittels AFM immer nur Teilbereiche der Oberfläche definierbarer Größe betrachtet, so dass es kein Problem darstellte durch gezielte Positionswechsel Abschnitte abzubilden an denen SPBs vorlagen. Probleme auf Grund der Interaktion von Toxin-Molekülen mit an der Oberfläche verbliebenen Vesikeln waren ebenfalls nicht zu erwarten. Sollten Toxine mit an der Oberfläche verbliebenen Vesikeln interagiert haben, stellte dies immer nur einen kleinen Anteil der Gesamtinteraktion dar. Da davon ausgegangen werden konnte, dass der Hauptanteil der Substratoberfläche mit SPB bedeckt war, musste auch die Hauptinteraktion der Toxine mit den Oberflächen dieser SPB-Abschnitte erfolgen. Selbst eine mögliche erleichterte Insertion der Toxine in die Membranen noch intakter Vesikel, die sich auf Grund der erhöhten Krümmung der Vesikelmembranen gegenüber planaren Modellmembranen ergeben haben könnte, sollte nicht ins Gewicht fallen, da alles in allem auf jeden Fall ausreichend Toxin zur Verfügung stand, so dass eine Interaktion des Toxins mit SPB-Bereichen gewährleistet war.

Die hier besprochenen Lipid-Kompositionen I – III (PC:SM:Chol. – 0.35:0.35:0.3) bildeten also auf Siliziumdioxid im Wesentlichen oberflächenunterstützte Modellmembranen aus, in denen sehr wahrscheinlich noch intakte Vesikel vorlagen. Für die von mir angestrebten weiteren Untersuchungen hinsichtlich des Interaktionsprozesses der Toxine mit SPBs stellten sie ein gut geeignetes Modellsystem dar.

Weitere in dieser Arbeit verwendete Lipid-Kompositionen waren Lipidsystem IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) und V (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1). Der Hauptunterschied dieser Kompositionen gegenüber den bereits beschriebenen Kompositionen I – III (PC:SM:Chol. – 0.35:0.35:0.3) lag dabei in der Kopfgruppenform und Ladung des Phospholipids mit niedrigem Schmelzpunkt ( $T_M$ -low). Während für die Systeme I – III in allen Fällen das zwitterionische Phosphocholin als Kopfgruppe auftrat, lagen für System IV das negative Serin und für System V die positive DOTAP-Kopfgruppe vor. Die beiden letztgenannten besitzen demnach eine Nettoladung und sind per se, und im Gegensatz zu Phosphocholin, keine bekannten Bindestellen für das  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* [39].

Die mittels QCM-D detektierten Adsorptionsprozesse unterschieden sich für System IV und V deutlich von den bereits besprochenen der Systeme I – III. Für eine SPB-Ausbildung von Vesikeln mit zwitterionischen Kopfgruppen typische Charakteristika traten nicht auf (s.o.) [156,183,162].

Vielmehr traten Ähnlichkeiten zum von Richter et al. [174] beschriebenen Adsorptions- und SPB-Ausbildungsprozess für positiv geladene DOTAP-Vesikel auf Siliziumdioxid auf (s.o.) [174]. Initial erfolgte für beide Systeme (IV & V) eine konstante Massenzunahme, ohne dass Maximal- bzw. Minimalwerte von  $\Delta f$  und  $\Delta D$  auftraten, wie sie für die Systeme I – III, sowie für das reine ePC-System weiter oben, beschrieben wurden. Die schließlich erreichten Endwerte ( $\Delta f_{\text{final}}$  &  $\Delta D_{\text{final}}$ ) waren dabei deutlich niedriger ( $\Delta f$ ) bzw. höher ( $\Delta D$ ), als bei einem auf diese Weise ausgebildeten, reinen SPB aus DOTAP-Molekülen [174].  $\Delta f_{\text{final}}$  war demgegenüber für beide Systeme (IV & V) doppelt so stark erniedrigt. In der Literatur wird ein finales  $\Delta f$  von -20 Hz beschrieben [174]. In meinen Versuchen wurde ein finales  $\Delta f$  von -40 Hz detektiert. Für die finalen Dissipationswerte waren die Unterschiede gegenüber der Literatur noch ausgeprägter. Während Richter et al. ein finales  $\Delta D$  von ca.  $0,5 \cdot e^{-6}$  beschreiben, lagen die erhaltenen Werte für meine Messungen für System IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) bei ca.  $9,5 \cdot e^{-6}$  und für System V (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1) bei ca.  $5,5 \cdot e^{-6}$ .  $\Delta D$  ist demnach für diese beiden Lipid-Kompositionen um das 19-fache, bzw. um das elffache erhöht. Demnach kann nicht von einer „regulären“ SPB-Ausbildung, wie sie nach dem von Richter publizierten Beispiel erfolgte, ausgegangen werden [174].

Die für System IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) und V (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1) erhaltenen Endwerte für Dissipation und Resonanzfrequenz sprachen vielmehr für einen Zwischenzustand aus teilweise ausgebildetem SPB und noch intakten oberflächenadsorbierten Vesikeln. Vergleiche von Literaturwerten für einen „perfekt“ ausgebildeten, reinen SPB [174,182,180,156], sowie für eine an der Substratoberfläche vorliegende, geschlossene Vesikelschicht [156] mit den hier erhaltenen Werten, unterstützen diese These. Im Falle eines regulär ausgebildeten SPBs sind Werte zwischen -20 Hz [174] und -26 Hz [156,180] publiziert. Geschlossene Vesikellagen erreichen je nach Vesikeltyp und eingesetzter Substratoberfläche Werte von -100 Hz bis zu -150 Hz ([156], Tabelle 3).

Für die hier diskutierten Versuche scheint es somit sehr wahrscheinlich, dass nur ein relativ kleiner Anteil intakter Vesikel vorlag. Ein Auftreten einer vollständig ausgebildeten Vesikelschicht, wie sie für andere Vesikeltypen und Oberflächen beschrieben ist [156], scheint hinsichtlich dieser Literaturwerte, sowie der später besprochenen AFM-Resultate unwahrscheinlich, aber nicht vollständig ausgeschlossen.

Allerdings wäre eine reine Vesikeladsorption mit den hier beschriebenen finalen Werten  $\Delta f$  (-40 Hz) und  $\Delta D$  ( $5,5$  bzw.  $9,5 \cdot e^{-6}$ ) nur dann vereinbar, wenn die Vesikel lediglich partiell an der Oberfläche gebunden waren, also eine nicht geschlossene Vesikel-Schicht mit großen Lücken

zwischen den einzelnen Vesikeln auftrat. Ein solches System hätte eine geringere Masse als eine geschlossene Vesikelschicht[156] und würde auf Grund der vereinzelt flüssigkeitsgefüllten Vesikel eine hohe Trägheit verursachen. Im Falle des Lipidsystems V (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1) hätte eine solche Situation auf Grund der an den Vesikeloberflächen vorliegenden positiven Kopfgruppenladungen der DOTAP-Moleküle resultieren können. Eine Adsorption intakter Vesikel an die nettonegative Siliziumdioxid-Oberfläche wäre demnach erfolgt. Die gebundenen und noch intakten Vesikel hätten sich aber wahrscheinlich untereinander abgestoßen, wodurch eine höhere Vesikel-Dichte an der Oberfläche verhindert worden wäre (Abbildung 45 A).

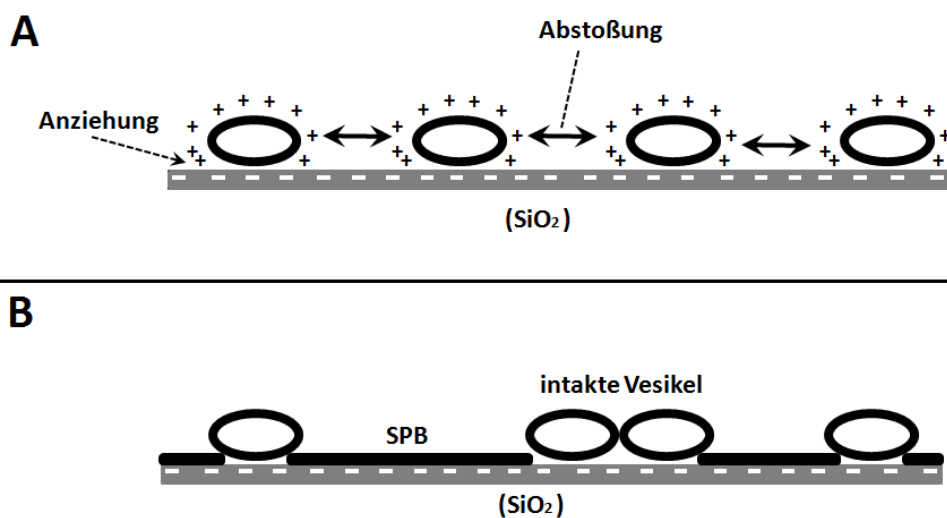


Abbildung 45: Schema zum Adsorptions- und Interaktionsverhalten für Vesikel der Lipidsystem IV (B) und V (A) auf Silizium.

Lipidsystems IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) wies Werte für  $\Delta f$  auf, die mit den für Lipidsystem V erhaltenen gut vergleichbar waren (Abbildung 31 & Abbildung 32). Ein ähnlicher Adsorptions-Prozess scheint abgelaufen zu sein. Durch die negativen Serin-Kopfgruppen erfolgte für System IV per se eine Abstoßung zwischen den Vesikeln und der Siliziumoberfläche, welche durch die zugegebenen bivalenten Ionen, umgangen werden konnte. Allerdings war die Dauer bis zum Erreichen der finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  in diesem Fall, gegenüber den DOTAP-enthaltenden Vesikeln, deutlich erhöht. Dies kann wiederum auf die verbrückende Funktion der zweiwertigen Ionen zurückzuführen sein. Umlagerungsprozesse zwischen den Ionen, den Serin-Kopfgruppen und der Siliziumoberfläche könnten die Ursache für den vergrößerten Zeitraum bis zum Erreichen von  $\Delta f_{\text{final}}$  und  $\Delta D_{\text{final}}$  gewesen sein, da mögliche Umorientierungsprozesse zwischen Vesikeln, bivalenten Ionen und Substratoberfläche eine gewisse Zeit beansprucht haben könnten. Eine Mischform zwischen teilweise ausgebildetem SPB und intakten

oberflächenadsorbierten Vesikeln oder aber eine unvollständige vesikuläre Schicht, scheinen auch hier die bestmögliche Erklärung für die Messwerte zu sein.

Im Gegensatz zu Lipidsystem V (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1) kann aber in diesem Fall eine Abstoßung zwischen oberflächenadsorbierten Vesikeln ausgeschlossen werden, da auf Grund der in der Lösung vorliegenden bivalenten Ionen, keine sich abstoßenden Kopfgruppenladungen vorlagen. Vielmehr kann eine Quervernetzung der oberflächenadsorbierten Vesikel durch die zweiwertigen Ionen vermutet werden. Dadurch könnte eine stabilisierende Wirkung auf die Vesikel ausgeübt worden sein, wodurch diese nur relativ schlecht rupturierten, und somit nur schwer eine Modellmembran ausbilden konnten. Die durchgeführten AFM-Versuche für Lipidsystem IV, wie auch für Lipidsystem V, auf Mica, wiesen aber ebenfalls auf eine oberflächenunterstützte und phasenseparierte Membran hin. In den später besprochenen AFM-Versuchen wurden für beide Systeme (IV & V) phasenseparierte SPBs detektiert. Dies konnte auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. Die nach der Probenpräparation durchgeführten Spülvorgänge der Probenoberflächen können zur Ablösung von Vesikel-Rückständen und/oder zum Aufreißen noch intakter adsorbierter Vesikel geführt haben [60,162], wodurch, quasi nachträglich, aus einer Mischform von SPB und SVL, ein weitgehend reiner SPB ausgebildet wurde. Außerdem war die in der AFM-Zelle verwendete Flüssigkeit, im Gegensatz zur Messkammer der QCM-D, Milli-Q-Wasser und keine Pufferlösung (durch den Einsatz des Milli-Q-Wassers konnte in der Regel ein stabileres AFM-Signal aufrechterhalten werden, als es in Pufferlösung der Fall war). Auf Grund des dadurch vorliegenden osmotischen Gefälles zwischen Vesikel-Innerem (Pufferlösung) und Umgebungsmedium (hochreines Wasser) kann eine Vesikelruptur nachträglich induziert worden sein, wodurch eine vollständigere SPB-Ausbildung stattfand. Auch die bereits erwähnte Interaktion oberflächenadsorbierter Vesikel mit der AFM-Tastspitze konnte dazu beigetragen haben [183,184,185,148].

## **4.2 Untersuchung der SPB-Ausbildung mittels AFM**

Für alle im vorhergehenden Abschnitt besprochenen Phospholipid-Kompositionen wurden AFM-Experimente bezüglich der Ausbildung oberflächenunterstützter Membranen auf Mica und teilweise auch auf Silizium durchgeführt. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse für reine ePC-Vesikel, sowie für die verschiedenen ternären Lipidsysteme diskutiert.

#### 4.2.1 Phospholipidsystem aufgebaut aus ePC

Wie die QCM-D-Experimente zeigten, erfolgte für reine ePC-Vesikel auf Siliziumdioxid eine SPB-Ausbildung, was an Hand der durchgeführten AFM-Versuche bestätigt werden konnte. Sowohl auf Silizium als auch auf Mica konnten oberflächenunterstützte Membranen mit Schichtdicken von ca. 3,5 – 4 nm abgebildet werden (Abbildung 20). Demnach erfolgte die erwartete Umwandlung von der vesikulären Form in Lösung, zu einer flachen und aus einer Lage bestehenden Phospholipidmembran der jeweiligen Substratoberfläche. Die sehr ähnlichen Oberflächeneigenschaften von Mica und Siliziumdioxid, die beide eine nettonegative Oberflächengesamtladung aufweisen [59], unterstützen diese Annahme. In seltenen Fällen wurden Strukturen detektiert, welche sehr wahrscheinlich noch intakte, wenn auch deformierte Vesikel zeigten (nicht dargestellt). Dies war jedoch die Ausnahme und in den meisten Fällen wurden SPBs als dominierende Oberflächenstruktur abgebildet. Diese wiesen teilweise Defekte auf, an denen das Substrat zu sehen war (Abbildung 20 & Abbildung 25). In einem Fall wurden auch Membranstapel abgebildet (Abbildung 21).

Alle erhaltenen Werte für die Schichtdicke solcher Membranen sind gut mit bereits publizierten Resultaten ähnlicher Experimente vergleichbar [186,187,58]. Die teilweise in der Literatur postulierte 1 nm dicke Wasserschicht zwischen oberflächenunterstützter Membran und Substrat konnte nicht eindeutig identifiziert werden [56,57]. Das Auftreten einer solchen Wasserlage hängt wahrscheinlich stark mit der Hydrophobizität der Substratoberfläche ab.

Membranen aufgebaut aus ePC bzw. aus den im natürlichen ePC-Gemisch hauptsächlich vorkommenden Phosphatidylcholin-Varianten POPC und DOPC (Abbildung 23), liegen bei Raumtemperatur in der  $l_d$ -Phase vor [188,189,169,181,172]. Deren ungesättigte Fettsäureschwänze sind dabei relativ ungeordnet und fluide, wodurch eine Deformation durch die AFM-Tastspitze oder das Eindringen der Spitze in die Modellmembran leichter erfolgen kann, als bei Membranen, welche in der  $l_o$ - bzw. der  $s_o$ -Phase vorliegen. Dadurch kann es zu leicht verfälschten Werten der tatsächlichen Schichtdicken kommen, so dass Abweichungen von geschätzten 10 bis 15% auftreten können.

Wie die Abbildung 20 & Abbildung 25 zeigen, waren teilweise Oberflächenbereiche zu sehen, die nicht mit einem SPB bedeckt waren, und an denen das Substrat zu Tage trat. Schichtdicken von Membranen können anhand solcher Defekte gut bestimmt werden [60]. Auftretende Defekte

resultieren aus einem nicht vollständig ausgebildeten SPB. Grund dafür kann eine nicht ausreichend lange Einwirkzeit der Vesikel auf das Substrat oder eine zu geringe Lipid-Konzentration in der Lösung sein, sodass nicht genügend Zeit oder Material zur Verfügung standen, um eine vollständige Oberflächenbelegung zu erzielen. In meinen Versuchen wurde aber immer ausreichend Lipid-Material zugegeben, um die Substratoberflächen ausreichend zu bedecken.

Andererseits sind solche Defekte aber auch für anfänglich vollständig mit einem SPB bedeckte Oberflächenabschnitte beschrieben [59]. Dabei kommt es auf Grund der großen Dynamik der Modellmembran zu Verschiebungen und Umordnungen an der Substratoberfläche. In der Folge werden dann Teile des Substrats freigelegt, die zuvor bereits bedeckt waren. Nach einem gewissen Zeitraum stellt sich aber eine konstante Situation bzw. ein dynamische Gleichgewicht ein, bei dem die Defekte im ausgebildeten SPB stabil bleiben [59]. Möglicherweise ist die Ursache für diesen Vorgang in der über die Zeit auftretenden verbesserten Lipid-Packung bzw. Lipid-Ordnung zu suchen, wodurch weniger Oberfläche in Anspruch genommen wird, als das anfänglich bei der SPB-Ausbildung der Fall war.

Ein einziges Mal zeigten sich die in Abbildung 21 dargestellten Stapelungen von ePC-Membranen. Eine solche Stapelung kann dann auftreten, wenn sich beim SPB-Ausbildungsprozess noch intakte Vesikel an die Ränder bereits ausgebildeter Membranen anlagern, rupturieren und zu einem SPB transformieren. Beim Spreitungsvorgang überlappt dann die neu hinzukommende Membran des rupturierenden Vesikels mit der bereits ausgebildeten oberflächenunterstützten Membran. In der Regel fließen die oben liegenden Membranen aber seitlich zum freien Substrat hin ab und ergänzen die bereits bestehende oberflächenunterstützte Membran in laterale Richtung. Eine zweite Membranlage oder eine Anheftung deformierter Vesikel auf den bereits ausgebildeten SPB, wie es zum Beispiel für Phosphatidylethanolamin-Vesikel (PE) aus Rinder-Hirn beschrieben ist [186], wurde nicht detektiert. Bei langen Inkubationszeiten kann aber möglicherweise auch für ePC-Vesikel eine Situation eintreten, bei der auf Grund einer fast vollständigen Belegung der Oberfläche durch einen SPB, und damit einhergehendem Platzmangel für die neu hinzukommende Membran, das seitliche Abfließen behindert wird, und wodurch Bereiche von Doppel- oder Mehrfachlagen auftreten. Besonders bei sehr langen Inkubationszeiten kann ein solcher Zustand eintreten [190,141]. Hinsichtlich der beschriebenen Ergebnisse und der erfolgreichen SPB-Ausbildung wurde dieser Aufbau für meine weiteren Untersuchungen als geeignet erachtet. An dieser Art

SBP konnten in der Folge dann erste Versuche bezüglich  $\alpha$ -Toxin-Interaktion und Porenbildung durchgeführt werden.

#### 4.2.2 Ternäre, zwitterionische Phospholipidsysteme

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen QCM-D-Experimente zeigten, dass für alle Lipidsysteme, die aus Varianten von Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Cholesterol im Verhältnis 0.35:0.35:0.3 aufgebaut waren (Systeme I – III) prinzipiell eine SPB-Ausbildung auf Silizium stattfand. Weiterführende AFM-Experimente bestätigten diese Ergebnisse. Phasenseparation und somit Domänenbildung konnten in allen Fällen nachgewiesen werden (Abbildung 25 & Abbildung 26).

Lipidsystem I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) wurde in diesem Zusammenhang auf drei verschiedenen Oberflächentypen untersucht. Verwendung fanden dabei Siliziumdioxid, unbehandeltes Mica, sowie APTES-modifiziertes Mica. In allen Fällen wurden SPBs nachgewiesen, die Phasenseparation und somit Domänenbildung zeigten. Die erhaltenen Ergebnisse variierten aber teilweise bezüglich der detektierten Schichtdicken, Anzahl der auftretenden Lipid-Phasen sowie hinsichtlich der Domänenformen.

Auf reinem Mica zeigten sich im Wesentlichen zwei Domänenformen. Diese wiesen Schichtdicken von 3,5 nm und 4,5 nm auf und unterschieden sich somit um 1 nm in ihrer vertikalen Ausdehnung. Durch Vergleiche mit für diese drei Lipid-Komponenten publizierten Phasendiagrammen [169,170,181] wurde die Domänenform mit geringerer Schichtdicke der  $I_d$ -Phase und die Domänenform größerer Schichtdicke der  $I_o$ -Phase zugeordnet. In der  $I_d$ -Phase liegen die beteiligten Phospholipide in einem Zustand größerer Unordnung vor als das für die  $I_o$ -Phase der Fall ist. Auf Grund dieser erhöhten Unordnung sind die Fettsäureschwänze der Phospholipide in der  $I_d$ -Phase deutlich weniger gestreckt, als für die Lipide in der  $I_o$ -Phase. Dadurch entstehen für beide Phasentypen Unterschiede bezüglich der Schichtdicken, bei ähnlicher Länge der Fettsäureschwänze.

Ein Auftreten dieser beiden Lipid-Phasen ist typisch für das eingesetzte Mischverhältnis (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) [169,170,181,172]. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch auf APTES-modifizierten Micaoberflächen abgebildet werden. Auch hier waren zwei Domänenformen zu sehen. Die Höhendifferenz zwischen den beiden Domänenformen betrug

auf APTES-modifiziertem Mica ca. 1,4 nm und war somit Größer als auf nicht modifiziertem Mica (ca. 1 nm). Ähnliche Werte für Höhendifferenzen zwischen Domänen, die in einem vergleichbar zusammengesetzten System auftraten [163,164], sowie denen anderer ternärer Systeme [17,165,161,166,167], waren in der Literatur zu finden. Dabei ist immer zu beachten, dass unterschiedliche Höhendifferenzen, sowie Abweichungen bezüglich der lateralen Ausdehnung der Domänen, innerhalb ein und demselben Lipidsystem auftreten können, was unter anderem mit dem Einsatz von natürlichen und somit oftmals heterogenen Lipid-Gemischen, zusammenhängen kann. So ist in der Literatur eine Gel-Gel-Phasenseparation für Sphingomyeline beschrieben, die auf das Vorkommen unterschiedlicher SM-Komponenten im heterogenen SM-Gemisch aus Rinderhirn zurückzuführen war [142]. Außerdem kann eine solche Varianz bezüglich Form und Dicke der Domänen auch auf unterschiedliche starke Anpressdrücke der AFM-Tastspitze, sowie die Verwendung unterschiedlicher Substrate und Inkubationszeiten, zurückzuführen sein kann. Die in diesem Zusammenhang von mir detektierten Höhendifferenzen von 1 – 1,4 nm waren gut mit den Literaturwerten vereinbar [163,164].

Der dritte Oberflächentyp auf dem SPBs des Lipidsystems I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) ausgebildet wurden war Siliziumdioxid. Im Gegensatz zu den beiden Mica-Substraten traten für diese Art Oberfläche im AFM drei verschiedene Domänenformen auf. Die bereits erwähnten publizierten Phasendiagramme für dieses Phospholipid-Verhältnis zeigten, dass es in der Regel zur Ausbildung von zwei Lipid-Phasen, nämlich der  $l_d$ - und der  $l_o$ -Phase, kommt, wie sie auch von mir für die beiden Micaoberflächentypen detektiert wurden. Die eingesetzte Phospholipid-Mischung (PC:SM:Chol – 0.35:0.35:0.3) lag dabei im Phasendiagramm im Grenzbereich zwischen der Region, in der zwei Phasen auftreten ( $l_d$ ,  $l_o$ -Phase) und der Region mit drei Phasen ( $l_d$ ,  $l_o$ ,  $s_o$ -Phase). Dabei ist zu beachten, dass Phasendiagramme oftmals mit unterschiedlichen Methoden und somit für andere Domänenengrößen, erstellt werden, wodurch es zu Abweichungen kommt.

In einer Publikation von Almeida et al. aus dem Jahre 2003 ist ein Phasendiagramm beschrieben, welches für eine Lipid-Komposition aus POPC, PSM und Cholesterol, die in etwa dem in meinen Experimenten eingesetzten Lipid-Verhältnis entsprach, eine solche Koexistenz dreier Phasen postuliert. Demnach liegt die hier verwendete Komposition (0.35:0.35:0.3) bei 23°C im Grenzbereich zwischen zwei Abschnitten des Phasendiagramms, in denen entweder zwei ( $l_d$ ,  $l_o$ -Phase) oder drei Phasen ( $l_d$ ,  $l_o$ ,  $s_o$ -Phase) nebeneinander existieren können [169]. Eine weitere Publikation aus dem Jahr 2005 beschreibt diesen Drei-Phasen-Zustand für ein solches Lipid-Verhältnis, allerdings in einem allgemeingültigeren Zusammenhang [170]. Anstelle klar definierter Lipid-Komponenten, wie sie von Almeida für POPC, PSM und Cholesterol beschrieben

sind [169], bezieht sich diese Publikation auf ternäre Lipid-Mischungen, die Cholesterol, sowie ein Phospholipid mit hohem ( $T_M$ -high) und ein Phospholipid mit niedrigem Schmelzpunkt ( $T_M$ -low), enthalten [170]. Eine klare Zuordnung zu einem Lipid, welches diese Eigenschaften aufweist wurde hier nicht gemacht.

Neben diesen beiden Veröffentlichungen finden sich publizierte Phasendiagramme für ternäre Lipidsysteme, zusammengesetzt aus PSM und Cholesterol in Verbindung mit DOPC bzw. POPC [181]. Nimmt man diese Veröffentlichung als Grundlage für die hier diskutierten Modellmembranen, würde das in dieser Arbeit eingesetzte Mischverhältnis (PC:SM:Chol – 0.35:0.35:0.3) bei Raumtemperatur (23°C) im Wesentlichen eine Koexistenz zweier flüssiger Lipid-Phasen ( $I_d$  &  $I_o$ -Phase) aufweisen, wie sie von mir auch für die beiden eingesetzten Micaoberflächentypen detektiert wurden. Im Falle der POPC-enthaltenden Variante liegt dieses Mischverhältnis sehr nahe an der Grenzlinie zwischen dem beschriebenen Zustand mit zwei flüssigen Phasen und einer einheitlichen flüssigen Phase [181]. Für die gleichen Mischungen bei 37°C wird dagegen ausschließlich von einer einheitlichen Phase ausgegangen [181]. Je nach eingesetzter Methode unterschieden sich die ermittelten Phasendiagramme also offensichtlich wesentlich. Da meines Wissens nach keine mittels AFM ermittelten Phasendiagramme publiziert wurden, und die beschriebenen Diagramme je nach verwendeter Methode abweichende Ergebnisse lieferten, schien es durchaus möglich, dass für das hier verwendete Lipidsystem, auf Grund der eingesetzten Lipid-Komposition, in der Regel zwei, in manchen Fällen aber auch drei, Phasenzustände auftraten. Diese Situation könnte durch eine heterogene Verteilung der Lipide an der Oberfläche bzw. durch leichte Temperaturschwankungen oder kleinere Abweichungen in der Zusammensetzung begründet werden. Allerdings schien die Variante mit drei Phasen eher die Ausnahme zu sein.

Die Möglichkeit, dass die abweichende Anzahl der Lipid-Phasen auf ein nicht korrektes Mischverhältnis der Phospholipide zurückzuführen war, konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da eine Überprüfung der Lipid-Zusammensetzung der Vesikel mittels Dünnschichtchromatographie erfolgte (Schwiering et al., in Vorbereitung) und die anfänglich eingesetzte Konzentration der ermittelten Konzentration nach der Fertigstellung der Vesikel entsprach. Auch ein möglicher Einfluss der Temperatur kann ausgeschlossen werden, obwohl die Versuche bei Raumtemperatur (ca. 23°C) durchgeführt wurden. Dieser Temperaturbereich liegt weit entfernt von den Schmelzpunkten der eingesetzten Lipid-Komponenten, welche für die in dieser Arbeit eingesetzten Phosphatidylcholine, unterhalb von 4°C und für die verwendeten Sphingomyeline in der Regel über 40°C liegen [191]. Allerdings können keine definitiven

Aussagen zur tatsächlichen Temperatur in der AFM-Messzelle gemacht werden, da keine Temperaturkontrolleinheit für die Zelle vorhanden war.

Alternativ zum Vorkommen dreier unterschiedlicher Lipid-Phasen bestand die Möglichkeit, dass ein Auftreten der drei Domänenformen auf die relativ hohe Varianz hinsichtlich der Länge und des Sättigungsgrades der Fettsäureschwänze der eingesetzten Lipid-Komponenten zurückzuführen war. Für Lipidsystem I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) wurden zwei inhomogene Naturstoffe verwendet, die beide Variationen bezüglich der in ihnen enthaltenen Fettsäureschwänze aufwiesen (ePC, eSM), wobei zu beachten ist, dass die Varianz innerhalb der ePC-Lösung deutlich größer ist als für eSM. Auf Grund dieser Situation bestand die Möglichkeit, dass die drei Domänenformen nicht drei verschiedenen Phasen ( $l_d$ -,  $l_o$ -,  $s_o$ -Phase) zuzuordnen waren, sondern dass lediglich Variationen innerhalb einer Phase auftraten, die auf die unterschiedlichen Kettenlängen der vorliegenden Lipide zurückzuführen waren, und welche dann als zwei unterschiedliche Phasen wahrgenommen wurden. Eine  $l_d$ -Phase, zusammengesetzt aus PC-Molekülen, könnte neben zweier Varianten der  $l_o$ -Phase vorgelegen haben. Mögliche Ursache dafür war die Zusammensetzung des eSM aus den beiden Hauptkomponenten PSM (86%) und SSM (6%), die sich bezüglich ihrer Kettenlänge unterscheiden (PSM (16:0) - SSM (18:0)). Ähnliches wurde auch für eine Gel-Gel-Phasenseparation innerhalb von Sphingomyelin-Domänen der  $s_o$ -Phase beschrieben[142]. Durch Zusammenlagerung von PSM und Cholesterol zum einen, und SSM und Cholesterol zum anderen, könnten demnach zwei Varianten der  $l_o$ -Phasen entstanden sein, die sich lediglich hinsichtlich ihrer Schichtdicke unterschieden. SSM und Cholesterol bildeten auf Grund dieser Argumentationslinie die dickere der beiden  $l_o$ -Phasen, PSM und Cholesterol die dünnere. Eine  $s_o$ -Phase wäre unter diesen Gesichtspunkten nicht aufgetreten.

Wenn der Einsatz eines heterogenen eSM-Gemisches zur Ausbildung zweier unterschiedlicher  $l_o$ -Phasen führte, wäre eine solche Varianz auch hinsichtlich der aus ePC aufgebauten  $l_d$ -Phase denkbar. Die Hauptkomponenten für ePC sind DOPC und POPC, die sich ebenfalls hinsichtlich des Sättigungsgrades und der Länge ihrer angehängten Fettsäureschwänze unterscheiden (DOPC (18:1-18:1), POPC (16:0-18:1) – siehe auch Abbildung 23). Für den hier diskutierten Zusammenhang bestand somit auch die Möglichkeit, dass nur eine der drei detektierten Phasen eine  $l_o$ -Phase darstellte, und die beiden anderen Variationen der  $l_d$ -Phase zuzuordnen waren. Somit hätte nur ein relativ geringer Anteil der abgebildeten Membran in der  $l_o$ -Phase vorgelegen. Für diese Interpretation muss immer vorausgesetzt werden, dass die abgebildete Substratoberfläche repräsentativ für die Gesamtoberfläche war. Diese Begründung erscheint

aber wegen zweier Sachverhalte eher zweifelhaft. Zum einen war es sehr unwahrscheinlich, dass bei drei verwendeten Lipid-Bestandteilen, die alle ca. ein Drittel der Gesamt-Lipid-Menge ausmachten, eine dieser Komponenten den größten Teil der Modellmembran aufbaute. Zum anderen war davon auszugehen, dass eine Variation der Länge ungesättigter Fettsäureschwänze weniger ins Gewicht gefallen wäre als für gesättigte Fettsäureketten, wie sie z.B. für die SM-Bestandteile auftreten. Dies begründet sich dadurch, dass die ungesättigten Fettsäureketten der PC-Moleküle bei Raumtemperatur in der  $l_d$ -Phase vorlagen, dabei die trans-Konformation einnahmen [192] und sich auf Grund dessen besser aneinander anpassen konnten bzw. einen geringeren Widerstand gegenüber der AFM-Tastspitze aufbauten und dadurch homogener erschienen. Bei verbesserter vertikaler Auflösung wären für eine solche Lipid-Komposition möglicherweise vier Phasen zu erkennen gewesen.

Um das Phänomen der drei Phasen weiter einordnen und erklären zu können, wurden die Lipidsysteme II (DOPC:PM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) verwendet, die an Stelle der aus Eidotter gewonnenen Naturstoffe (ePC, eSM) des Lipidsystems I, die entsprechenden Hauptkomponenten (DOPC & POPC bzw. PSM) als reine Stoffe enthielten. Diesbezüglich durchgeführte AFM-Experimente zeigten ebenfalls phasenseparierte SPBs auf verschiedenen Substraten (Siliziumdioxid, Mica). Im Gegensatz zu System I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) traten allerdings auch auf Silizium jeweils nur zwei Domänen-Formen auf, welche der  $l_d$ -Phase und der  $l_o$ -Phase zugeordnet werden konnten [193,169,192,181].

Weiterhin war in diesem Zusammenhang auffällig, dass sich die der  $l_o$ -Phase zugeordneten Domänen für die Systeme II und III hinsichtlich ihres Höhenprofils sehr homogen darstellten, was möglicherweise auf die definierten Kettenlängen von DOPC und POPC, bzw. PSM, im Gegensatz zu ePC und eSM, zurückzuführen war.

Detektierte Höhenunterschiede zwischen den auftretenden Phasen ( $l_d$ - &  $l_o$ -Phase) der Lipidsysteme II und III auf Silizium (Tabelle 9) betragen für System II ca. 1,0 bis 1,2 nm, für System III von ca. 1,4 nm (Abbildung 26). System I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) auf Silizium wies demgegenüber die drei weiter oben diskutierten Domänenformen auf, deren Höhendifferenzen bei ca. 1,2 und 1,4 nm lagen. Diese Beobachtungen unterstützten die Vermutung, dass die für einen SPB der Lipid-Komposition ePC:eSM:Chol (0.35:0.35:0.3) auf Silizium auftretenden drei Domänenformen, auf die ungleichen Kettenlängen der Fettsäureschwänze zurückzuführen waren. In diesem Zusammenhang könnten dann entweder

die Unterschiede hinsichtlich der Fettsäureschwänze zwischen DOPC und POPC bzw. die Unterschiede zwischen PSM und SSM, die für die Naturstoffe ePC bzw. eSM auftraten, eine Rolle gespielt haben. Der Einfluss von SSM auf die Domänenbildung wurde hier allerdings nicht untersucht, weswegen dazu keine konkreten Aussagen gemacht werden können. Außerdem nimmt dieses Lipid nur einen kleinen Anteil (6%) der Gesamt-Sphingomyelin-Menge ein, wodurch dieser Einfluss vernachlässigbar erschien.

Da in der Literatur keine Untersuchungen gefunden wurden, die sich mit der Phasenseparation von SPBs, ausschließlich hergestellt aus Naturstoffen beschäftigen, sondern nur Ergebnisse bezüglich des Einsatzes der Varianten POPC:PSM:Chol bzw. DOPC:PSM:Chol vorlagen [168,169,172,181,60,194], bleibt die Frage offen, warum die drei Domänenformen lediglich für Lipidsystem I auf Silizium auftraten, und alle anderen Untersuchungen mit den Lipidsystemen I - III auf verschiedenen Oberflächen lediglich zwei Domänenformen zeigten.

Ein weiterer Unterschied, der zwischen den Systemen I - III auftrat war, die laterale Ausdehnung der ausgebildeten Domänen. Während für System I eine eher runde Domänenform zu sehen war, zeigten die Systeme II (DOPC:PM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PM:Chol - 0.35:0.35:0.3) eher netzartig ausgebildete Domänen. Abbildung 26 verdeutlicht diese Unterschiede. Wiederum sind verschiedene Ursachen für diese Varianz denkbar. Aus der Literatur geht hervor, dass eine netzartige Domänen-Struktur eher für Lipide in der  $I_o$ -Phase spricht, wogegen rundliche Strukturen bevorzugt für die  $s_o$ -Phase auftreten [168]. Ein weiterer Faktor kann der variable Zeitraum sein, der zwischen Präparation und Untersuchung der Modellmembranen lag. Durch Diffusionsprozesse der Phospholipide in der Ebene der Membran könnten sich größere Mengen an „phasengleichen“ Lipiden zusammengelagert haben. Auffällig dabei sind die in Abbildung 26 dargestellten deutlich stärker vernetzten Bereiche der geordneten Phase (hellere Abschnitte), die für die Lipidsysteme II und III, im Vergleich zu System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) auftraten. Auch in Abbildung 25, welche SPBs des System I auf variierenden Oberflächentypen im Vergleich zeigt, ist die deutlich weniger vernetzte Domänenstruktur gut zu sehen.

Ergänzende fluoreszenzmikroskopische Versuche an GUVs, ebenfalls hergestellt aus den Systemen I – III, zeigten leicht abweichende Ergebnisse gegenüber den SPBs. Für System I und II traten ebenfalls Domänen auf (Abbildung 28), die der  $I_r$  und der  $I_o$ -Phase entsprachen [169,172,181,173,194]. GUVs des Lipidsystems III wiesen im Gegensatz dazu keine Domänen auf. Dieses Phänomen war für ähnliche Lipid-Mischungen [173] bereits in der Literatur beschrieben.

Auch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung einer oberflächenunterstützten Modellmembran des Lipidsystems I auf Glas wies Strukturen auf, welche das Bild einer phasenseparierten Membran weiter stützten (Abbildung 29). Dunkle Bereiche in der Abbildung waren demnach der  $I_o$ -Phase, reich an Sphingomyelin und Cholesterol, zuzuordnen, wohingegen die rot erscheinenden Abschnitte der  $I_d$ -Phase, hauptsächlich aufgebaut aus Phosphatidylcholin, entsprachen. Zu beachten ist hierbei, dass der betrachtete Oberflächenbereich im Fluoreszenzmikroskop deutlich größer ausfällt als dies im AFM der Fall war. Dadurch waren möglicherweise manche Unterstrukturen mit AFM detektierbar, mittels Fluoreszenzmikroskopie allerdings nicht. Dieses Ergebnis ist demnach relativ gut mit den Resultaten der AFM-Versuche vereinbar. Wie die hellroten und relativ kleinen Punkte innerhalb des SPB (schwarz-weiße Pfeile Abbildung 29) zu erklären sind, ist nicht klar. Eventuell handelte es sich dabei um Anreicherungen des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes, der an diesen Stellen akkumulierte. Phasenseparation und damit einhergehende Domänenbildung fanden aber statt.

Die beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der ternären Lipidsysteme I - III, aufgebaut aus Varianten von PC:SM:Chol im Verhältnis 0.35:0.35:0.3, wiesen in allen Fällen Domänen auf, und die für meine weiteren Experimente wichtige Phasenseparation zwischen  $I_d$ - und  $I_o$ -Phase trat auf. Angestrebte Untersuchungen hinsichtlich der Ko-Lokalisation von  $\alpha$ -Toxinen aus *Staphylococcus aureus* mit der Raft-artigen  $I_o$ -Phase (SM & Chol) konnten somit prinzipiell an allen drei hier dargestellten ternären Lipidsystem-Varianten vollzogen werden. Durchgeführt wurden die Ko-Lokalisations-Experimente in der Folge an SPBs des Lipidsystem I auf Mica als Support. Grund für den Einsatz dieses Versuchsaufbaus waren die gute Reproduzierbarkeit auf Mica, die relativ einfache Aufbereitung dieses Oberflächenmaterials im Gegensatz zu den anderen Oberflächentypen, sowie der relativ geringe Kostenfaktor für die natürlichen Gemische ePC und eSM. Außerdem konnten die Domänen der auf Mica ausgebildeten SPBs eindeutig bestimmten Lipid-Phasen zugeordnet werden, was für das gleiche System auf Siliziumdioxid nicht der Fall war.

#### 4.2.3 Ternäre, geladene Phospholipidsysteme

Das für Lipidsystem IV (DOPS:PSM:Chol – 2:1:1) mittels QCM-D detektierte Adsorptionsverhaltens wurde als eine Mischform aus noch intakten Vesikeln und

oberflächenunterstützten Modellmembran-Bereichen interpretiert. Die diesbezüglich durchgeführten AFM-Experimente bestätigen diese Vermutung nicht. Vielmehr wurden auf Mica für die untersuchten Bereiche lediglich oberflächenunterstützte Modellmembranen detektiert. Rückstände intakter Vesikel waren dabei nicht zu sehen, Phasenseparation und somit Domänenbildung traten dagegen auf.

Wie Abbildung 34 zeigt, wurden SPBs abgebildet, die zwei Domänenformen aufwiesen. Diese unterscheiden sich in ihren Schichtdicken, wobei die Differenz zwischen 1,1 bis 1,4 nm variierte. Dabei konnten Domänen mit geringerer vertikaler Ausdehnung der  $I_d$ -Phase, im Wesentlichen zusammengesetzt aus DOPS, zugeordnet werden [187]. Die zweite Domänenform entspricht der  $I_o$ -Phase und setzt sich hauptsächlich aus PSM und Cholesterol zusammen. Auf Grund der im Puffer enthaltenen  $Ca^{2+}$ -Ionen kommt es wahrscheinlich zum Auftreten flüssig-geordneter Bereiche in der Größenordnung von Nanometern bis Mikrometern, wie es auch für die Lipid-Komposition DOPS/DPPC in der Literatur beschrieben ist [187]. Wie diese Publikation beschreibt, bildeten sich auf Grund der vorliegenden bivalenten Ionen kleinere, gut definierte Bereiche der  $I_o$ -Phase aus, wohingegen ohne die bivalenten Ionen größere zusammenhängende Bereiche auftraten. Modellmembranen aus DOPS/DPPC zeigten Höhenunterschiede zwischen Domänen der  $I_d$ - und  $I_o$ -Phase von ca. 1 nm [187]. Dieser Wert kommt den von mir aufgezeigten Höhendifferenzen relativ nahe. Grund für die Differenzen zwischen Literaturwerten (1 nm) und den von mir gemessenen Werten (1,1 – 1,4 nm) können u.a. auf die unterschiedlichen eingesetzten Lipid-Komponenten (DPPC vs. SM/Chol.) oder auf den Anpressdruck der AFM-Tastspitze und einer damit einhergehenden Stauchung der Membranen zurückzuführen sein.

Für Lipidsystem V (DOTAP:PSM:Chol - 1:1:1) war auf Grund der QCM-D-Resultate ebenfalls eine Mischform aus intakten, oberflächenadsorbierten Vesikeln und oberflächenunterstützter Membran angenommen worden. Allerdings bestätigten die AFM-Versuche auch in diesem Fall die Vermutung nicht. Abbildung 33 zeigt für dieses Lipidsystem auf Mica eine oberflächenunterstützte, phasenseparierte Membran, die zwei Domänenformen mit Höhenunterschieden von 1,2 bis 1,4 nm aufweist. Phasenseparation trat also auch für dieses Lipidsystem auf. Die beiden Domänenformen waren ebenfalls der  $I_d$ -Phase und der  $I_o$ -Phase zuzuordnen. Domänen mit geringerer vertikaler Ausdehnung entsprechen auch in diesem Fall dem Lipid mit dem niedrigsten Schmelzpunkt (DOTAP), welches bei Raumtemperatur in der  $I_d$ -Phase vorliegt [195]. Domänen größerer Schichtdicke lagen, wie auch für alle anderen hier besprochenen ternären Systeme, in der  $I_o$ -Phase vor und setzten sich aus SM und Cholesterol zusammen.

Beide hier diskutierten Lipidsysteme (IV & V) zeigten somit Phasenseparation und waren prinzipiell geeignet für weiterführende Untersuchungen mit AFM bezüglich der Ko-Lokalisation von  $\alpha$ -Toxin-Molekülen mit oberflächenunterstützten Modellmembranen. Die Tatsache, dass keine intakten oberflächenadsorbierten Vesikel an der Substratoberfläche zu finden waren, wie auf Grund der QCM-D-Resultate vermutet wurde, konnte auf die mehrfache Spülung mit Puffer nach der SPB-Ausbildung und vor dem Einbau in die Messkammer des AFM zurückgeführt werden. Außerdem kann ein Aufplatzen der Vesikel durch die Verwendung hochreinen Wassers in der AFM-Zelle, und dem damit einhergehenden osmotischen Schock, erfolgt sein [156].

### **4.3 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit homogenen und phasenseparierten SPBs**

Die Interaktion des  $\alpha$ -Toxins mit oberflächenunterstützten Modellmembranen wurde für phasengleiche (ePC-System) und phasenseparierende (ternäre Systeme I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) und IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1)) Lipidsysteme mittels AFM untersucht. Dabei sollten zunächst Kontrollexperimente bezüglich der Porenbildung an einem homogenen, in einer Lipid-Phase vorliegenden, SPB durchgeführt werden. In der Folge wurde dann die Toxin-Interaktion mit phasenseparierten ternären SPBs überprüft, wodurch Resultate bezüglich einer bevorzugten Interaktion des Toxins mit Raft-artigen Membranabschnitten ( $l_o$ -Phase), gegenüber umliegenden Abschnitten der  $l_d$ -Phase, erzielt werden konnten.

#### ***4.3.1.1 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit homogenen ePC-Membranen***

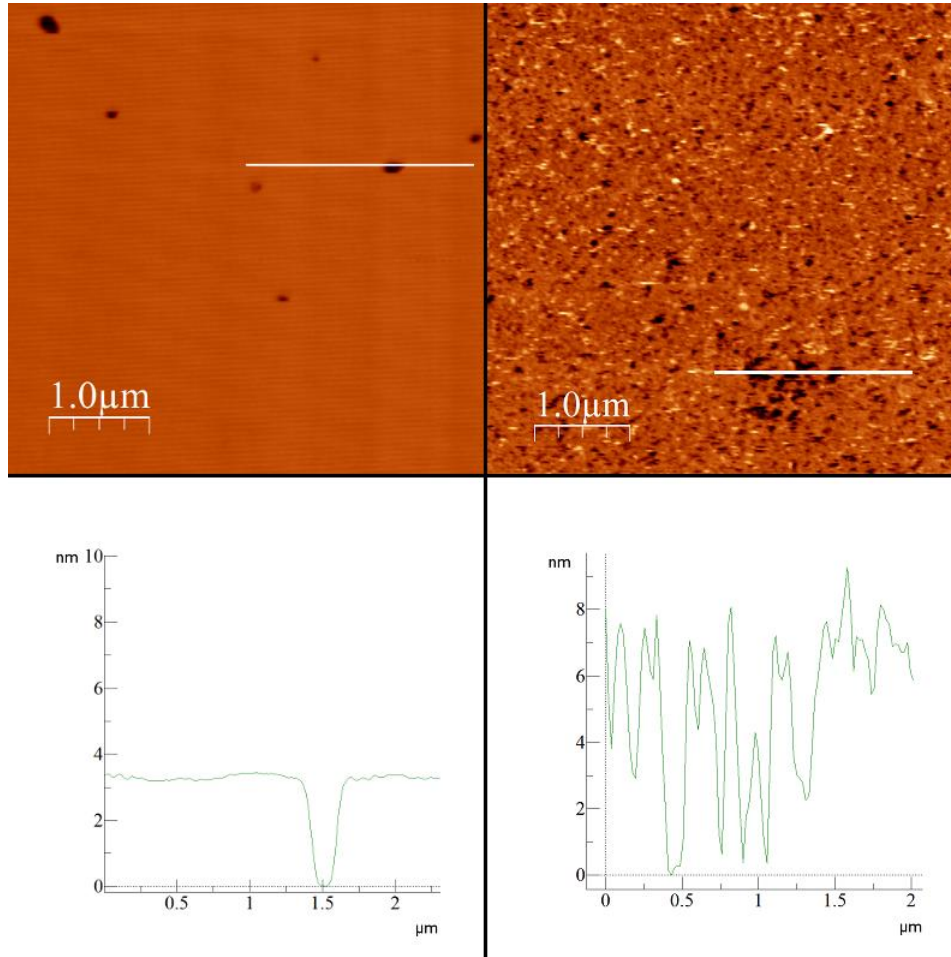
An SPBs, die lediglich aus ePC-Molekülen aufgebaut waren, und bei Raumtemperatur in einer homogenen  $l_d$ -Phase vorlagen, konnte eine deutliche strukturelle Veränderung der Membranoberfläche nach Toxin-Zugabe, gegenüber unbehandelten Modellmembranen gleichen Aufbaus, gezeigt werden (Abbildung 46). Die auftretende Strukturierung erfolgte relativ homogen über die gesamten abgetasteten Oberflächenbereiche. Da das gleiche System ohne Toxin-Zugabe eine ebene und homogene Oberfläche aufwies, konnten die Strukturierungen eindeutig auf die Interaktion der Modellmembran mit dem  $\alpha$ -Toxin zurückgeführt werden.

Sowohl auf Mica, als auch auf Silizium als unterstützendes Oberflächenmaterial konnten rundliche Strukturen abgebildet werden, die für die Ausbildung von  $\alpha$ -Toxin-Poren bzw. deren Porenvorstufen sprachen (Abbildung 35 & Abbildung 36).

Für ausgebildete SPBs konnten die erwarteten Stufenkanten zwischen Membran- und Substratoberfläche von ca. 3,5 bis 4 nm dargestellt werden. Ansonsten waren die detektierten Oberflächenprofile sehr homogen und unstrukturiert, wie es für eine ausgebildete Modellmembran, die nur eine Lipid-Phase aufweist, zu erwarten war. Abbildungen von reinen Micaoberflächen nach Interaktion mit den Toxin-Monomeren und ohne vorherige Ausbildung eines SPBs zeigten zwar eine Strukturierung durch das Protein, allerdings waren diese gleichmäßig verteilt und zeigten keine Höhendifferenzen, die für einen zuvor ausgebildeten SPB sprachen. Vertikale Spitzenwerte von maximal ca. 3 nm traten auf (Abbildung 44). Eine deutliche und relativ gleichmäßige Strukturierung der Micaoberfläche durch die Toxine war zu sehen. Die erhaltenen Oberflächenprofile, sowie die Art der Strukturierung, unterschieden sich dabei deutlich von den Versuchen, bei denen die Toxin-Zugabe zu einem zuvor ausgebildeten SPB erfolgte (Abbildung 35 & Abbildung 36). Da davon ausgegangen werden muss, dass auf reinem Mica weitestgehend keine Oligomerisierung bzw. Heptamerisierung der  $\alpha$ -Toxine stattfand, mussten die abgebildeten Strukturen weitestgehend auf Toxin-Monomere zurückzuführen sein. Toxin-Monomere weisen dabei Dimensionen von ca. 5 nm in der „Höhe“ und 3 nm in der „Breite“ auf. Wird angenommen, dass die Monomere flach am Substrat angelagert waren, also auf der Oberfläche lagen, ist die detektierte Höhe von ca. 3 nm Ausdehnung gut mit diesen Maßen vereinbar.

Für Versuche, bei denen vor der Toxin-Zugabe ein SPB ausgebildet wurde, konnten immer wieder Höhenprofile detektiert werden, die Stufenkanten von ca. 4 nm und ca. 8 nm zum Substrat hin aufwiesen. Diese Werte passen gut zu den Werten, die in der Literatur für das Ausmaß eines SPBs [159,158,17] bzw. für einen SPB mit integrierter  $\alpha$ -Toxin-Pore, beschrieben sind [159,175,31]. Die Stufenkanten von ca. 4 nm sind dabei auf Defekte in der Membran zurückzuführen [159]. Im Falle der Erhebungen von ca. 8 nm über die Substratoberfläche überragt die integrierte Pore oder deren Vorstufe, die ausgebildete Modellmembran um weitere 4 nm [159,31]. Da solche Werte für unbehandelte Micaoberflächen nach Toxin-Zugabe nicht auftraten, konnte davon ausgegangen werden, dass für die hier besprochenen Versuche eine Toxin-Interaktion und auch eine Porenausbildung an ePC-Membranen stattfand. Die laterale Ausdehnung der auf den SPBs detektierten Strukturen lag im Bereich zwischen 10 und 20 nm

und passte somit relativ gut zu aus der Literatur bekannten Werten für den Porendurchmesser [159,175,31].



**Abbildung 46: Vergleich von SPBs hergestellt aus ePC auf Mica, vor (links) und nach Interaktion mit dem  $\alpha$ -Toxin.** Eine starke Strukturierung der Oberfläche der Membran nach Zugabe des Toxins ist erkennbar (rechts).

Abbildung 36 zeigt weiterhin eine vergrößerte Darstellung einer solchen rundlichen Struktur, die eine kleine zentrale Einstülpung aufweist. Deren Durchmesser beträgt ca. 4 nm, was wiederum sehr gut zu den Literaturwerten bezüglich des zentralen Porenkanals passt [31]. Der Außendurchmesser der ausgebildeten Struktur beträgt in diesem Fall 10 nm, was exakt dem Wert entspricht, der auch von Song et al 1996 anhand der Röntgenkristallstruktur der heptameren Toxin-Pore publiziert wurde [31]. Verbreiterte Varianten, die in meinen Messungen auftraten (Abbildung 36) und eine Ausdehnung von ca. 15 bis 20 nm zeigten, könnten dagegen möglicherweise der Porenvorstufe zuzuordnen sein. Moleküldynamische Simulationen, die im Rahmen eines Fortgeschrittenen-Praktikums in unserem Institut durchgeführt wurden, zeigten

Hinweise auf einen Zwischenzustand im Verlauf des Integrationsprozesses, bei dem eine der Porenvorstufen einen Durchmesser von eben 15-20 nm ausbildete. So könnte es sich bei den mit AFM abgebildeten Strukturen um Porenvorstufen handeln. Allerdings waren in der Literatur auch Hinweise darauf zu finden, dass Porenvorstufen nur einen Außendurchmesser von ca. 10 – 11 nm erreichen [175,196], und somit der eigentlichen Pore sehr ähnlich sind. Sollte dies der Fall sein, wäre die wahrscheinlichste Erklärung für die vergrößerte Struktur die Verfälschung der tatsächlichen Werte durch die AFM-Tastspitze. In diesem Zusammenhang würde die abgebildete Struktur auf Grund der Dimension der Spitze leicht verbreitert erscheinen [176,175] und es hätte eine reguläre Pore oder eine Präpore vorgelegen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier erreichte laterale Auflösung insgesamt zwar etwas schlechter ausfiel als es für bereits publizierte Ergebnisse zu diesem Thema der Fall [159,175] war, allerdings wurden alle wesentlichen Parameter detektiert. Eine mit den Literaturwerten gut vereinbare SPB-Schichtdicke von ca. 4 nm konnte ebenso gezeigt werden, wie eine Porenbreite von ca. 10 nm [159,175,31] und eine Erhebung der Pore über die Membranoberfläche von ca. 4 – 5 nm [159,31]. Außerdem waren deutlich rundliche Strukturierungen zu erkennen, die ebenfalls einer Pore oder deren vollständig oligomerisierter Vorstufe, zugeordnet werden konnten. Auf Grund dessen musste im Hinblick auf die angestrebte Darstellung einer Ko-Lokalisation zwischen  $\alpha$ -Toxin und bestimmten Raft-artigen Domänen, nicht zwingend eine besser aufgelöste Darstellung der Porenfeinstruktur erreicht werden.

Die abweichenden Dimensionen meiner Abbildungen gegenüber den Literaturwerten können weiterhin auf einen variierenden Anpressdruck und eine damit einhergehende verbreiterte Darstellung der Oberflächenstrukturen zurückzuführen sein [175,176]. Dagegen ist es weitgehend auszuschließen, dass dieses Phänomen auf eine Hydrathülle zurückzuführen ist, die sich auf der Probenoberfläche bzw. an der AFM-Tastspitze auf Grund hoher Ionenstärken der eingesetzten Pufferlösungen gebildet hatte [197,198]. In der Regel wurde in meinen Experimenten Milli-Q-Wasser verwendet, welches frei von Ionen war.

Meines Wissens wurden somit bis heute die besten Auflösungen und Darstellungen der  $\alpha$ -Toxin-Pore mittels AFM von Fang und Czajkowsky beschrieben [159,175]. Diese Publikationen zeigten zum ersten Mal gut aufgelöste  $\alpha$ -Toxin-Poren im AFM-Abbildungsmodus [159,175]. Dabei konnte sowohl die Wildtypvariante [159], als auch eine Mutante [175] abgebildet werden. Für die Mutante war es dabei möglich, sie in einem Präporen-Zustand „einzufangen“ und die finale

Porenintegration zu blockieren. Der in dieser Veröffentlichung angegebene Durchmesser für die Präpore liegt bei ca. 9,5 nm [175]. Durch diese Versuche gelang es die Dimensionen und den Oligomerisierungsgrad der Pore bzw. der Präpore zu untersuchen und ergänzende Resultate zur Röntgenstruktur von Song et al [31] zu liefern. Czajkowsky detektierte, im Gegensatz zu Fang, verstärkt die Hexamere Form des Oligomers, und kam dabei zu dem Schluss, dass die Pore wahrscheinlich in zwei verschiedenen oligomeren Zuständen, nämlich als Hexamer bzw. Heptamer, auftreten kann [159,175]. Außerdem konnten unvollständig oligomerisierte Porenformen aufgezeigt werden, denen eine mögliche Rolle im Prozess der Zerstörung der Zielzelle zugesprochen wurde. Eine weitere Publikation, die eine solche Darstellung der Toxin-Pore zeigt, erreichte ebenfalls nicht ganz die zuvor beschriebene Qualität in der Auflösung und konnte auch lediglich wenige Poren mittels AFM in einer POPC-Modellmembran abbilden [199]. Untersuchungen zur Interaktion der  $\alpha$ -Toxine mit phasenseparierten Membranen wurden in diesen Veröffentlichungen nicht gezeigt.

#### ***4.3.1.2 Co-Lokalisation des $\alpha$ -Toxins mit Raft-artigen Domänen phasenseparierter SPBs***

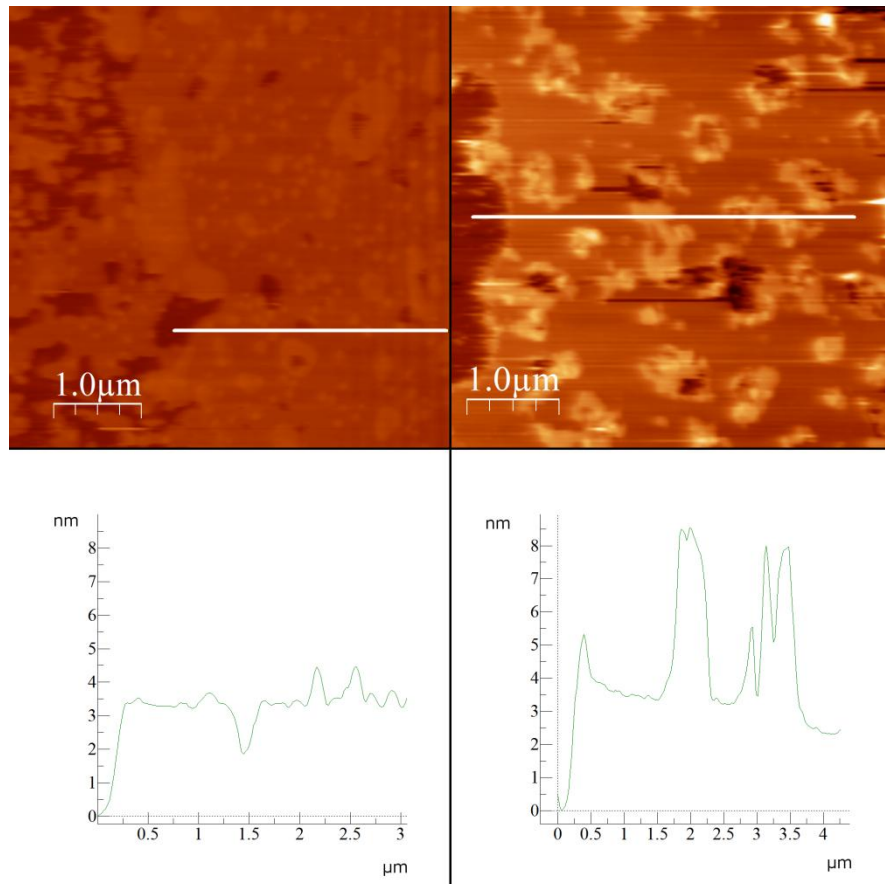
Experimente zur Überprüfung der postulierten bevorzugten Interaktion und Oligomerisierung der  $\alpha$ -Toxin-Moleküle an speziellen, Raft-artigen Abschnitten der Membran [2], angereichert mit Sphingomyelin und Cholesterol, wurden an den ternären Lipidsystemen I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) durchgeführt. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden eingesetzten Systemen lag darin, dass für System I beide auftretenden Domänenformen ( $I_o$ - und  $I_o$ -Phase) Phosphocholin als Kopfgruppen anboten, und diese sich (u.a.) hinsichtlich der lateralen Dichte der Kopfgruppen unterschieden, für System IV jedoch nur die in der  $I_o$ -Phase vorliegenden Raft-artigen Domänen die entsprechende Kopfgruppen aufwiesen. Da Phosphocholin als Bindestelle für die  $\alpha$ -Toxin-Monomere postuliert wird [39], sollte auf diese Weise ein direkter Vergleich der Toxin-Interaktion zwischen Membranbereichen unterschiedlicher struktureller Zusammenlagerung und mit hoher und niedriger Phosphocholin-Packungsdichte, ermöglicht werden. Die verwendete Toxin-Konzentration lag für System I bei 150 nM und für System IV bei 20 nM.

#### 4.3.1.2.1 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit zwitterionischen Lipidsystemen

Abbildung 37 & Abbildung 38 zeigen die Resultate für das ternäre System I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) auf Silizium bzw. Mica. Auf Silizium konnten nach der Toxin-Interaktion AFM-Abbildungen gemacht werden, die ähnliche vertikale Dimensionen im Höhenprofil aufwiesen wie die zuvor besprochenen Versuche für eine Toxin-Interaktion mit reinen ePC-Membranen. Stufenkanten von ca. 4 - 5 nm und 10 nm zur Substratoberfläche traten auf (Abbildung 37). Diese waren den SPBs, sowie den aus dem SPBs herausragenden Toxin-Poren oder Toxin-Oligomeren, zuzuordnen. Die entscheidende Beobachtung war hierbei, dass die strukturierten Membranbereiche räumlich begrenzt auftraten. Abbildung 37 zeigt vornehmlich begrenzte, rundliche Areale, die eine starke Strukturierung aufwiesen (Abbildung 37 - links), aber auch solche Abschnitte, die keinerlei Strukturierung zeigten. Dies spricht für eine bevorzugte Interaktion und evtl. auch Integration der  $\alpha$ -Toxine an räumlich definierten Abschnitten des ternären SPBs. Dazu kann es auf Grund der erhöhten Dichte an Phosphocholin-Kopfgruppen der in der  $I_o$ -Phase vorliegenden Raft-artigen Domänen (SM/Chol) gegenüber den Domänen der  $I_d$ -Phase (PC) kommen. Weitere strukturelle Faktoren wie die erhöhte Schichtdicke und laterale Moleküldichte der  $I_o$ -Phase, können in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Rolle spielen, so vor allem die bei der SM-Cholesterol-Interaktion auftretende verkippte Orientierung der Phosphocholin-Kopfgruppe [40].

Auch bei der Verwendung von Mica zeigten nur Teile der dargestellten Oberfläche rundliche Strukturen, die teilweise kettenartig zusammengelagert erschienen. Diese Ketten traten an Bereichen auf, die gegenüber den umliegenden Abschnitten der untersuchten Membranoberfläche um ca. 1 nm erhöht waren (schwarze Pfeile im Höhenprofil der Abbildung 38 links & Mitte): Ein Wert, der sehr gut mit den Höhendifferenzen vereinbar ist, die zwischen den Domänen des Systems I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) auf Mica auftraten (Abbildung 48). Aus den erhöhten Bereichen ragten die Strukturen um weitere 2-3 nm heraus (Abbildung 38 rechts). Auf Grund dieser geringen Werte musste in Betracht gezogen werden, dass in diesem Fall keine Porenbildung erfolgte, sondern dass es sich um Zusammenlagerungen des Toxins handelte, die einer möglichen Porenvorstufe oder einem Zwischenzustand auf dem Weg zur fertigen Pore zuzuordnen waren. Wären finale Poren ausgebildet worden, hätten Erhebungen

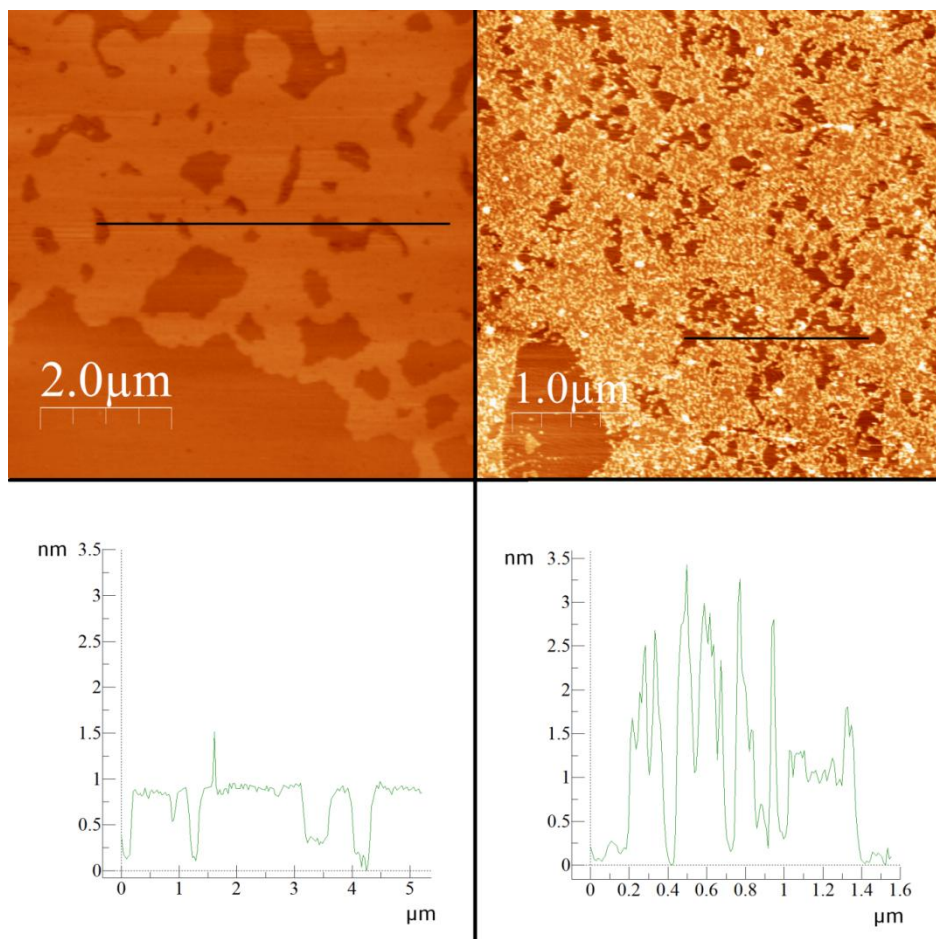
von 4-5 nm über die Membranebene auftreten müssen, wie sie zum Beispiel für phasengleiche SPBs auf Silizium als Substrat detektiert wurden [175,159].



**Abbildung 47:** Vergleichende Darstellung eines SPBs aus Lipidsystem I auf Silizium, vor (links) und nach Interaktion mit dem  $\alpha$ -Toxin [150 nM]. Nach Toxin-Zugabe sind deutliche Strukturierungen und Erhöhungen innerhalb des SPBs zu erkennen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen aber eine klare Tendenz, dass eine präferierte Interaktion der Toxin-Moleküle mit den Raft-artigen Domänen erfolgte. Nicht ausreichend geklärt ist in diesem Zusammenhang aber, ob die Integration der Poren gleichmäßig im Bereich dieser Domänen stattfand oder ob der Prozess vor allem an den Domänenrändern erfolgte bzw. begann, wie es zum Beispiel für Equina-Toxin beschrieben wurde [200]. Hinweise darauf zeigten die beschriebenen Versuche zur Toxin-Interaktion mit Lipidsystem I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) auf Silizium, bei denen Anreicherungen oder Aggregationen von Toxinen entlang rundlicher Membranabschnitte zu sehen waren (Abbildung 47 & Abbildung 48).

Somit scheint es möglich, dass eine Bindung der Toxin-Monomere und deren „Findungsprozess“ an der gesamten Oberfläche der präferierten Raft-artigen Domänen gleichermaßen stattfanden. Die gebundenen Toxine konnten dann an der Oberfläche der Membran entlangwandern, bevor eine Koformationsänderung zur fertigen Pore, und damit einhergehend eine Einstülpung und Integration in die Membran, erfolgte. Auf Grund des erhöhten räumlichen Freiraums an den Domänenrändern, bedingt durch eine erhöhte Unordnung der Lipide [200], könnte eine bevorzugte bzw. verbesserte Insertion an diesen Bereichen erfolgt sein. Da dieser Prozess aber nicht klar und eindeutig alleine den Randbereichen der Domänen zuzuordnen war, musste auch in Erwägung gezogen werden, dass die Integration unmittelbar nach „Fertigstellung“ des finalen Oligomerisierungsschrittes und unabhängig von der Lipid-Ordnung im gesamten Bereich der Raft-artigen Domäne, eintreten konnte.



**Abbildung 48:** Vergleichende Darstellung eines SPBs aus Lipidsystem I auf Mica, vor (links) und nach Interaktion mit dem  $\alpha$ -Toxin [150 nM]. Nach Toxin-Zugabe sind auch hier deutliche Strukturierungen und Erhöhungen innerhalb des SPBs zu erkennen.

Separat präparierte und untersuchte Modellsysteme dieser Zusammensetzung ( ternärer SPB Typ I auf Mica als Substrat nach Interaktion mit Toxin-Monomeren) wurden zusätzlich mittels SDS-Behandlung auf ausgebildete Toxin-Poren untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse (Abbildung 39) zeigten dabei, dass eine Ausbildung finaler Poren an diesem Oberflächentyp stattgefunden hatte. In den SDS-Gelen waren sowohl die monomere Form des Toxins, als auch die Porenform zu finden. Wäre keine Porenausbildung erfolgt, hätten ausschließlich Proteinbanden für die monomere Toxin-Form vorliegen müssen, da alle Oligomerisations-Stufen, die vor der Ausbildung der finalen Pore entstehen, durch die SDS-Behandlung wieder in Monomere zerlegt worden wären.

Dieses Resultat war nicht vollständig mit den besprochenen Ergebnissen auf Mica zur Deckung zu bringen. In den AFM-Aufnahmen sah es so aus, als wären Porenvorstufen oder andere Zwischenzustände an den Raft-artigen Domänen ausgebildet worden. Somit scheint sich die Vermutung zu bestätigen, dass wegen des Anpressdrucks der AFM-Tastspitze eine verringerte vertikale Ausdehnung im Höhenprofil impliziert wurde, die tatsächlich aber gar nicht vorlag. Dabei könnten sowohl die Werte für die Höhenunterschiede zwischen den Domänen, als auch die Werte für die aus der Membranoberfläche herausragenden Toxin- oder Poren-Strukturen gegenüber den tatsächlichen Werten leicht verringert ausfallen.

Die unstrukturierten Oberflächenbereiche wurden anhand der bisher beschriebenen Resultate Domänen der  $I_d$ -Phase, also hauptsächlich aus ePC-Molekülen zusammengesetzten Bereichen, zugeordnet. Dass es sich um Mica ohne ausgebildeten SPB handelte, kann weitgehend ausgeschlossen werden. Wäre dem so gewesen, hätte auch eine Adsorption von Toxin-Molekülen auf diesen Bereichen erfolgen müssen (Abbildung 38). Da dies nicht der Fall war und auch die detektierten Stufenkanten für eine Phasenseparation der Modellmembran sprachen, konnten die unstrukturierten Oberflächenbereiche der  $I_d$ -Phase und somit der Membranoberfläche zugeordnet werden.

#### 4.3.1.2.2 Interaktion des $\alpha$ -Toxins mit geladenen Lipidsystemen

Abbildung 41 & Abbildung 42 zeigen die Resultate für die Interaktion des  $\alpha$ -Toxins mit SPBs des ternären Systems IV (DOPS:PSM:Chol – 2:1:1) auf Mica als unterstützendes Substrat. Auch hier

konnten verschiedene Oberflächenbereiche unterschieden werden. An Hand der auftretenden Stufenkanten von ca. 3,5 - 4 nm konnte von einer unvollständig ausgebildeten Membran ausgegangen werden. Diese wies Bereiche auf, welche sich deutlich hinsichtlich ihrer Strukturierungen und Höhenprofile unterschieden. Sowohl strukturierte, als auch unstrukturierte Domänen lagen vor. Im Falle der strukturierten Abschnitte ist davon auszugehen, dass diese auf die Interaktion und Anbindung der Toxin-Moleküle mit der Membran zurückzuführen waren. Die zentralen Bereiche dieser Raft-artigen Domänen zeigten Strukturen, die ca. 1 – 1,5 nm aus der Oberfläche der Membran herausragten. An den Randbereichen dagegen traten Erhöhungen von ca. 4 nm auf (Abbildung 41 & Abbildung 42). Angrenzende Membrandomänen verblieben dagegen unstrukturiert. Eine deutlich unterschiedliche Interaktion des Toxins mit definierten Bereichen der Membran trat also auf. Unstrukturierte Bereiche konnten in diesem Zusammenhang der  $I_d$ -Phase zugeordnet werden, da sich diese hauptsächlich aus Phosphatidylserinen aufbauten und per se keine Bindestelle für  $\alpha$ -Toxin Moleküle anboten.

Strukturierte Regionen wurden dagegen der  $I_o$ -Phase, und somit Raft-artigen Domänen zugeordnet. Eine Toxin-Bindung an diese Regionen war auf Grund der vorliegenden Phosphocholin-Kopfgruppen möglich. Innerhalb dieser Domänen ließen sich allerdings zwei verschiedene Interaktions- bzw. Integrationsformen der Toxine in oder an die Membran unterscheiden. Die zentralen Domänenabschnitte wiesen Strukturierungen auf, die nur geringfügig die Membran überragten. Dieser Fakt sprach für angebundene oder angelagerte Toxine in monomerer oder oligomerer Form, die noch nicht zu einer finalen Pore konvertiert waren. Möglicherweise lagen sie flach an der Oberfläche vor, was die geringen Werte im Höhenprofil an diesen Positionen erklären würde und gut mit den Dimensionen eines Monomers (ca. 3 \* 5 nm) vereinbar ist. An den Randbereichen dieser Domänen dagegen konnten teilweise Erhebungen über die Membranebene von ca. 4 nm abgebildet werden. Abbildung 41 & Abbildung 42 zeigen Bereiche die sich wie ein Band entlang eines scheinbar definierten Membranabschnitts erstreckten. Auf Grund der detektierten Höhenwerte von ca. 4 nm darf angenommen werden, dass diese Form der Oberflächenstrukturierung auf finale und in die Membran integrierte Toxin-Poren zurückzuführen war. Eine Anreicherung der Poren an den Randbereichen bestimmter Domänen würde für die im vorherigen Abschnitt beschriebene Vermutung sprechen, dass der Findungsprozess der Monomere gleichmäßig verteilt über die Raft-artigen Domänen stattfand, die Insertion der finalen Pore aber auf Grund der besseren räumlichen Bedingungen vorrangig an den Domänenrändern erfolgte. Dafür sprachen die Werte des Höhenprofils und die Anreicherungen von Strukturen in diesen Bereichen.

An manchen Abschnitten der detektierten Oberfläche trat das Substrat zu Tage. Diese Abschnitte waren in der Regel strukturiert (schwarze Pfeile Abbildung 41), was auf eine Interaktion mit den  $\alpha$ -Toxinen bzw. eine Adsorption der Toxin-Moleküle an die Micaoberfläche schließen ließ. Eine solche Interaktion mit dem Substrat ist auch für andere Toxine, wie das Cholera-Toxin, beschrieben [17] und wurde auch in meinen Experimenten zur Toxin-Interaktion mit reinen Micaoberflächen für das hier eingesetzte  $\alpha$ -Toxin aus *S. aureus* bestätigt. Unstrukturierte Abschnitte der Substratoberfläche finden sich aber ebenfalls (Abbildung 41 weiße Pfeile). Warum eine solche Heterogenität auftrat ist unklar.

Ob tatsächlich eine Porenbildung an den oberflächenunterstützten Modellmembranen des Lipidsystems IV stattgefunden hatte, wurde ebenfalls mittels SDS-Gelelektrophoretischen Experimenten untersucht. Die erhaltenen Bandenmuster für zwei dieser Versuche sind in Abbildung 43 dargestellt. Deutlich erkennbar treten auch hier zwei Banden auf, die zum einen dem Toxin-Monomer und zum anderen der heptameren Pore zuzuordnen sind. Somit ist davon auszugehen, dass eine Porenbildung an den untersuchten Oberflächen erfolgte. Zusammen mit den Ergebnissen der AFM-Experimente ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Porenbildung stattfand, und diese bevorzugt an den Raft-artigen Domänen, im Wesentlichen zusammengesetzt aus Spingomyelin und Cholesterol, erfolgte.

Diese Resultate sind gut mit den für das zwitterionische Lipidsystem beschriebenen und diskutierten Ergebnissen vereinbar. Für beide phasenseparierende Systeme traten nach der Interaktion mit Toxin-Molekülen Strukturierungen räumlich begrenzter Membranbereiche auf. Dass es sich dabei um phasenseparierte SPBs handelte, wurde auf Grund der auftretenden Höhenunterschiede deutlich, die zwischen den Membranoberflächen der strukturierten Regionen und den Oberflächen der unstrukturierten Regionen auftraten. Sie zeigten für beide Systeme Höhendifferenzen von ca. 1 – 1,4 nm und waren somit sehr gut mit den Resultaten für Toxin-unbehandelte SPBs dieser Lipid-Kompositionen vereinbar. Für beide Systeme (I & IV) waren deutliche Hinweise darauf zu finden, dass eine Insertion der Toxin-Poren, sofern sie stattfand, bevorzugt an den Domänenrändern eintrat.

#### 4.4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte die Ausbildung oberflächenunterstützter Modellmembranen (SPB) für fünf unterschiedliche ternäre Lipidsysteme (Tabelle 7 & Tabelle 8) auf verschiedenen Oberflächentypen erfolgreich durchgeführt werden. Dabei unterschied sich der Prozesse der SPB-Ausbildung je nach eingesetzter Komposition. Für Lipid-Kompositionen, die ausschließlich zwitterionische Kopfgruppen trugen (PC:SM:Chol – 0,35:0,35:0,3), wurde der „klassische“ Vorgang der SPB-Ausbildung detektiert, wie er auch für Einkomponenten-Lipidsystem beschrieben ist [182,156,174]: Nach initial erfolgter Adsorption wurde eine kritische Oberflächenbelegung an Vesikeln erreicht, die zum Aufreißen der Vesikel und in der Folge zur Ausbildung eines SPBs führte. Die gegenüber Einkomponenten-Lipidsystemen erhöhte Massenzunahme ist dabei auf die erhöhte Flexibilität der Vesikel auf Grund des Vorkommens einer Raft-artigen Lipid-Phase ( $l_o$ -Phase) zurückzuführen. Vesikel mit integrierten Phospholipiden negativer (DOPS:PSM:Chol – 2:1:1) bzw. positiver (DOTAP:PSM:Chol - 1:1:1) Kopfgruppenladung zeigten ein anderes Adsorptionsverhalten, welches auf eine Mischform zwischen ausgebildetem SPB und intakt adsorbierten Vesikeln schließen ließ. Wie dieser Prozess dabei im Detail ablief war nicht eindeutig zu klären und konnte sich je nach eingesetztem Lipid und Kopfgruppenladung unterscheiden. Auf Grund der AFM-Experimente konnte für alle fünf ternären Systeme auf Mica eine SPB-Ausbildung nachgewiesen werden. Ferner zeigten alle ternären Systeme Phasenseparation und waren somit für Experimente zur Toxin-Membran-Interaktion nutzbar.

Die bezüglich dieser Interaktion erhaltenen Ergebnisse mit Lipidsystem I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und IV (DOPS:PSM:Chol – 2:1:1) zeigen, dass eine Anbindung und zumindest teilweise Integration der Toxine in die Membran stattfand. Der Anbindungsprozess an die oberflächenunterstützte Modellmembran erfolgte dabei vornehmlich an den Raft-artigen Domänen, wohingegen die Insertion der Poren vorrangig an den Grenzbereichen zwischen den beiden Domänenformen stattfand. Eine Ursache für dieses Verhalten können die räumlichen Besonderheiten dieser Regionen sein. Membranen weisen an den Schnittstellen zwischen zwei Domänen, also an Grenzbereichen unterschiedlicher Lipid-Phasen, eine erhöhte Lipid-Unordnung auf, was sich u.a. in einer geringeren Packungsdichte und erhöhten Freiheitsgraden der Kopfgruppen bemerkbar macht [200,17]. Außerdem kommt es durch die Interaktion der Sphingomyeline und Cholesterole untereinander zu einer speziellen Ausrichtung der Phosphocholin-Kopfgruppen [40] und innerhalb der Raft-artigen Domänen zu einer erhöhten

Packung bzw. Ordnung der Phospholipide und ihrer Kopfgruppen. Eine Kombination dieser Faktoren kann nun eine bevorzugte Anbindung der Toxine an diesen Domänen allgemein zur Folge haben, wohingegen auf Grund des besseren Platzangebots die Porenintegration an den Domänenrändern stattfindet.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse unterstützen demnach die in der Literatur postulierte Vermutung der bevorzugten Interaktion und Integration der Toxin-Moleküle mit Raft-artigen Membrandomänen [2]. Die Insertion der Pore erfolgt aber allem Anschein nach an den Grenzbereichen zwischen den auftretenden Domänen.

#### 4.5 Ausblick

Für weitere Untersuchungen zu diesem Thema wird vorgeschlagen die vergleichenden Untersuchungen zwischen den beiden hier eingesetzten Lipidsystemen I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) durch den Einsatz von Toxin-Konzentrationsreihen zu ergänzen. Dabei sollte zusätzlich zur hier eingesetzten Wildtyp-Variante des Toxins eine Mutante (H35R) verwendet werden, die auf Grund der implizierten Mutation nicht in der Lage ist eine Konformationsänderung von der Präpore zur fertigen Pore durchzuführen. Dadurch sollte ermittelbar sein, ob es sich bei den für Lipidsystem I auf Mica auftretenden verringerten Höhenausmaßen um Porenvorstufen handelt, oder ob tatsächlich ein zu geringes Platzangebot zwischen PSB und Substrat, und somit eine unvollständige Integration in den SPB für die aufgezeigten Höhenprofile verantwortlich ist. Alternativ kann auch vor SPB-Ausbildung und Toxin-Interaktion eine Oberflächenmodifikation angestrebt werden, die eine Art Platzhalter zwischen SPB und Substratoberfläche ausbildet. Dazu geeignet wären zum einen sogenannte SAMs (Self-Assembled-Monolayer) aufgebaut aus Chlorsilanen [201] oder Alkanthiolen [202,203,204], zum anderen können aber auch sogenannte „Tethered-Bilayer“ verwendet werden [205,206,207]. Diese Modifikationen können einen gewissen Freiraum zwischen Modellmembran und Oberfläche erzeugen, wodurch die Poreinsertion (falls behindert) ungehindert ablaufen kann.

Eine weitere Möglichkeit vergleichende Aussagen zu den hier erhaltenen Resultaten zu erzielen, wäre der Ausbau fluoreszenzmikroskopischer Versuche an SPBs auf Glas. Dabei können

Fluorophor-Pärchen zur Markierung der unterschiedlichen Lipid-Phasen eingesetzt werden, wodurch sich die Phasen gut unterscheiden lassen [208]. Durch Zugabe ebenfalls fluoreszenzmarkierten Toxins-Variante (S3C) kann eine Ko-Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop angestrebt und dargestellt werden.

## **5 Ergebnisse Hämocyanin**

### **5.1 Röntgen-L-Kanten-Spektroskopie am Hämocyanin aus *Homarus americanus***

In der vorliegenden Arbeit wurde das aktive Kupfer-Zentrum des Hämocyanins aus dem amerikanischen Hummer (*Homarus americanus*) mit der Methode der Röntgen-Nahkanten-Spektroskopie (NEXAFS) an der Kupfer -L-Kante untersucht.

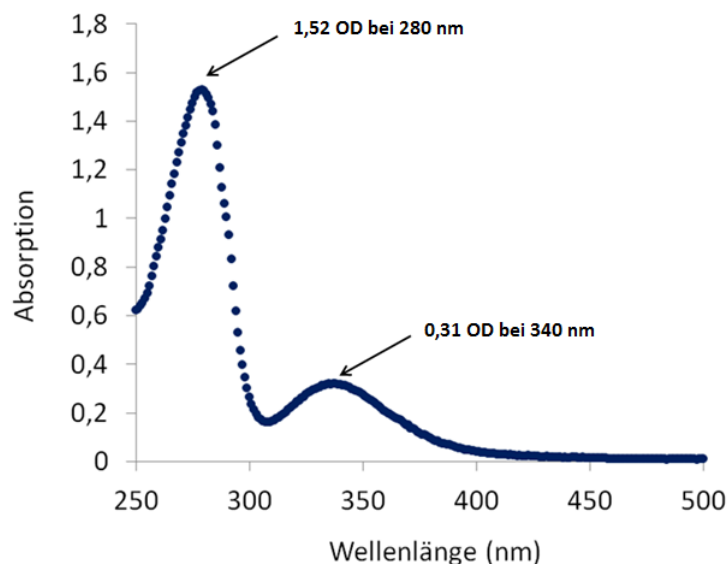
Hauptziel der Untersuchungen war es, Kupfer-L-Kanten-Spektren von Hämocyaninen im oxygenierten und deoxygenierten Zustand aufzunehmen. Dadurch sollte die Unterscheidbarkeit der Zustände mittels dieser Methodik überprüft („Proof of principle“), sowie Abschätzungen bezüglich möglicher auftretender Strahlenschäden gemacht werden. Zur Kalibrierung und zur weiteren Interpretation der erhaltenen Spektren wurden zusätzlich anorganische Kupfer-Testlösungen röntgenspektroskopisch untersucht und Vergleiche zwischen den Resultaten der Proteinmessungen und den Testsystemen geführt.

Ergänzend wurden bekannte Proteinstrukturen von Typ-3-Kupferproteinen aus der Proteindatenbank (RSCB-PDB) auf das Vorkommen von Wassermolekülen im Umfeld ihrer aktiven Zentren hin untersucht und die Situation mit dem Programm *USCF Chimera* [35] optisch dargestellt.

### 5.1.1 Vorarbeiten

Zur Proteingewinnung wurden amerikanische Hummer mit einer Kanüle punktiert und die Hämolymphe der Tiere entnommen. Die Aufbereitung erfolgte mittels präparativer Ultrazentrifugation und ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Der Aggregationszustand der Proteine wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation sowie nativer Gelelektrophorese bestimmt und die Proteinlösung anschließend durch Absorptionsspektroskopie auf eine finale Konzentration von 60 mg/ml eingestellt. Dies entspricht einer Kupferkonzentration von ca. 1,559 mmol (siehe Kapitel 12). Die Hämocyanine lagen zum Großteil als 6mere, ein kleinerer Anteil als 12mere vor. Der verwendete Puffer war ein 100 mM TRIS-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5, der je 20mM Kalzium- und Magnesium-Chlorid enthielt und in unserem Institut standardmäßig für Crustaceen-Hämocyanine verwendet wird.

Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung erfolgte eine Überprüfung des Proteinzustandes durch Absorptionsspektroskopie. In Abbildung 49 ist ein typisches Absorptionsspektrum für das in diesen Versuchen verwendete Hämocyanin gezeigt.



**Abbildung 49: Typisches Absorptionsspektrum für Crustaceen-Hämocyanin.** Der Peak bei 280 nm ist um Faktor 4,8 größer als der Peak bei 340 nm, was charakteristisch für Hämocyanine aus Crustaceen ist.

Das Verhältnis zwischen den Absorptionspeaks bei 280 nm (Absorption der aromatischen Aminosäuren) und 340 nm (Absorption des aktiven Kupferzentrums) lag bei ca. 5:1 und ist typisch für ein Crustaceen-Hämocyanin. Für die Peaks bei 280 nm und 250 nm liegt das Verhältnis bei ca. 5:2,6, was bedeutet, dass die Lösung keine Streuung aufweist und somit keine Aggregatbildung der Hämocyanine vorliegt. Der Extinktionskoeffizient für Hämocyanin aus *Homarus americanus* beträgt  $1,34 \text{ ml (cm mg)}^{-1}$  [209]. Das Beispiel-Spektrum in Abbildung 49 entspricht einer Proteinkonzentration von 1,18 mg/ml.

## 5.1.2 Untersuchungen mit Röntgen-L-Kanten-Spektroskopie

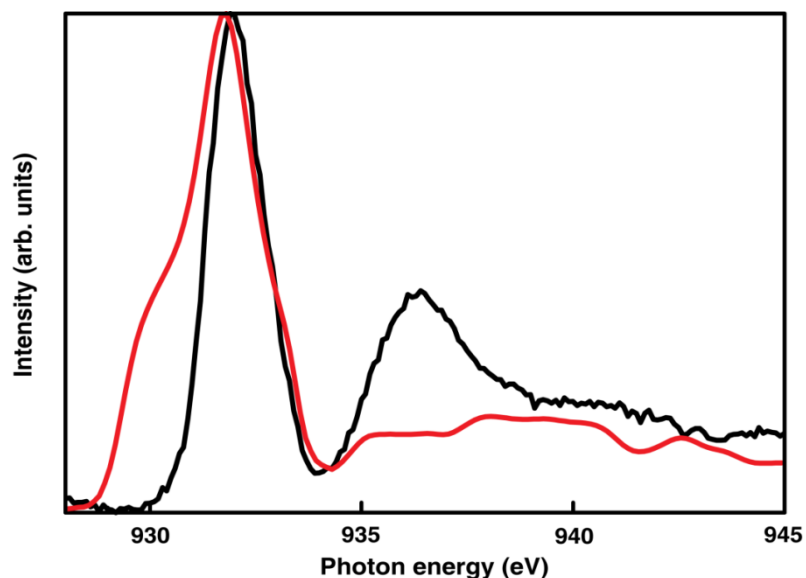
### 5.1.2.1 Oxygeniertes und Deoxygeniertes Hämocyanin von *Homarus americanus*

Initial sollte durch Verwendung der beiden maximal unterschiedlichen Beladungszustände des Hämocyanins (Oxy- und Deoxy-Zustand) getestet werden, ob mit der hier verwendeten Methode der Röntgen-L-Kanten-Spektroskopie eine Unterscheidung dieser beiden Zustände anhand der spektralen Signatur möglich ist. Außerdem sollten mögliche neue Erkenntnisse zur elektronischen Struktur des aktiven Zentrums gewonnen werden. Dazu wurden die Absorptionsspektren von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämocyanin unter physiologischen Bedingungen aufgenommen und ausgewertet.

Die eingestrahlte Energie des Röntgenlichtes für röntgenspektroskopische Untersuchungen an der L-Kante von Kupfer liegt im Bereich von 920-970 eV. In diesem Bereich wurden mehrere Spektren der verschiedenen Hämocyanin-Proben aufgenommen. Die Ergebnisse sind für oxygeniertes Hämocyanin als Summenspektrum und für deoxygeniertes Hämocyanin als repräsentatives Einzelspektrum dargestellt. Abbildung 50 zeigt die entsprechenden Resultate für die oxygenierte (rot) und deoxygenierte (schwarz) Hämocyanin-Lösungen. Deutliche Unterschiede zwischen den Signalen sind zu erkennen und eine Unterscheidung der abweichenden Beladungs- und Valenzzustände des aktiven Zentrums bzw. der Kupferatome ist grundsätzlich möglich.

Im Spektrum für das oxygenierte Protein zeigt sich ein einzelner starker Peak bei 932 eV, die sogenannte „White Line“. Zusätzlich ist ein zweiter Peak bzw. eine Schulter im Spektrum bei ca. 930 eV zu erkennen, der aber teilweise von dem stärker ausgeprägten Peak bei 932 eV überlagert wird. Der Bereich zwischen 934 eV und 945 eV weist nur relativ schwache Modulationen im Spektrum auf, die als Rauschen einzustufen sind.

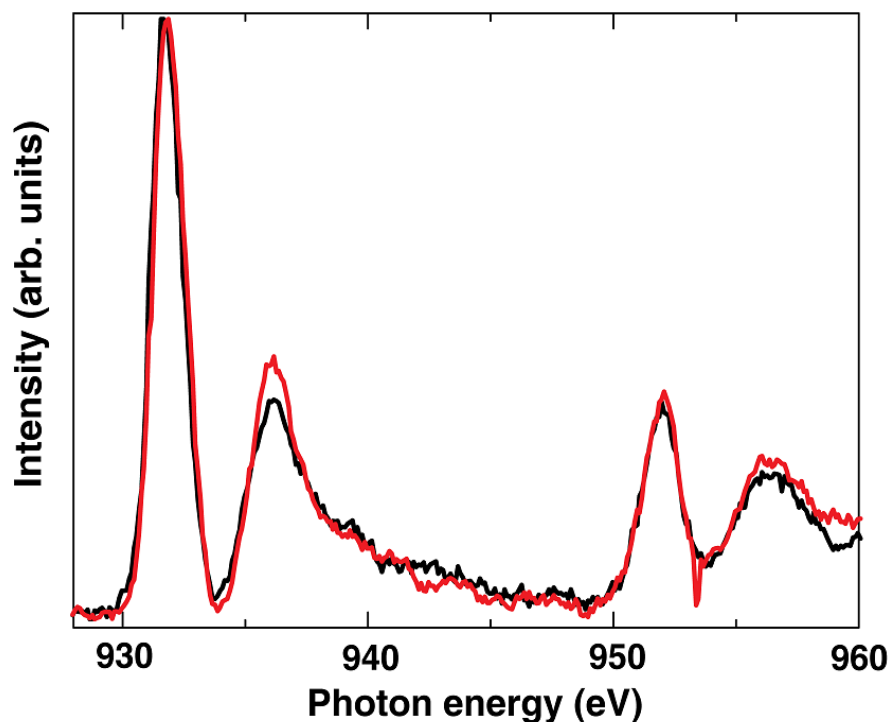
Im Fall des deoxygenierten Hämocyanins treten dagegen zwei deutlich ausgeprägte und von ihrer Position klar unterscheidbare Hauptpeaks auf. Dabei handelt es sich zum einen um den bereits im Spektrum für das oxygenierte Hämocyanin aufgetretenen Peak bei 932 eV, sowie einen weiteren Peak bei 936 eV. Dieser ist relativ breit und fällt zu größeren Energien hin langsam ab. Der Bereich des Spektrums von ca. 939 eV bis 945 eV kann als Rauschen betrachtet werden.



**Abbildung 50:** Röntgenabsorptionsspektren von oxygeniertem (rot) und deoxygeniertem (schwarz) Hämocyanin. Die eingesetzte Hämocyanin-Konzentration lag bei 60 mg/ml, der verwendete Puffer war TRIS-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5. Die Temperatur in der Kammer betrug bei angelegtem Vakuum (Oxy-Spektrum) etwa Raumtemperatur, was für eine vollständige Oxygenierung spricht. Bei eingesetzter Helium-Atmosphäre (Deoxy-Spektrum) lag die Temperatur bei ca. 15 bis 20°C [210].

### 5.1.2.2 Verfahren zur Deoxygenierung des Hämocyanins aus *Homarus americanus*

Der Vorgang der Deoxygenierung des Proteins wurde mittels zweier unterschiedlicher Verfahren durchgeführt. Zum einen wurde der Sauerstoff durch Zugabe von Natriumdithionit der Lösung entzogen, zum anderen wurde sauerstoffbeladenes Hämocyanin in die statische Messzelle der Hauptkammer des „Liquidroms“ gegeben und innerhalb der Kammer unter Heliumatmosphäre deoxygeniert. In beiden Fällen erfolgte der charakteristische Farbumschlag der Proteinlösung von blau (sauerstoffbeladen) zu klar und durchsichtig (sauerstoffunbeladen). Durch die unterschiedlichen Verfahren zur Entfernung des Sauerstoffs aus den Proteinlösungen sollte sichergestellt werden, dass eine vollständige Deoxygenierung erfolgte und keine sauerstoffbeladenen Kupferzentren mehr vorlagen. Außerdem sollte eine mögliche Schädigung der Hämocyanine durch Natriumdithionit überprüft werden. Die resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 51 dargestellt.



**Abbildung 51:** Röntgenabsorptionsspektren von deoxygenierten Hämocyanin-Lösungen. Der rote Graph zeigt das Ergebnis für das mittels Natriumdithionit deoxygenierte Hämocyanin, der schwarze Graph das Resultat für das unter Heliumatmosphäre deoxygenierte Hämocyanin. Eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Spektren ist zu erkennen [210].

Der rote Graph zeigt das Spektrum für die mittels Natriumdithionit deoxygenierte Hämocyanin-Lösung, der schwarze Graph das Spektrum für die unter Heliumatmosphäre deoxygenierte Lösung. Der Kurvenverlauf ist in beiden Fällen nahezu identisch. Lediglich der Peak bei ca. 936 eV ist für die mit Natriumdithionit deoxygenierte Lösung leicht gegenüber der unter Heliumatmosphäre deoxygenierten Lösung erhöht. Bei beiden Präparationsansätzen sind die weiter oben beschriebenen Peaks bei 932 eV und 936 eV zu sehen. Außerdem finden sich weitere übereinstimmende Signaturen bei 952 eV und 957 eV. Wäre eine der verwendeten Präparationen zur Herstellung der sauerstofffreien Hämocyanin-Lösungen nur unzureichend effektiv gewesen oder wäre ein schädigender Einfluss auf die aktiven Zentren der Proteine ausgeübt worden, z.B. durch den Einsatz von Natriumdithionit, sollten sich Abweichungen bzw. Unterschiede in den erhaltenen Signalen zeigen.

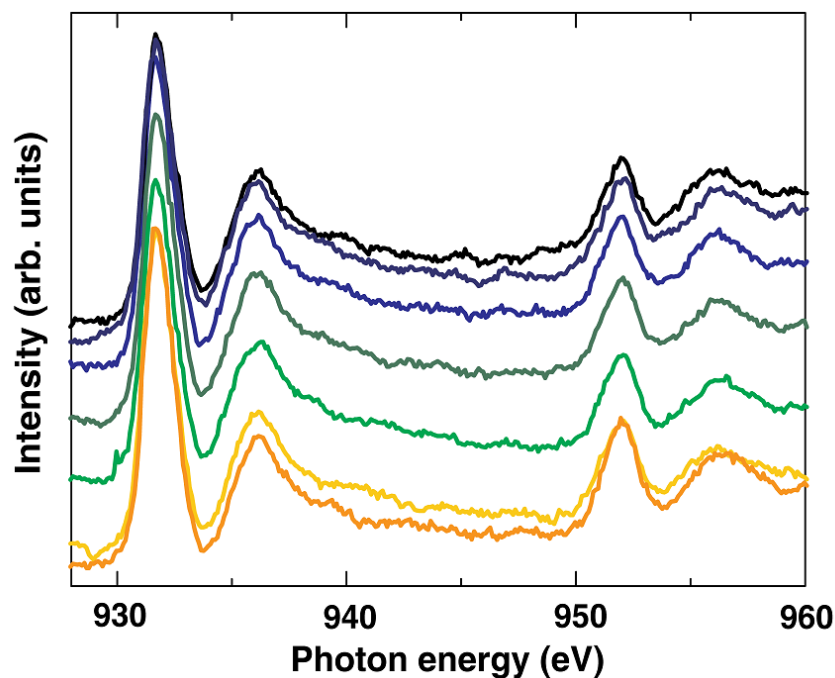
Auf Grund dieser Resultate kann ein unvollständiger Deoxygenierungs-Prozess, sowie eine schädigende Wirkung auf das aktive Zentrum weitestgehend ausgeschlossen werden.

### **5.1.2.3 Untersuchung der Hämocyanin-Lösungen hinsichtlich möglicher Strahlenschäden**

Ein Faktor, der möglicherweise zu einer Schädigung der Struktur des Proteins und speziell des aktiven Zentrums geführt haben könnte, war die eingesetzte Röntgenstrahlung. Um diese Problematik nachhaltig zu überprüfen, wurden Serienmessungen an einer sauerstoffbefreiten Probe durchgeführt und Absorptionsspektren über ein Zeitfenster von 2,5 Stunden aufgenommen. Die resultierenden Spektren sind in Abbildung 52 dargestellt. Dabei ist die erste Messung zuoberst aufgetragen. Zur besseren Übersicht sind alle mit der Zeit folgenden Spektren nach unten versetzt aufgetragen (schwarz → orange in Abbildung 52). Eine Veränderung des Absorptionsmusters über den untersuchten Zeitraum tritt nicht auf. Beide für das Deoxy-Spektrum beschriebenen Peaks bei 932 eV und 936 eV sind vorhanden und bleiben über die Dauer der Serienmessung unverändert. Weiterhin sind in dieser Auftragung Peaks bei 952 und 957 eV zu sehen, die über den untersuchten Zeitraum ebenfalls stabil bleiben. Eine potentielle Schädigung des aktiven Zentrums oder dessen Umfeldes durch die eingesetzte Strahlung würde

mit einer Zustandsveränderung der an der Koordination beteiligten Kupferatome einhergehen, und hätte sich demzufolge in den hier gezeigten Absorptionsspektren durch eine Signalveränderung bemerkbar machen müssen. Da dies nicht der Fall war und die Spektren sehr gut reproduzierbar waren, kann der Einfluss von Strahlenschäden somit ausgeschlossen bzw. vernachlässigt werden.

Weiterhin waren die eingesetzten Lösungen nach den Messungen gut reoxygenierbar. Ein Farbumschlag von klar und durchsichtig zu blau erfolgte, was für den Erhalt der Struktur und der Funktion der Hämocyanine spricht. Rückstände in Form ausgefallener Proteine traten ebenfalls nicht auf. UV/Vis-Spektren nach der erfolgten Untersuchung mit L-Kanten-Spektroskopie wurden auf Grund der fehlenden technischen Möglichkeiten vor Ort nicht gemacht. Dies erschien auf der Basis der obigen Versuche auch nicht zwingend notwendig.



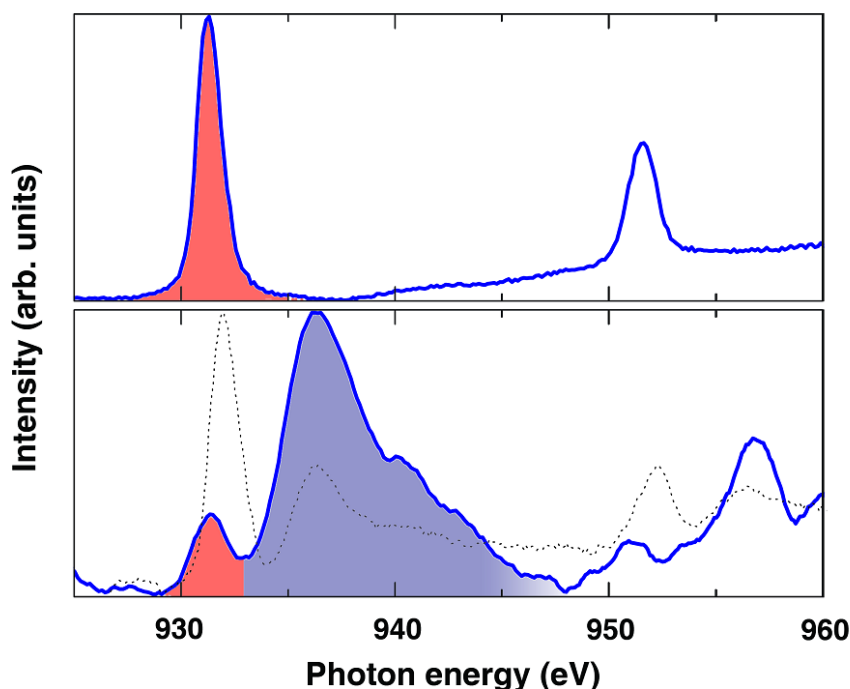
**Abbildung 52:** Serienmessung über einen Zeitraum von 2.5 Stunden an einer deoxygenierten Hämocyanin-Lösung. Die Reihenfolge der gemachten Messungen ist von oben (schwarz) nach unten (orange) aufgetragen. In den Spektren erfolgen keine nennenswerten Veränderungen über die Zeit. Eine Strahlenschädigung ist deshalb auszuschließen [210].

#### 5.1.2.4 Vergleichende Messungen mit chemischen Testsystemen

Um eindeutigere Aussagen bezüglich des bei der Bindung und der Abgabe von Sauerstoff erfolgenden Wechsels in der elektronischen Struktur des aktiven Kupferzentrums von Hämocyanin treffen zu können, wurden anorganische Vergleichslösungen hergestellt und mit Röntgenabsorptionsspektroskopie, unter Verwendung von Röntgenstrahlung des gleichen Energiebereichs (920 – 970 eV), untersucht. Eingesetzt wurden dabei wässrige Kupfer-(II)-Chlorid-Lösungen, sowie Lösungen, die sowohl Kupfer-(II)-Chlorid als auch Imidazol bzw. Histidin, enthielten. Auf diese Weise konnten Testsysteme in wässriger Umgebung hergestellt werden, die alle wesentlichen Komponenten des aktiven Kupferzentrums enthielten (Kupferionen, koordinierende Ringsysteme des Histidins bzw. Imidazols, sowie Wassermoleküle).

Initial wurde eine 1M Kupfer-(II)-Chlorid-Lösung verwendet und röntgenspektroskopisch untersucht. Das erhaltene Spektrum ist im oberen Graphen der Abbildung 53 dargestellt. Es treten zwei Peaks („White lines“) bei ca. 932eV und 952eV auf, die für den Kupfer-(II)-Zustand charakteristisch sind. Des Weiteren wurden Verdünnungen dieser Stammlösung hergestellt und untersucht. Im unteren Graph der Abbildung 53 ist das Spektrum einer 5mM Kupfer-(II)-Chlorid-Lösung gezeigt. Deutliche Veränderungen gegenüber der wesentlich höher konzentrierten 1M-Lösung sind zu erkennen. Der Peak bei ca. 932 eV nimmt stark ab, wohingegen ein weiterer Peak bei ca. 936 eV, sowie Strukturen im Bereich der höheren Energien zwischen 936 eV und 948 eV, auftreten. Eine schwache Schulter bei ca. 940 eV ist zu sehen. Ursache dafür können MLCT-Prozesse, also Ladungstransferprozesse, zwischen den Kupferionen sowie den als Lösungsmittel dienenden Wassermolekülen, sein (MLCT = Metal to Ligand Charge Transfer).

Weiterhin wurden Experimente mit chemischen Lösungen gemacht, die Imidazol in Verbindung mit Kupfer-(II)-Chlorid enthielten. Die vorherrschenden Zustände am aktiven Zentrum der Hämocyanine sollten so simuliert werden. Imidazol ist ein Hauptbestandteil der Aminosäure Histidin, die im aktiven Zentrum der Typ-(III)-Kupferproteine die Kupferatome koordiniert. Über die Stickstoffatome seines pentameren, heterogenen Ringsystems kann das Imidazol mit den Kupferionen komplexieren und so die Verhältnisse im aktiven Zentrum des Hämocyanins nachstellen, wo drei Histidine je ein Kupferatom koordinieren.



**Abbildung 53: Röntgenspektroskopische Messungen an Lösungen aus Kupfer-(II)-Chlorid.** *Oben:* 1M Kupfer-(II)-Chlorid-Lösung mit zwei auftretenden „White Lines“ bei 932 eV und 952 eV. *Unten:* 5 mM Kupfer-(II)-Chlorid-Lösung. Der Peak bei 932 eV ist gegenüber der 1M-Lösung schwächer ausgeprägt. Dafür tritt ein starker Peak bei 936 eV, sowie Strukturen zwischen 936 eV und 948 eV auf, die auf einen MLCT-Prozess schließen lassen. Weiterhin sind Peaks bei ca. 952 eV und 957 eV zu sehen. Der Peak bei 952 eV ist gegenüber der 1M-Kupfer-(II)-Chlorid-Lösung schwächer ausgeprägt. Im unteren Graphen ist zusätzlich noch das Ergebnis für die deoxygenierte Hämocyanin-Lösung eingezeichnet (gestrichelte Linie) [210].

25 mM Kupfer-(II)-Chlorid und 100 mM Imidazol wurden eingesetzt. Ein starker Beitrag des Peaks bei 932 eV, sowie ein etwas geringer ausgeprägter, aber dennoch sehr deutlicher Peak bei ca. 936 eV, treten auf (Abbildung 54 oben). Das Auftreten dieser beiden Peaks ist dabei sehr wahrscheinlich auf die Interaktion der Kupfer-Ionen mit den Stickstoffatomen des Imidazol-Ringsystems, sowie mit den Wassermolekülen der Lösung zurückzuführen, und spricht für eine Mischform aus Kupfer-(I)- und Kupfer-(II)-Zuständen in der Lösung oder möglicherweise auch für einen Zwischenzustand, da sowohl die für Kupfer(II), als auch die für Kupfer(I) charakteristischen Peaks (932 eV & 952 eV bzw. 936 eV & 956 eV) auftreten.

Als weiteres Testsystem wurde eine Lösung hergestellt, die Kupfer-(II)-Chlorid (50 mM) und Histidin (200 mM) enthielt und Absorptionsspektren an der L-Kante des Kupfers aufgenommen. Histidin ist dabei die Aminosäure, welche die Kupferionen im aktiven Zentrum der Hämocyanine koordiniert. Auch für diese Testlösung kommt es zum Auftreten der beschriebenen Peaks bei

932 eV und 936 eV (Abbildung 54 unten). Eine stärkere Ausprägung des Peaks bei 936 eV, und somit des Kupfer-(I)-Zustandes, im Vergleich zur Imidazol-Lösung, ist zu sehen. Dieser Zustand resultiert möglicherweise aus der Interaktion des Kupfers mit den Carboxyl-Gruppen des freien Histidins. Dabei könnte es zu einer Chelatierung der beiden Komponenten kommen, wodurch eine Verschiebung zum Kupfer-(I)-Zustand auftritt. Der pH-Wert dieser Testlösung lag bei ca. 5,5. In diesem pH-Bereich liegen die Carboxyl-Gruppen der Histidine im negativ geladenen Zustand vor ( $\text{COO}^-$ ), wodurch eine Interaktion mit den positiv geladenen Kupfer-Ionen erfolgen kann ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Da jedoch die Spektren für die Histidin- und Imidazol-Lösungen mit den Hämocyanin-Spektren sehr gut vergleichbar sind, wäre eine Koordination der Kupferatome über die protonierbaren Stickstoffe der Histidine, wie er auch *in vivo* auftritt, denkbar.

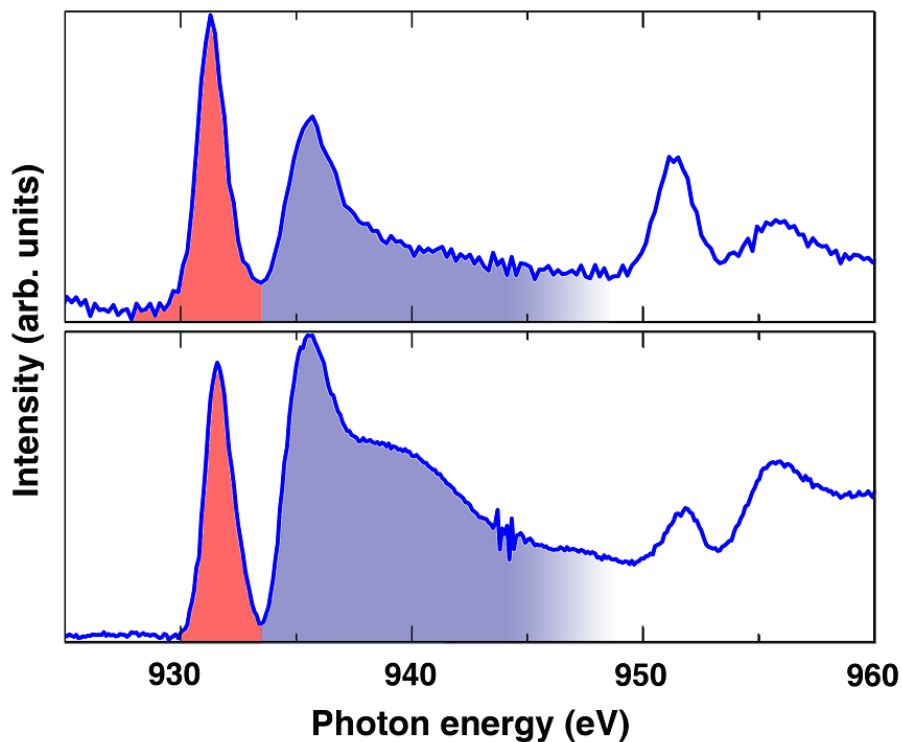


Abbildung 54: Röntgenspektroskopische Messungen an Testlösungen die Kupfer-(II)-Chlorid und Imidazol bzw. Histidin enthielten. **Oben:** 25 mM Kupfer-II-Chlorid-Lösung mit 100 mM Imidazol; **Unten:** 50 mM Kupfer-II-Chlorid-Lösung mit 200 mM Histidin [210].

Ebenfalls geplante und angestrebte, vergleichende Messungen mit Lösungen, die Kupfer-(I) (z.B. Kupfer-(I)-Chlorid) an Stelle von Kupfer-(II) enthielten, konnten nicht durchgeführt werden, da sich Kupfer in diesem Zustand zu schnell in Kupfer-(II) und Kupfer-0 aufteilt, was ohne weitere

aufwendige Maßnahmen nicht verhindert werden kann. Aus Zeitgründen wurde auf diese Messungen verzichtet.

## 5.2 Darstellung der aktiven Zentren von Typ-3-Kupferproteinen anhand bekannter Röntgenkristallstrukturen, unter Berücksichtigung des Vorkommens von Wassermolekülen in der Kristallstruktur

Dieser Abschnitt meiner Arbeit beschreibt die Lage von Wassermolekülen innerhalb des Hämocyanins, sowie deren Zugänglichkeit an das kupferhaltige aktive Zentrum. Mögliche Wechselwirkungen der Wassermoleküle mit den Kupferatomen sollten aufgezeigt werden. Aus diesem Grund wurden verschiedene Kristallstrukturen von den in der Protein-Datenbank (*RSCB-PDB*) hinterlegten Strukturen von Typ-3-Kupferproteinen untersucht. Strukturen für die oxygenierte und die deoxygenierte Form der Untereinheit II des Hämocyanins aus dem Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus* - PDB-Codes: 1OXY; 1LLA), die Deoxy-Struktur des hexameren Hämocyanins aus der Kalifornischen Languste (*Panulirus interruptus* - PDB: 1HC2), die beide zur Gruppe der Arthropoden-Hämocyanine gehören [114,63,72], sowie die oxygenierte Struktur der funktionellen Einheit des Mollusken-Hämocyanins aus *Octopus dofleini* (PDB: 1JS8), wurden verwendet [211]. Außerdem wurden weitere Strukturen aus der Familie der Typ-3-Kupferproteine mit in die Betrachtungen einbezogen. Dazu gehörten die Strukturen der Pro-Phenoloxidase aus dem Tabakswärmer *Manduca sexta* (PDB: 3HHS) [212], sowie die Struktur der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* (PDB: 3NM8) [213]. Einzelbetrachtungen der aktiven Zentren, sowie Vergleiche zwischen den hochkonservierten Strukturen, sind in diesem Abschnitt dargestellt. Dabei sollte die Lage von Wassermolekülen in den Kristallstrukturen im direkten Umfeld der Kupferatome (Maximaler Kupfer-Wasser-Abstand  $< 7 \text{ \AA}$ ) und auch deren Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum, und speziell zu den Kupferatomen, aufgezeigt werden. Außerdem wurde nach einem möglichen Kanal in der Proteinmatrix gesucht, der den Zugang der Substrate und der Wassermoleküle zum Kupferzentrum ermöglichen könnte.

### 5.2.1 Wasser am aktiven Zentrum von Hämocyaninen

Für das in den weiter oben beschriebenen Experimenten mit Röntgen-L-Kanten-Spektroskopie verwendete Hämocyanin aus *Homarus americanus* liegt bisher keine Struktur in der Protein-Datenbank vor. Um vergleichende Aussagen bezüglich der Situation am aktiven Zentrum dieses Hämocyanins treffen zu können, wurden deshalb bekannte Röntgenstrukturen anderer Typ-3-Kupferproteine herangezogen. Für die Hämocyanin-Strukturen aus *Limulus polyphemus* und *Panulirus interruptus* wurden die aktiven Zentren, sowie die Wassermoleküle in unmittelbarer Umgebung zu den Kupferatomen, betrachtet. Die Farb- und Formkodierungen für alle in der Folge gezeigten Abbildungen von Proteinstrukturen sind dabei in Tabelle 10 aufgeführt. Zur Untersuchung und Darstellung der Proteine wurde das Programm *USCF Chimera* [35] verwendet.

**Tabelle 10: Farb- und Formcodierung für die in den hier gezeigten Abbildungen dargestellten Strukturelemente.**

Kristallines Wasser wird als Sauerstoffatom ohne Wasserstoffatome gezeigt. Die Darstellung erfolgt als rote Kugeln (Sauerstoffanteil des Wassers). Diese sind je nach Ansicht als kleine oder als raumfüllende Kugeln dargestellt. Die raumfüllende Darstellung entspricht den van der Waals Radien der gezeigten Atome.

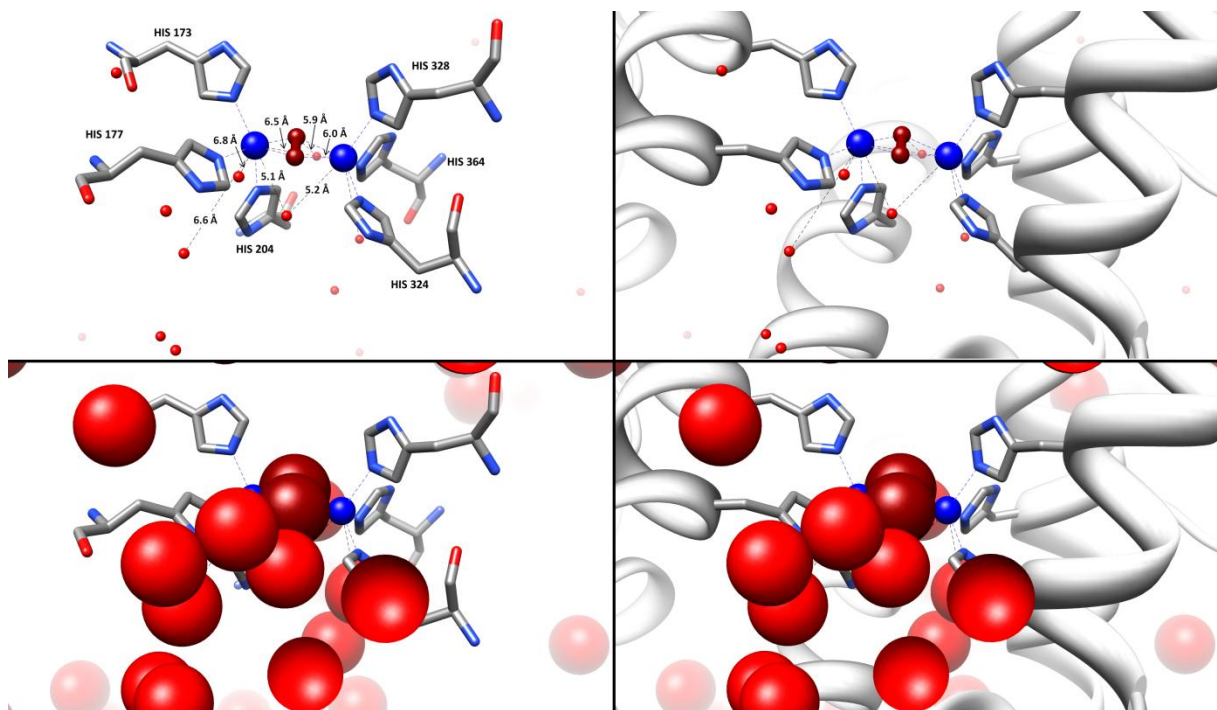
Proteinbereich	Farbcodierung	Form
$\alpha$ - Helices	weiß	Bänderdarstellung
Aminosäuren	Codierung nach Elementen (N = blau, O = rot, C = grau)	Stabdarstellung
Kupferatome	blau	raumfüllende Darstellung (van-der-Waals-Radien der Atome)
als Peroxid gebundener Sauerstoff	dunkelrot	raumfüllende Darstellung oder als kleine Kugeln
kristallines Wasser  (als Sauerstoffatom ohne Wasserstoff-Atome dargestellt)	rote Kugeln	raumfüllende bzw. kleine Kugeln  (dabei können die Kugeln bei gleichem Radius unterschiedlich groß erscheinen, was an der räumlichen Ansicht liegt, die perspektivisch verzerrend wirken kann)
Zufallsknäuel	weiß	Bänderdarstellung

Abbildung 55 stellt das oxygenierte aktive Zentrum aus *Limulus polyphemus* in unterschiedlichen Darstellungen, aber immer aus demselben Blickwinkel und mit der gleichen Vergrößerung, dar. Im linken oberen Bild werden lediglich die unmittelbar am Aufbau des oxygenierten Kupferzentrums beteiligten Komponenten (Histidine, Kupferatome, Peroxid) ohne weitere Bestandteile der Proteinmatrix aufgezeigt. Zusätzlich ist das kristalline Wasser im unmittelbaren Umfeld des aktiven Zentrums, mit einem Abstand von weniger als 7 Å zu den Kupfern, eingezeichnet (in der Folge wird diese Art der Darstellung, auch für die anderen gezeigten Typ-3-Kupferzentren, als „reduzierte Darstellung“ bezeichnet). Das rechte obere Bild zeigt das aktive Zentrum in der gleichen Ansicht, allerdings sind noch Teile der Proteinmatrix ( $\alpha$ -Helices im Hintergrund) abgebildet. Die beiden Darstellungen in der unteren Bildreihe von Abbildung 55 entsprechen den jeweils darüber gezeigten Darstellungen des aktiven Zentrums. Allerdings sind hier die Wassermoleküle als rote Sauerstoffatome mit ihren van-der-Waals-Radien dargestellt. Durch die unterschiedlichen Ansichten sollen die räumlichen Verhältnisse im Protein aufgezeigt werden. Es befinden sich relativ viele Wassermoleküle im direkten Umfeld des aktiven Zentrums, die durch ihre Nähe zu den Kupferatomen auch einen Einfluss auf diese ausüben können. Alle Histidine und ihre Bezeichnungen, sowie die Kupfer-Wasser-Abstände, sind eingezeichnet. Die Kupfer-Wasser-Abstände beziehen sich dabei auf den Abstand zwischen dem Kupferatom und dem Sauerstoffatom des jeweiligen Wassermoleküls. Für das in Abbildung 55 dargestellte oxygenierte Hämocyanin liegen die Abstände im Bereich zwischen 5,1 Å und 6,8 Å.

In den folgenden Abbildungen sind die aktiven Zentren immer in der reduzierten Darstellung gezeigt. Außerdem wird noch eine weitere Darstellung des jeweiligen aktiven Zentrums einbezogen, die van-der-Waals-Radien der Wassermoleküle und des Peroxids (sofern vorhanden), sowie Teile der Proteinmatrix in der Bänderdarstellung zeigt.

Abbildung 56 stellt die entsprechenden Ergebnisse für die sauerstoffbeladene (siehe Abbildung 55) und sauerstoffunbeladene Struktur der Untereinheit II aus *L. polyphemus* dar. Im sauerstoffbeladenen Zustand finden sich dabei vier Wassermoleküle in unmittelbarer Umgebung zu den Kupfern, für die sauerstoffunbeladene Struktur liegen dagegen nur drei Wassermoleküle in diesem Bereich vor. Van-der-Waals-Wechselwirkungen besitzen eine Reichweite von 3 – 6 Å, wodurch eine Interaktion der Kupferatome mit den sie umgebenden Wassermolekülen möglich wird. Zu beachten ist hierbei außerdem, dass sich die Lage der kristallinen Wassermoleküle in diesen Abbildungen auf den „fixierten“ Zustand innerhalb eines Proteinkristalles bezieht, und

diese *in vivo* abweichende Positionen einnehmen können. Auf Grund der Übersichtlichkeit in den Abbildungen wurden die aktiven Zentren hier in der reduzierten Darstellung gezeigt und beschriftet (obere Bildreihe Abbildung 56). In der unteren Bildreihe der Abbildung 56 sind die Wassermoleküle und das Peroxid zusätzlich mit ihren Atomhüllen (van der Waals-Radien), sowie Teile der Proteinstruktur in der Bänderdarstellung, gezeigt. Durch diese vergleichenden Darstellungen ist es zum einen möglich, die Werte für die gemessenen Abstände übersichtlich in einem Bild aufzuzeigen, und gleichzeitig einen Vergleich zu den tatsächlich auftretenden Van-der-Waals-Radien zu ziehen. Sowohl für die untere Bildreihe in Abbildung 56, als auch für das rechte untere Bild in Abbildung 55 wird dadurch deutlich, wie nahe sich die Atomhüllen der betrachteten Atome kommen. Ein Einfluss der kristallinen Wassermoleküle auf die Kupferatome ist demnach durchaus möglich.



**Abbildung 55: Oxygeniertes aktives Zentrum aus *Limulus polyphemus* in unterschiedlichen Darstellungen.** Das Bild links oben zeigt das aktive Zentrum mit eingezeichneten Kupfer-Wasser-Abständen ohne weitere Proteinstrukturen. Die rechten Bilder zeigen noch Sekundärstrukturbereiche im unmittelbaren Umfeld des aktiven Zentrums. Die unteren Bilder stellen sowohl die Wassermoleküle, als auch das gebundene Peroxid mit ihren van-der-Waals-Radien dar. Abstände und Aminosäure-Bezeichnung sind wegen der besseren Differenzierung nur in der „reduzierten Darstellung“ (links oben) eingezeichnet.



liegende Wassermolekül (grüne Pfeile) variiert der Kupfer-Wasserabstand zwischen oxygenierter Form (6,1 Å) und deoxygenierter Form (6,6 Å) um 0,5 Å. Die sehr ähnlichen Positionen, die kristalline Wassermoleküle in unterschiedlichen Kristallstrukturen einnehmen können, können ein Hinweis auf die Allgemeingültigkeit des Vorkommens von Wassern in diesen Proteinstrukturen sein.

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 11 alle in Abbildung 57 markierten Wassermoleküle und ihre Entfernungen zu den Kupfern und dem Peroxid-Molekül (sofern vorhanden) aufgetragen. Die dunkel hinterlegten Felder zeigen Abstände von Kupferatomen, welche die Grenze von 7 Å überschreiten.

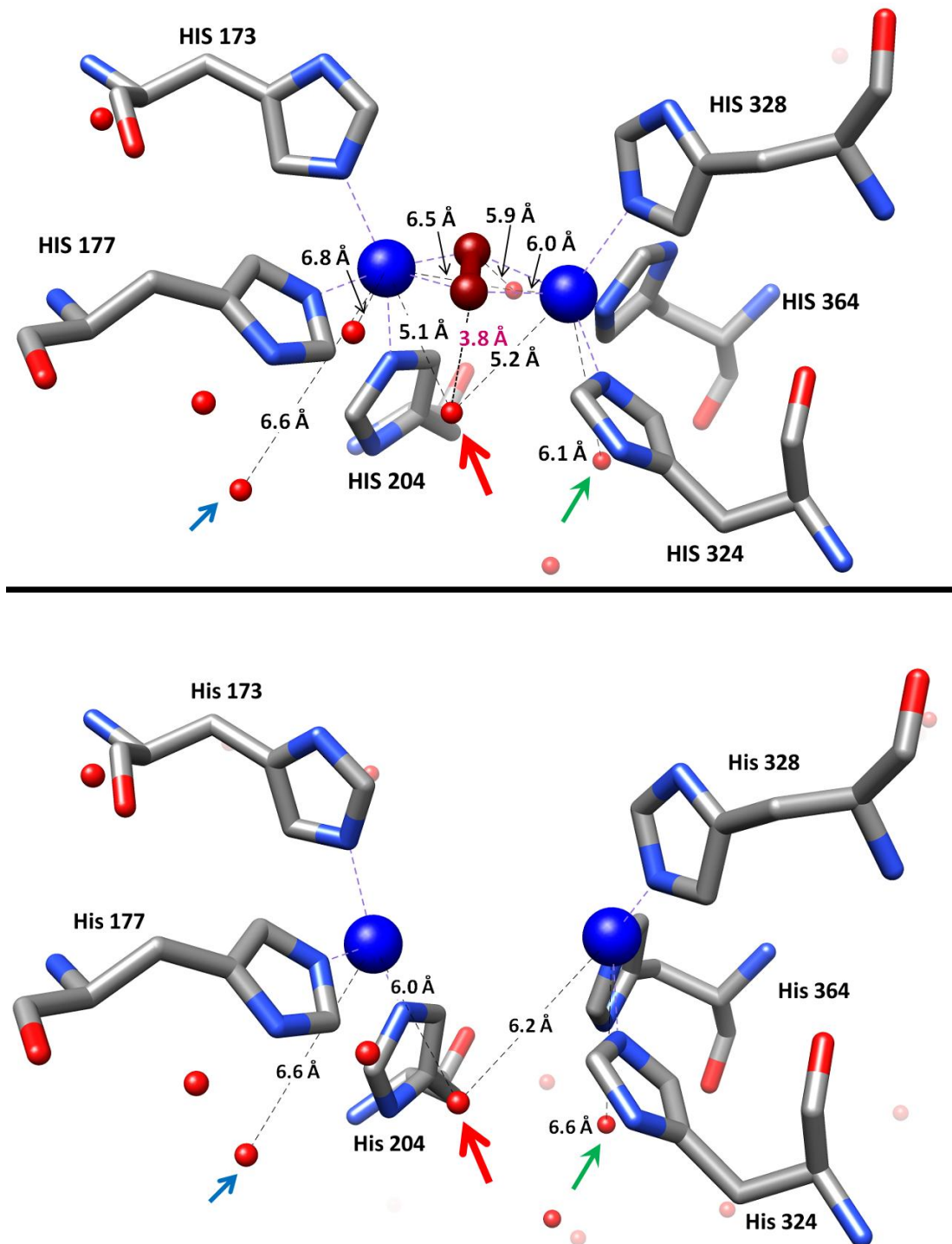


Abbildung 57: Vergleichende „reduzierte Darstellung“ der aktiven Zentren von *Limulus polyphemus* im oxygenierten (oben) und deoxygenierten Zustand (unten). Die mit den roten, blauen und grünen Pfeilen markierten Wassermoleküle kommen in ähnlichen Positionen in beiden Strukturen des Hämocyanins vor. Für die rot markierten Wassermoleküle variieren die Abstände zu den Kupferatomen zwischen 5,1 Å und 5,2 Å (oxygenierter Zustand), sowie 6,0 Å und 6,2 Å (deoxygenierter Zustand). Der Abstand für das blau markierte Wassermolekül bleibt dabei in beiden Zuständen gleich (6,6 Å). Für die grün markierten Wasser tritt wieder eine Variation der Abstände zwischen deoxygeniertem und oxygeniertem Zustand von 0,5 Å auf. Das obere Bild zeigt außerdem noch den sehr kurzen Abstand von 3,8 Å des zentralen Wassermoleküls zum Peroxid (magenta).

**Tabelle 11: Abstände der Wassermoleküle aus den aktiven Zentren des oxygenierten (1OXY) und des deoxygenierten (1LLA) Hämocyanins aus *Limulus polyphemus*.** Die in Betracht gezogenen Wassermoleküle wiesen, zumindest zu einem der Kupferatome einen Abstand von weniger als 7 Å auf, und sind durch ihre Nummerierung in der jeweiligen Kristallstruktur gekennzeichnet. Dunkel hinterlegte Felder markieren Kupfer-Wasserabstände, welche den Grenzwert von 7 Å leicht überschreiten. Diese sind in Abbildung 57 nicht eingezeichnet und hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Kristallstruktur	Nummerierung des Wassermoleküls im jeweiligen Datensatz	Entfernung der Wassermoleküle zu:		
		Cu A	Cu B	Peroxid
<b>1OXY</b> oxygeniertes Hc aus <i>Limulus polyphemus</i>	634	6,6 Å	8,3 Å	6,5 Å
	786	5,1 Å	5,2 Å	3,8 Å
	809	6,8 Å	7,7 Å	6,0 Å
	921	6,5 Å	6,0 Å	5,9 Å
<b>1LLA</b> deoxygeniertes Hc aus <i>Limulus polyphemus</i>	640	7,9 Å	6,6 Å	X
	650	6,6 Å	8,9 Å	X
	868	6,0 Å	6,2 Å	X

Die Unterschiede bezüglich der Lage der Wassermoleküle innerhalb der beiden hier betrachteten Kristallstrukturen mögen durch die unterschiedliche chemische Koordination der beiden Kupferatome im oxy- und deoxy-Zustand bedingt sein. Zudem vergrößert sich der Abstand der beiden Kupferatome zwischen den beiden Zuständen von 3,6 Å (Oxy-Zustand) auf 4,6 Å (Deoxy-Zustand).

## 5.2.2 Wasser am aktiven Zentrum verschiedener Typ-3-Kupfer-Proteine

Um das Vorkommen von Wassermolekülen in unmittelbarer Nähe der aktiven Zentren zu verdeutlichen, werden in diesem Abschnitt die Typ-3-Kupferzentren aus Kristallstrukturen verschiedener Organismen verglichen. Verwendet wurden dafür die deoxygenierte Struktur des hexameren Hämocyanins aus der Kalifornischen Languste (*Panulirus interruptus* - PDB: 1HC2), die oxygenierte Struktur der funktionellen Einheit des Mollusken-Hämocyanins aus *Octopus dofleini* (PDB: 1JS8), sowie die Strukturen der Pro-Phenoloxidase aus dem Tabakschwärmer *Manduca sexta* (PDB: 3HHS) und der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* (PDB: 3NM8). In allen Fällen waren Wassermoleküle im unmittelbaren Umfeld der Kupferatome zu finden. Die Farbcodierung in den Darstellungen entspricht den Angaben in Tabelle 10. Alle dargestellten aktiven Zentren haben die gleiche Orientierung. Dazu wurde das aktive Zentrum für die oxygenierte Struktur aus *Limulus polyphemus* initial so ausgerichtet, dass alle relevanten Strukturen gut dargestellt werden konnten. Anhand dessen erfolgte dann auch die Ausrichtung der anderen verwendeten aktiven Kupferzentren.

Abbildung 58 und Abbildung 59 stellen einen Vergleich der verschiedenen aktiven Zentren dar. Abbildung 58 zeigt dabei alle vier hier behandelten Kupferzentren in der „reduzierten Darstellung“ (linke Spalte). Zusätzlich zeigt die rechte Spalte die van-der-Waals-Radien der Wassermoleküle, sowie Teile der Sekundärstruktur als Bänderdarstellung. Der Vergleich soll die räumlichen Ausmaße der beiden Darstellungsmöglichkeiten verdeutlichen. Abbildung 59 zeigt die Abstände zwischen den Kupfer- und Wasseratomen anhand der vergrößerten „reduzierten Darstellung“. Sowohl in Abbildung 58 als auch in Abbildung 59 sind die Kupferzentren von *Panulirus interruptus*, *Octopus dofleini*, *Manduca sexta* und *Bacillus megaterium* in dieser Reihenfolge von oben nach unten dargestellt (A – D).

Ähnlich positionierte Wassermoleküle sind für alle aktiven Zentren vorhanden. Moleküle, die eine ähnliche Lage im Raum aufweisen, sind mit grünen und magentafarbenen Pfeilen gekennzeichnet. Die grün markierten Wassermoleküle weisen Abstände zu den Kupferatomen auf, die in allen hier besprochenen Strukturen Werte zwischen 5,3 Å und 6,2 Å aufweisen. Im Detail betragen die Abstände für *Panulirus interruptus* 5,3 Å und 5,4 Å, für *Octopus dofleini* jeweils 5,4 Å, für *Manduca sexta* 6,2 Å und 5,8 Å und für *Bacillus megaterium* 5,6 Å und 5,7 Å. Für die Wassermoleküle, die mit dem magentafarbenen Pfeil markiert sind, variieren die

Abstände zwischen 6,7 Å (*Maduca sexta*) und 7,7 Å (*Panulirus interruptus* – nicht eingezeichnet). Für *Octopus dofleini* beträgt der entsprechende Abstand 6,8 Å und für *Bacillus megaterium* 6,9 Å. Auf Grund der sehr ähnlichen Positionen scheint es so, als resultiere aus der Ähnlichkeit der aktiven Zentren und der umgebenden Proteinstruktur, zwangsläufig auch eine Konservierung der Position einiger Wassermoleküle in der Umgebung (zumindest im Kristall, wo das Fehlen dynamischer Prozesse eine eindeutige Ruheposition erzwingt).

Weiterhin auffällig ist die Lage eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum von *Manduca Sexta* (Abbildung 59). Dieses liegt direkt zwischen den beiden Kupferatomen und weist einen Abstand von 2,7 Å zum linken Kupferatom auf (Kupfer A) und einen Abstand von 2,5 Å zum rechten Kupferatom (Kupfer B). Ähnlich geringe Abstände zwischen Wassermolekülen und Kupferatomen sind auch für das aktive Zentrum aus *Bacillus megaterium* zu finden. Dort liegen sogar zwei Wassermoleküle vor, die einen Abstand von unter 3 Å zu den Kupferatomen aufweisen. Die entsprechenden Abstände sind in Abbildung 59 mit den Ziffern 1, 8 und 9 markiert. Außerdem ist ein weiteres Wassermolekül dargestellt, welches Abstände von 3,0 Å und 3,5 Å zu den Kupfern aufweist (Ziffern 5 und 6 - Abbildung 59). Eine unmittelbare Beeinflussung der Metallatome durch so positionierte Wasser scheint durchaus plausibel.

Für die Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* liegen, im Vergleich zu den andern hier betrachteten Strukturen, die meisten Wassermoleküle im und unmittelbar um das aktive Zentrum vor. Insgesamt sind 16 Abstände zwischen Wassermolekülen und den Kupferatomen zu finden, die im Bereich unter 7 Å liegen (Abbildung 58 und Abbildung 59 jeweils Bild D). Wie in Abbildung 58 (D) gut zu erkennen ist, nehmen die Wassermoleküle sehr viel Raum ein und es sieht so aus, als würden sie den kompletten Bereich vor und am Eingang zum aktiven Zentrum einnehmen. Alle mit Nummern gekennzeichneten Abstände sind in der Tabelle in Abbildung 59 (D) aufgeführt.

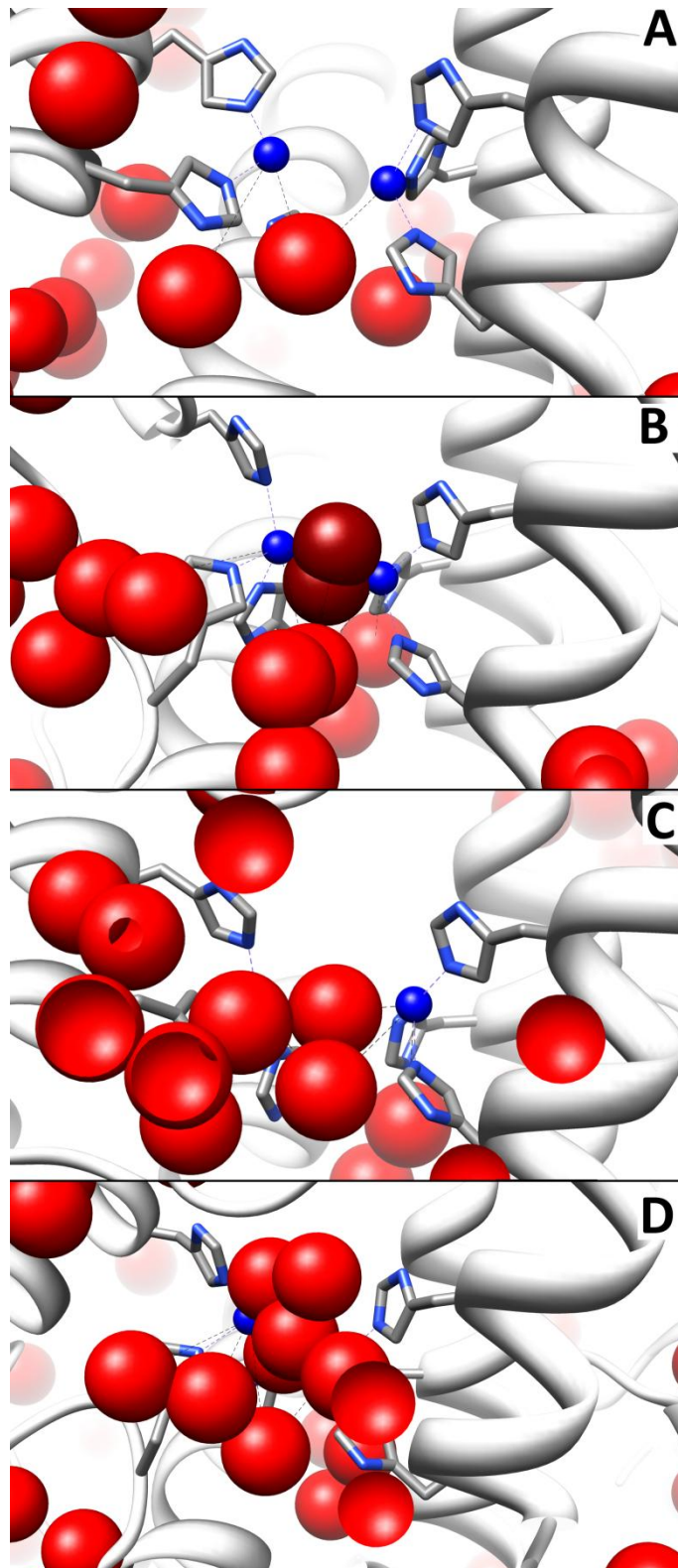


Abbildung 58: Kupferzentren von *Panulirus interruptus*, *Octopus dofleini*, *Manduca sexta* und *Bacillus megaterium* (A - D). Wassermoleküle sind rot eingefärbt und mit ihren Van-der-Waals-Radien eingezeichnet. Außerdem sind Teile der Sekundärstruktur in der Bänderdarstellung gezeigt, um die räumlichen Dimensionen zu verdeutlichen.

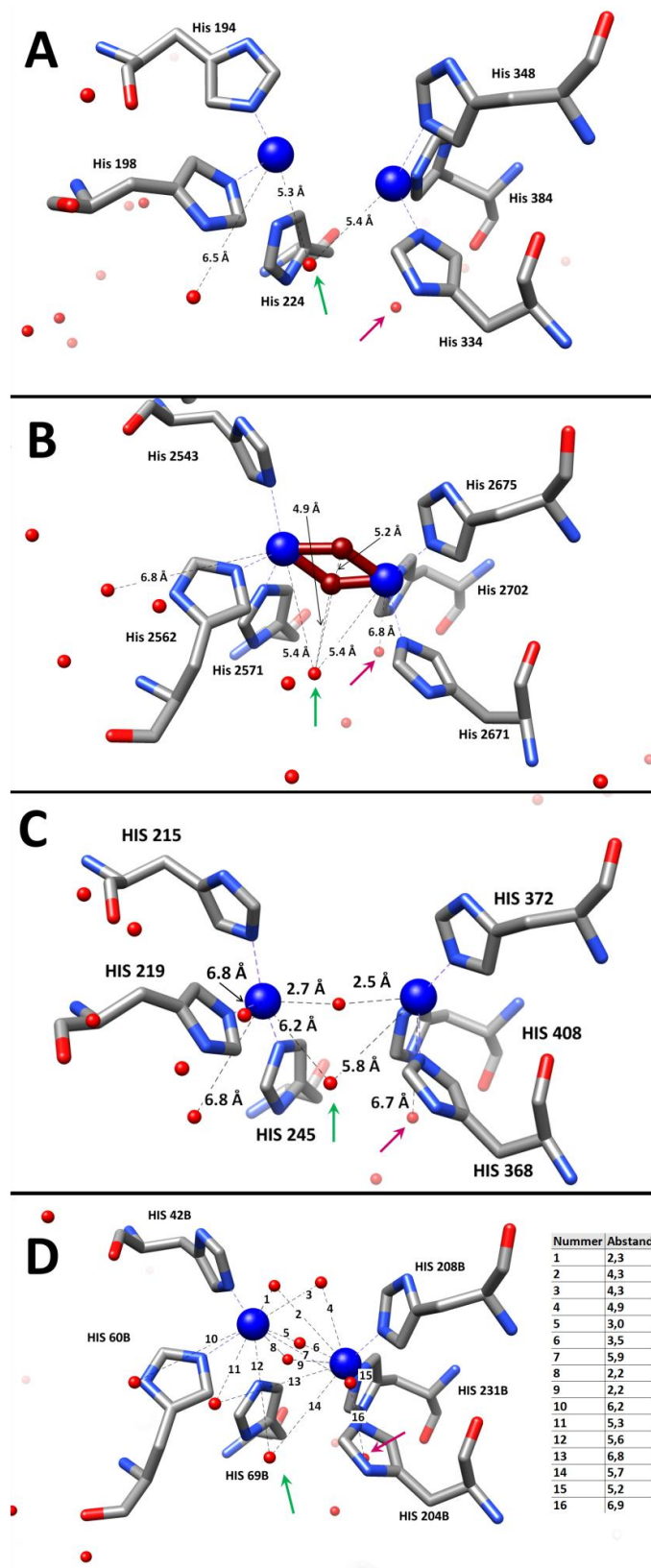


Abbildung 59: Kupferzentren von *Panulirus interruptus*, *Octopus dofleini*, *Manduca sexta* und *Bacillus megaterium* (A - D). Die grünen und magentafarbenen Pfeile markieren Wassermoleküle, die in allen hier gezeigten Strukturen eine relativ ähnliche Lage aufweisen. In allen Fällen entspricht das linke Kupferatom dem Kupfer A und das rechte dem Kupfer B.

### 5.2.3 Zugänglichkeit von Wassermolekülen aus dem Lösungsmittel an das aktive Zentrum

Es ist möglich, dass durch eine Passage in der Proteinmatrix, welche auch als Zugang für die Sauerstoffmoleküle dient, Wassermoleküle ins Innere des Proteins gelangen, und so das aktive Zentrum erreichen. In Abbildung 60 und Abbildung 61 ist eine Bildfolge von sechs Bildern dargestellt (A – C bzw. D - F), die eine mögliche Passage für Wassermoleküle durch die Proteinmatrix anhand der oxygenierten Struktur aus *L. polyphemus* verdeutlicht (PDB: 1OXY). Die Abbildungen zeigen den Zugang vom äußersten Punkt der Proteinmatrix zum mit Sauerstoff besetzten aktiven Kupferzentrum im Innern. In jeder Darstellung (A – F) ist eine Ansicht auf das ganze Molekül (links), eine vergrößerte Darstellung des links markierten Bereichs (Mitte), sowie die Position der Schnittebene durch das Protein (rechts) dargestellt. Mittels dieser Darstellungsweise kann der Weg der Wassermoleküle durch das Protein zum aktiven Zentrum hin relativ gut verfolgt werden. Die gelben vertikalen Linien in den Seitenansichten markieren dabei den erfassten Bereich und die Schnittebene wird durch die jeweils linke vertikale gelbe Linie definiert. Diese wandert in der Reihenfolge von A nach F durch das Protein, während die rechte Linie konstant an der gleichen Position bleibt.

Die pinken Pfeile in den Darstellungen A bis C zeigen den ersten Abschnitt der möglichen Passage des Wassers durch das Protein. Im Anschluss an die in Darstellung (C) gezeigte Position im Protein, scheint der Zugang leicht abzuknicken und sich etwas weiter links, bis zum aktiven Zentrum fortzusetzen (grüner Pfeil - C bis E). In Abbildung 61 ist dann bereits ein Histidin des aktiven Zentrums zu sehen (blauer Pfeil - D). Darstellung (E) verdeutlicht die Fortsetzung der Wasser-Passage (grüner Pfeil), und in Abbildung 59 (F) wird das aktive Zentrum mit dem gebundenen Peroxid-Molekül sichtbar (blauer Pfeil). Ausgehend von diesen Darstellungen könnte eine mehr oder weniger durchgängige Passage für Wassermoleküle durch die Proteinmatrix vorliegen. Zu beachten ist, dass es sich um kristallines Wasser handelt, welches seine Position innerhalb des Proteins *in vivo* verändern, und somit höchstwahrscheinlich noch mehr Positionen auf dem Weg durch die Passage besetzen kann. Um die hier gemachten Annahmen noch zu verdeutlichen, ist in Abbildung 62 eine weitere Darstellung der möglichen Passage aufgezeigt. In dieser Abbildung wird im oberen Bild nur das aktive Zentrum, sowie die kristallinen Wassermoleküle dargestellt (Abbildung 62 – A), im unteren Bild ist zusätzlich die Sekundärstruktur als Bänderdarstellung eingezeichnet. Die gelben Pfeile verdeutlichen den Verlauf der möglichen Wasserpassage durch die Proteinmatrix.

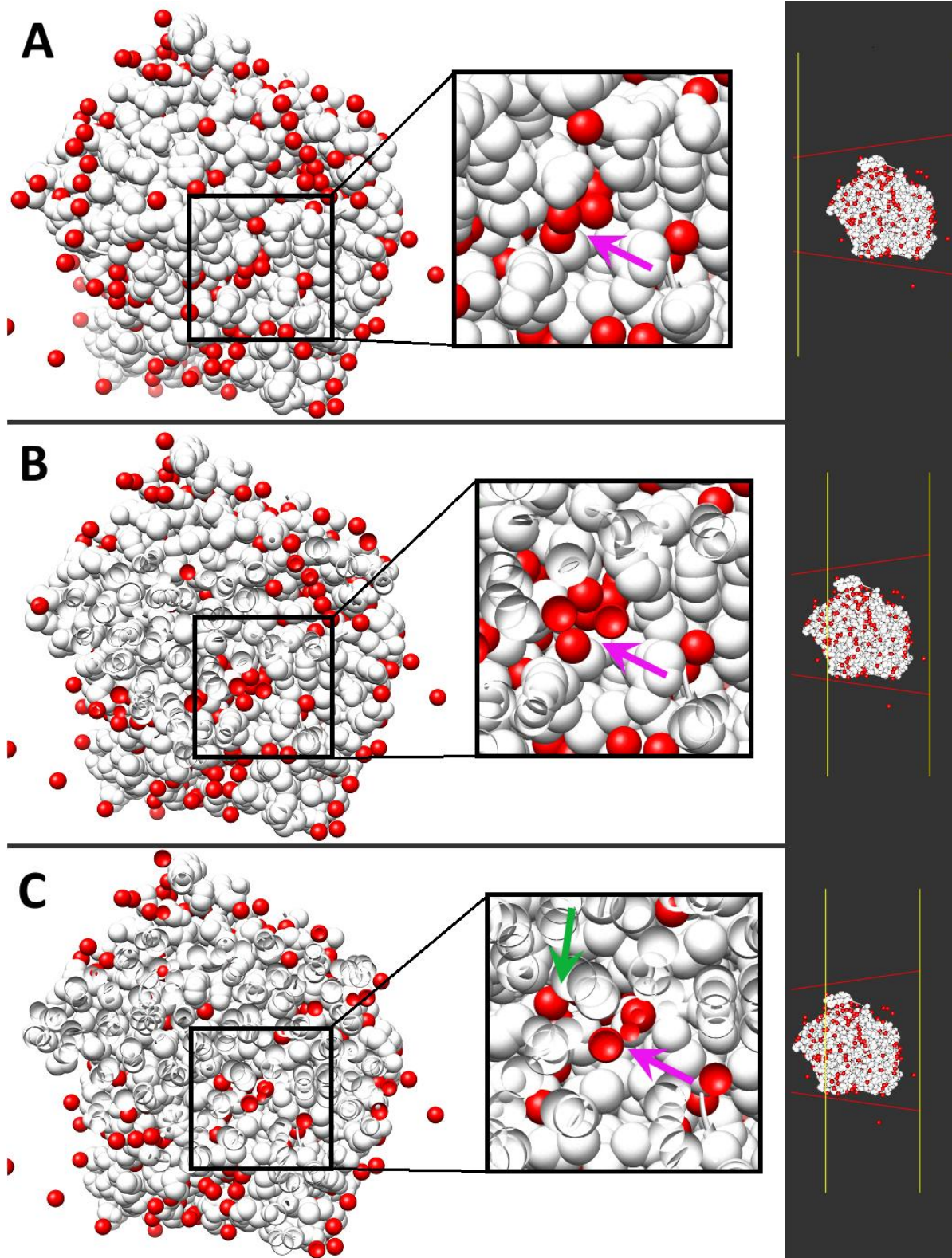


Abbildung 60: Darstellung der möglichen Wasserpassage durch die Proteinmatrix des oxygenierten Hämocyanins aus *Limulus polyphemus*. Die Bilder zeigen verschiedene Schnittebenen durch das Protein und die Pfeile markieren die beteiligten Wassermoleküle. Ganz rechts sind jeweils die Seitenansichten der Darstellungen und die entsprechende Schnittebene im Protein gezeigt. Die Bildfolge beginnt an der Außenseite und erstreckt sich ins Innere des Proteins (A – C).

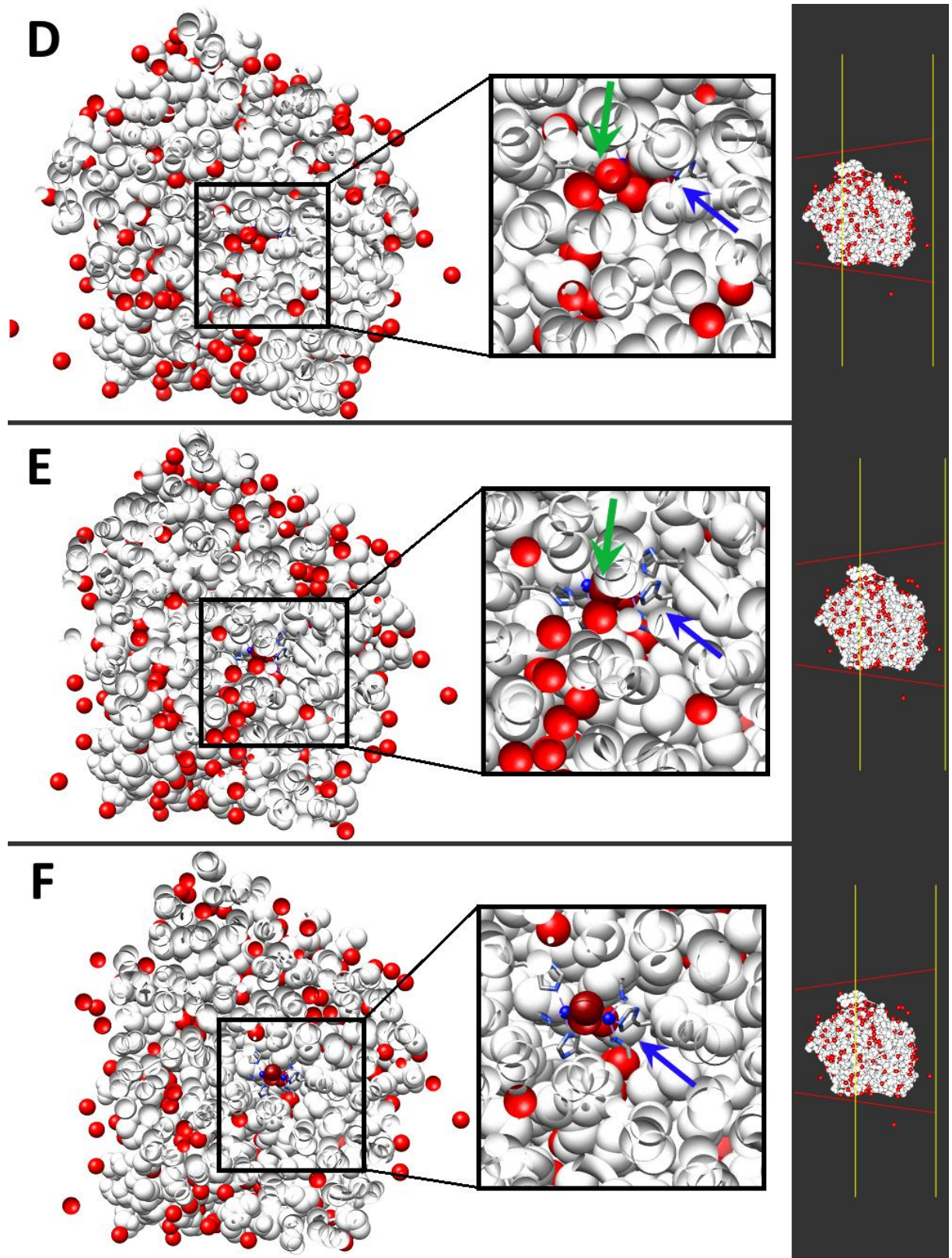
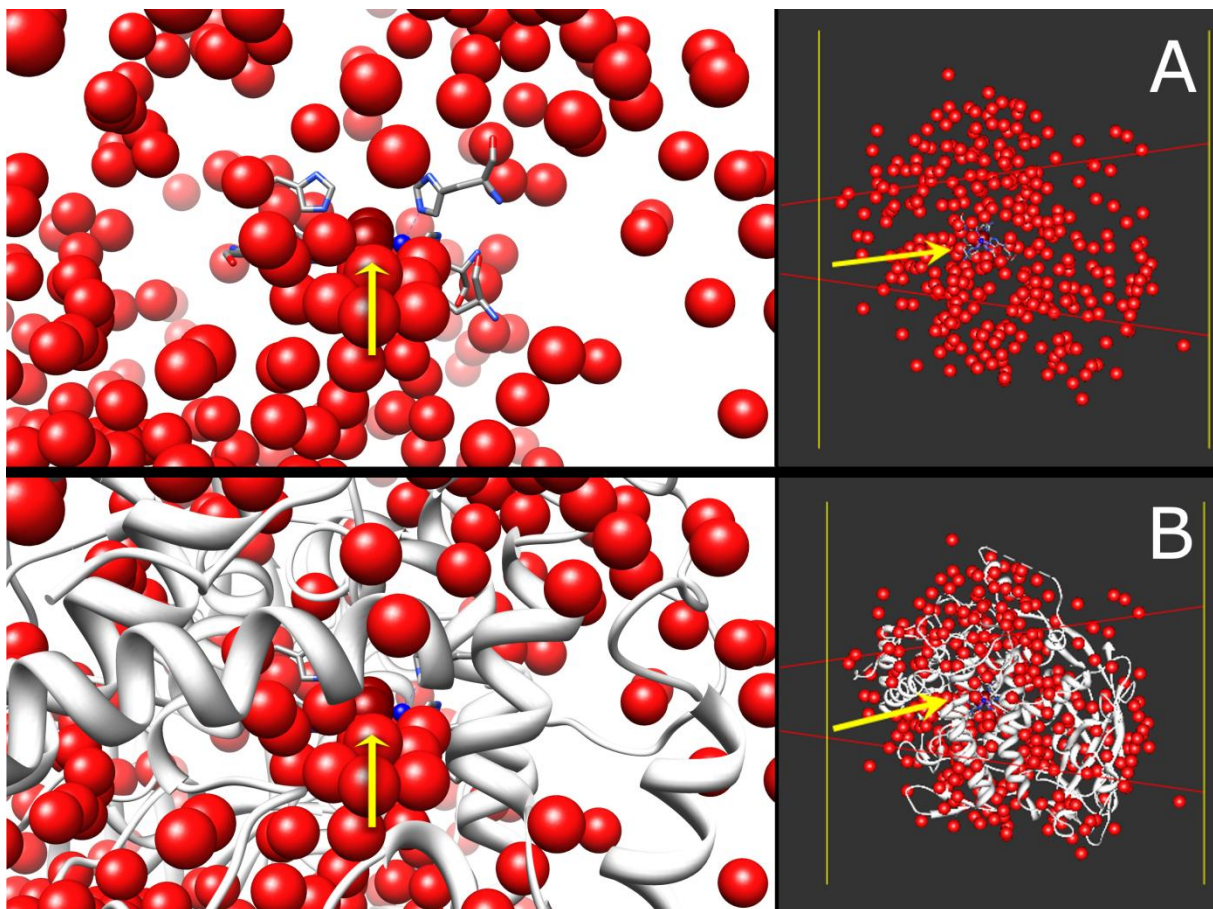


Abbildung 61: Darstellung der möglichen Wasserpassage durch die Proteinmatrix des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus*. Die Bilder zeigen ebenfalls verschiedene Schnittebenen durch das Protein und die Pfeile markieren die beteiligten Wassermoleküle. Die Bildfolge schließt an die letzte Darstellung in Abbildung 60 (C) an und erstreckt sich bis zum aktiven Zentrum (D – E).

Dabei sind dieselben kristallinen Wassermoleküle gezeigt wie schon in Abbildung 60 und Abbildung 61. In Abbildung 62 ist die Verteilung der Wassermoleküle um das aktive Zentrum und innerhalb der Proteinmatrix gut zu sehen. Der eingezeichnete Bereich erscheint am plausibelsten, um eine mögliche Passage durch das Protein zu erklären. Die gezeigten Wassermoleküle entlang des gelben Pfeils ergeben ein relativ durchgängiges Band, welches bis unmittelbar ins aktive Zentrum reicht, und ansonsten in dieser Form nicht in dieser Kristallstruktur zu finden war.



**Abbildung 62:** Darstellung des oxygenierten aktiven Zentrums aus *Limulus polyphemus* mit allen kristallinen Wassermolekülen (PDB: 1OXY). Bild (A) zeigt die Ansicht ohne Sekundärstrukturelemente und Darstellung (B) mit den Sekundärstrukturelementen in der Bänderdarstellung. Rechts ist jeweils eine Seitenansicht gezeigt. Die gelben Pfeile beschreiben die Abfolge der kristallinen Wassermoleküle die eine mögliche Wasserpassage durch die Proteinmatrix ausbilden.

## 6 Diskussion Hämocyanin

### 6.1 Interpretation der Hämocyanin-Spektren

Wie die in Abschnitt 5.1.2.1 und Abbildung 50 beschriebenen Resultate zeigen, können die beiden Zustandsformen des untersuchten Hämocyanins (Oxy- & Deoxy-Zustand) mittels Röntgen-L-Kantenspektroskopie an der Kupfer-L<sub>2/3</sub>-Kante sehr gut voneinander unterschieden werden. Die mit dieser Methode für die beiden Beladungszustände erhaltenen Spektren unterscheiden sich deutlich in Ausprägung und Position ihrer jeweiligen Absorptionsmaxima. Somit war es erstmals möglich verschiedene Beladungszustände eines Typ-3-Kupferproteins unter physiologisch ähnlichen Bedingungen anhand seiner röntgenspektroskopischen Signatur an der L-Kante zu differenzieren. Zuvor war nur das Eisen-Zentrum von Hämoglobin in einem Zustand erfolgreich unter physiologischen Bedingungen an der entsprechenden Eisen-L<sub>2/3</sub>-Kante mit dieser Methode untersucht worden [9]. Unsere Ergebnisse verdeutlichen somit, dass sich Röntgen-L-Kanten-Spektroskopie für Untersuchungen an Übergangsmetallen, wie sie Metalloproteine enthalten, sehr gut eignet.

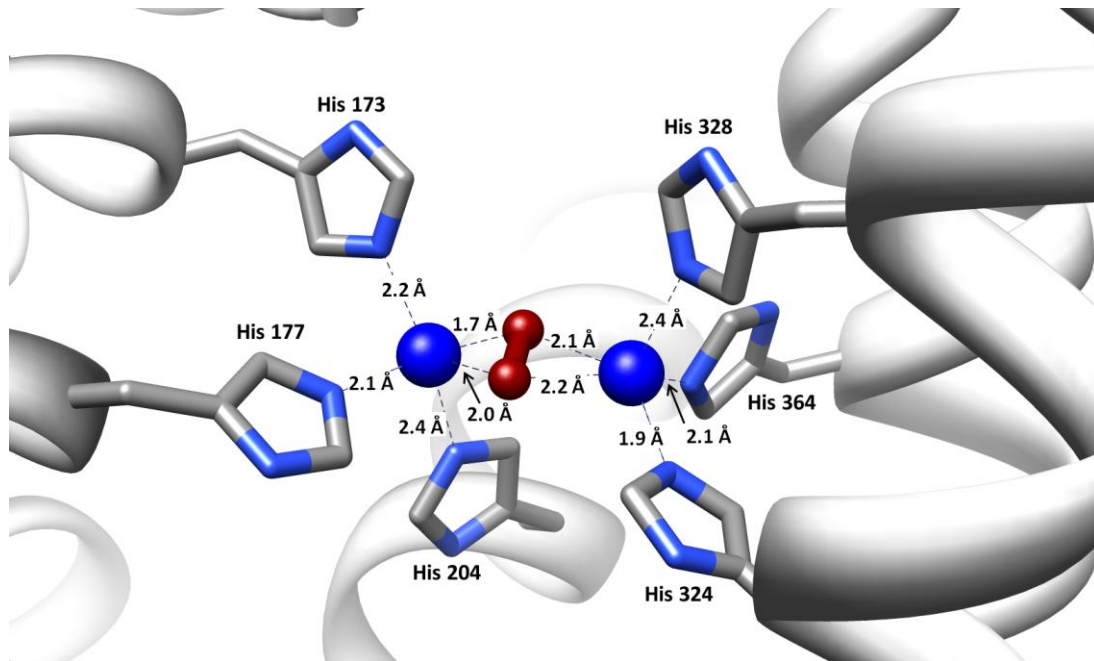
#### 6.1.1 Oxygeniertes Hämocyanin

Abbildung 50 zeigt das Spektrum für oxygeniertes Hämocyanin aus *Homarus americanus* und demonstriert, wie sich die Sauerstoffbeladung des Proteins an der L-Kante auswirkt. Der deutlich ausgeprägte Peak bei 932eV, die sogenannte „White line“, ist charakteristisch für einen Elektronenübergang vom 2p<sub>3/2</sub>-Orbital des zweiwertigen Kupfers in dessen nicht vollständig besetztes 3d-Orbital (3d<sup>9</sup>) (Abbildung 64), wie Vergleiche mit Messungen an der Kupfer-L-Kante von anderen Kupfer-II-Komponenten zeigen [214,215,216]. Dieses Resultat war sehr gut vereinbar mit dem postulierten Kupfer-II-Zustand für oxygeniertes Hämocyanin [63,211,217,218] und entsprach somit den Erwartungen.

Außerdem war für den Peak bei 932eV eine Schulter zu niedrigeren Energien hin zu erkennen, die auf einen weniger stark ausgeprägten Peak bei ca. 931eV zurückzuführen ist, der vom Hauptpeak bei 932eV überlagert wurde. Dieser zusätzlich auftretende zweite Peak bei ca. 931eV ist wahrscheinlich auf die leicht asymmetrische Koordination des als Peroxid gebundenen Sauerstoffs zwischen den Kupferatomen zurückzuführen[63] (Abbildung 63). Durch diese Variationen der Bindungsgeometrie der Kupferatome im aktiven Zentrum konnte es zum Auftreten zweier Absorptionspeaks für ein Element mit eigentlich gleichem Valenzzustand kommen. In unserem Fall traten zwei sehr eng beieinanderliegende Peaks bei 931eV und 932eV auf. Zusätzlich zum asymmetrisch gebundenen Peroxid konnte dabei auch die leicht unterschiedliche Koordination der beiden Kupferatome durch die Histidine im aktiven Zentrum eine Rolle gespielt haben. In diesem Zusammenhang sind die Abstände zu den Kupferatomen, sowie die Winkel- bzw. Raumgeometrie der Komponenten des aktiven Zentrums, ein wichtiger Faktor. Auf Grund der fehlenden Kristallstruktur für das Hämocyanin aus *Homarus americanus* wurde anhand der bekannten Struktur des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus* eine Darstellung des oxygenierten Kupferzentrums erstellt (PDB: 1OXY). Die Histidine His 173, His 177 und His 204 koordinieren das Kupferatom A, wobei die Bindungslängen 2,2 Å, 2,1 Å und 2,4 Å betragen. His 328, His 364 und His 324 koordinieren das Kupferatom B mit Bindungslängen von 2,4 Å, 2,1 Å und 1,9 Å. Zwischen den Kupfern und dem gebundenen Peroxid variieren die Abstände ebenfalls. Kupferatom A weist Abstände zu den beiden Sauerstoffatomen des Peroxids auf, die 1,7 Å bzw. 2,0 Å betragen, für Kupferatom B betragen die Abstände dagegen 2,1 Å und 2,2 Å. Die auftretenden Variationen sind zwar nicht sehr stark, eine Asymmetrie in der Koordination der Kupfermoleküle im aktiven Zentrum ist dennoch eindeutig. Alle hier besprochenen Abstände und Bindungslängen zwischen Histidinen, den Kupferatomen und dem Sauerstoffmolekül des aktiven Zentrums sind in Abbildung 63 dargestellt. Da die gezeigte Koordination des aktiven Zentrums sich nicht auf das Hämocyanin aus *Homarus americanus* bezieht, sondern die Kristallstruktur aus *Limulus polyphemus* als Grundlage verwendet, konnte nicht sicher festgestellt werden, wie die Kupferatome und das Peroxid-Molekül im aktiven Zentrum des Hummers koordiniert sind. Da es sich allerdings in beiden Fällen um ein Arthropoden-Hämocyanin handelt, kann von einer zumindest ähnlichen Anordnung ausgegangen werden [64,77].

Auf Grund dieser Asymmetrie variierte der Valenzzustand des Kupfers über die Gesamtheit der erfassten Hämocyanin-Moleküle leicht, und es kam zum Auftreten der beiden sich in ihrer Lage leicht unterschiedlichen Peaks bei 931eV und 932eV. Ob dies für alle aktiven Zentren der detektierten Proteine der Fall war ist nicht sicher. Möglicherweise trat eine solche Koordination

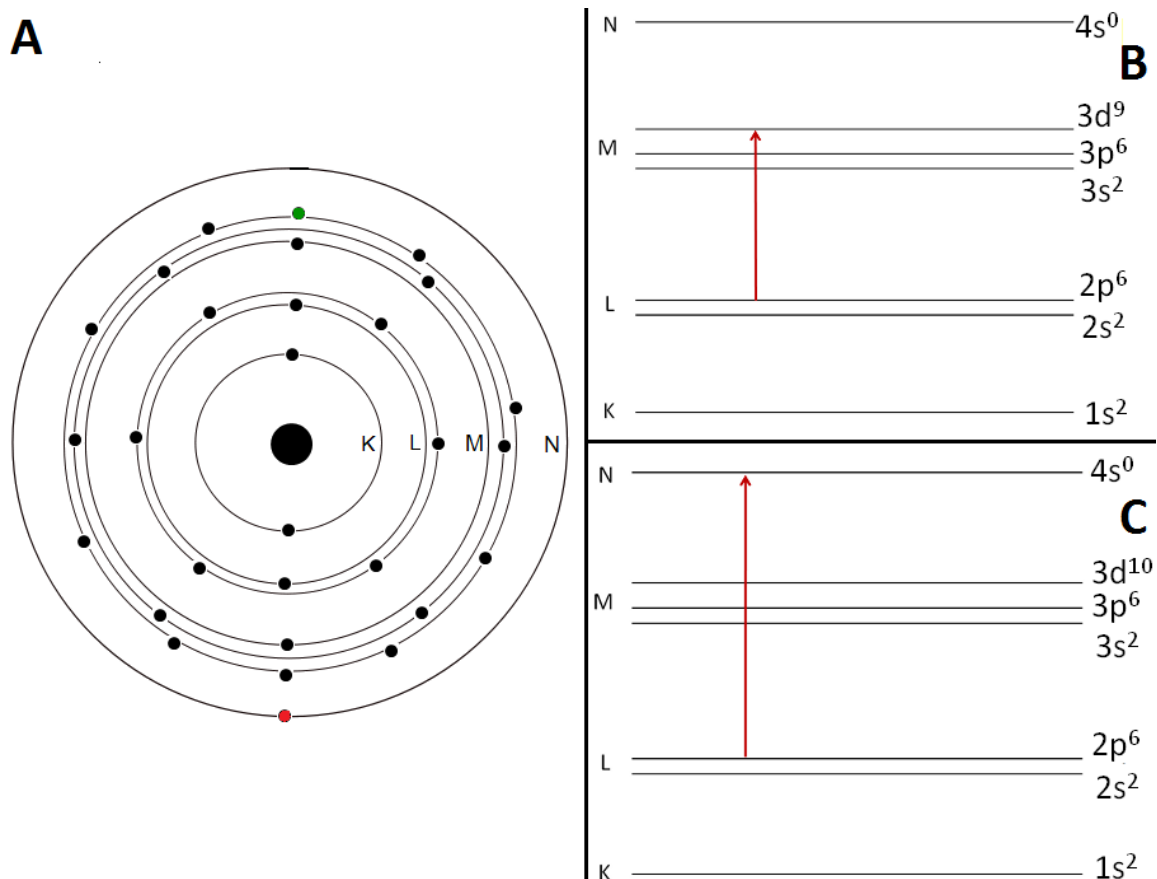
nur bei einem gewissen Prozentsatz der in das Signal eingegangenen Hämocyanine auf, was auch die unterschiedlich starke Ausprägung der beiden Peaks verständlicher machen würde.



**Abbildung 63: Sauerstoffbeladenes aktives Zentrum aus *Limulus polyphemus*.** Dargestellt sind die sechs Histidine des aktiven Zentrums und ihre Abstände zu den Kupferatomen (blaue Kugeln), sowie die Distanz zwischen den Kupfern und den beiden Sauerstoffen des gebundenen Peroxids (dunkelrot). Die unterschiedlichen Abstände deuten sehr stark auf eine asymmetrische Bindungsgeometrie der beiden beteiligten Kupferatome hin (PDB-Code: 1OXY; [63]).

### 6.1.2 Deoxygeniertes Hämocyanin

Im Spektrum für das deoxygenierte Hämocyanin traten im Gegensatz zum oxygenierten Zustand zwei deutlich ausgeprägte und von ihrer Position gut unterscheidbare Peaks bei 932eV und 937eV auf. Die verbreiterte Peak-Struktur um 937 eV ist charakteristisch für monovalentes Kupfer wie Vergleiche mit Messungen an der Kupfer-L-Kante von anderen Kupfer-I-Komponenten zeigen [214]. Hier kommt es zur Anregung eines Elektrons aus dem p-Orbital, in das nicht vollständig besetzte 4s-Orbital des Kupfers. Die Elektronenkonfiguration von einwertigem Kupfer weist eine vollbesetzte d-Schale auf ( $3d^{10}$ ), wodurch ein Elektronenübergang aus einem der unteren p-Orbitale in die d-Schale verboten ist (Abbildung 64 Bild C).



**Abbildung 64: Schematische Darstellung der Elektronenverteilung im Kupferatom und der möglichen Elektronenübergänge.** Bild A zeigt die Elektronenverteilung für ein Kupferatom. Die kleinen schwarzen Punkte stellen die Elektronen dar. Die Linien die einzelnen Schalen und deren unterschiedliche Orbitale. Für den Kupfer-II-Zustand liegen nur 27 Elektronen auf den Schalen verteilt vor, was den schwarzen Punkten entspricht. Für den Kupfer-I-Zustand liegen 28 Elektronen vor (schwarze Punkte und der grüne Punkt). Atomares Kupfer hätte 29 Elektronen (schwarze Punkte, roter Punkt und grüner Punkt). Die Bilder B & C zeigen die möglichen Elektronenübergänge aus dem p-Orbital der L-Schale ins d-Orbital der M-Schale (Kupfer-II-Zustand / Bild B) sowie aus dem p-Orbital der L-Schale ins s-Orbital der N-Schale (Kupfer-I-Zustand / Bild C).

Der Peak bei 932eV, für den ein solcher Übergang aus einem p-Orbital in ein d-Orbital des Kupfers typisch ist, und der auch im oxygenierten Spektrum auftritt, stellt ein Charakteristikum für zweiwertiges Kupfer dar. Für das hier besprochene deoxygenierte Hämocyanin, welches in der klassischen Betrachtungsweise als einwertiges Kupfer postuliert wird, war sein Auftreten unerwartet. Genauso verhält es sich für den verbreiterten Peak bei 937eV. Dieser konnte durch Ladungstransferprozesse zwischen dem Übergangsmetall und einem Liganden, wie er für andere Übergangsmetalle (Kupfer, Nickel) in der Literatur beschrieben ist [219], erklärt werden. Für ein Kupferzentrum ohne Ligand, wie es in der klassischen Betrachtung für die deoxygenierte Form des Hämocyanins beschrieben wird, sollte auf Grund des fehlenden Interaktionspartners ein

solcher Prozess nicht erfolgen. Wasser als Interaktionspartner für einen Ladungstransfer der Kupferatome wurde bis dato nicht in Erwägung gezogen, und der hier beschriebene Mischzustand aus Kupfer I und Kupfer II wurde wahrscheinlich auf Grund der bisher bestehenden technischen Limitierung nicht aufgezeigt.

### **6.1.3 Ursache der ungewöhnlichen Signatur des deoxygenierten Hämocyanins**

Verschiedene Ursachen für das Auftreten dieser ungewöhnlichen spektralen Signaturen für die deoxygenierte Hämocyanin-Lösung waren denkbar. Zum einen war es möglich, dass die untersuchten Lösungen nicht vollständig vom Sauerstoff befreit waren, und deshalb eine Mischform zwischen Oxy- und Deoxy-Zustand vorlag. Zum anderen musste die Ausbildung des Met-Zustandes, möglicherweise durch Fotooxidation oder durch chemische Prozesse in der Protein-Lösung, in Erwägung gezogen werden. Auch das Auftreten von Strahlenschäden durch die eingesetzte Röntgenstrahlung musste überprüft werden. Weiterhin war es denkbar, dass die klassische Betrachtungsweise eines reinen Kupfer-I-Zustandes für die deoxygenierte Form des Hämocyanins nicht zutreffend ist.

#### ***6.1.3.1 Mögliche unvollständige Deoxygenierung der Hämocyanin-Lösungen***

Wie in Kapitel 5 beschrieben, wurden zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt, um die Hämocyanin-Lösungen vom Sauerstoff zu befreien und den deoxygenierten Zustand herzustellen. Zum einen wurde die Lösung durch Zugabe von Natriumdithionit vollständig vom Sauerstoff befreit, zum anderen wurde sauerstoffbeladenes Hämocyanin innerhalb der Messkammer unter Heliumatmosphäre vollständig deoxygeniert. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 51 dargestellt und unterscheiden sich nur unwesentlich. Es treten in beiden Fällen vier Hauptpeaks bei 932eV und 937eV, sowie bei 952eV und 957eV auf, wobei die ersten beiden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, auf Elektronenübergänge zwischen dem  $2p_{3/2}$ -Orbital und dem 3d-Orbital, sowie dem  $2p_{3/2}$ -Orbital und dem 4s-Orbital des Kupfers zurückzuführen

sind. Im Falle der Peaks bei 952eV und 957eV kommt es zu Übergängen zwischen dem  $2p_{1/2}$ -Orbital und dem 3d-Orbital bzw. dem  $2p_{1/2}$ -Orbital und dem 4s-Orbital. Diese sehr ähnlichen Übergänge resultieren aus der Spin-Bahn-Aufspaltung des angeregten p-Orbitals des Kupfers.

Für beide durchgeführten Deoxygenierungs-Verfahren erfolgte ein Farbumschlag der Hämocyanin-Lösung von blau zu klar und durchsichtig. Dies ist ein einfach zu überprüfender und deutlicher Indikator, dass eine vollständige Deoxygenierung erfolgte. Weiterhin war davon auszugehen, dass sich die beiden Spektren, bei unvollständigem Sauerstoffentzug durch eines der beiden Verfahren, voneinander unterscheiden müssten. Wären dagegen beide Verfahren zur Deoxygenierung unzureichend, sollten als Folge Lösungen entstehen, die unterschiedliche Restanteile von Sauerstoff enthalten. Auch in diesem Fall müssten sich die erhaltenen Spektren unterscheiden, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass durch zwei abweichende Prozesse des Sauerstoffentzugs, zwei gleichermaßen unvollständig deoxygenierte Lösungen hergestellt wurden. Die Möglichkeit, dass durch die Zugabe des Natriumsalzes Natriumdithionit eine schädigende Wirkung auf das Kupferzentrum auftrat, kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Auch in diesem Fall hätten die Spektren voneinander abweichen müssen, da die Chemikalie nur in einer der beiden Lösungen vorlag. Somit kann sowohl ein unvollständige Deoxygenierung, als auch eine Schädigung des aktiven Zentrums durch das Natriumdithionit als Ursache für das Auftreten des Kupfer-II-typischen Peaks bei 932eV weitestgehend ausgeschlossen werden.

### ***6.1.3.2 Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Hämocyanin-Proben***

Ein weiterer möglicher Faktor, der zu einer Schädigung der Struktur des Proteins und speziell des aktiven Zentrums geführt haben könnte, war die eingesetzte Röntgenstrahlung. Durch Aufnahmen von Serienmessungen über einen Zeitraum von 2,5 Stunden sollte dieser Einfluss getestet werden. Wie die erhaltenen Spektren in Abbildung 52 zeigen, kommt es zu keinerlei Veränderungen der Spektren im Verlauf der Messungen. Läge ein schädigender Einfluss der Röntgenstrahlung auf die Kupferatome des aktiven Zentrums vor, müssten sich mit zunehmender Messdauer Veränderungen zeigen. Weiterhin waren die eingesetzten Hämocyanin-Lösungen im Anschluss an die Messungen reoxygenierbar, was ebenfalls gegen eine Schädigung des aktiven Zentrums spricht, da die Sauerstoffkoordination in den aktiven Zentren demnach noch erfolgte.

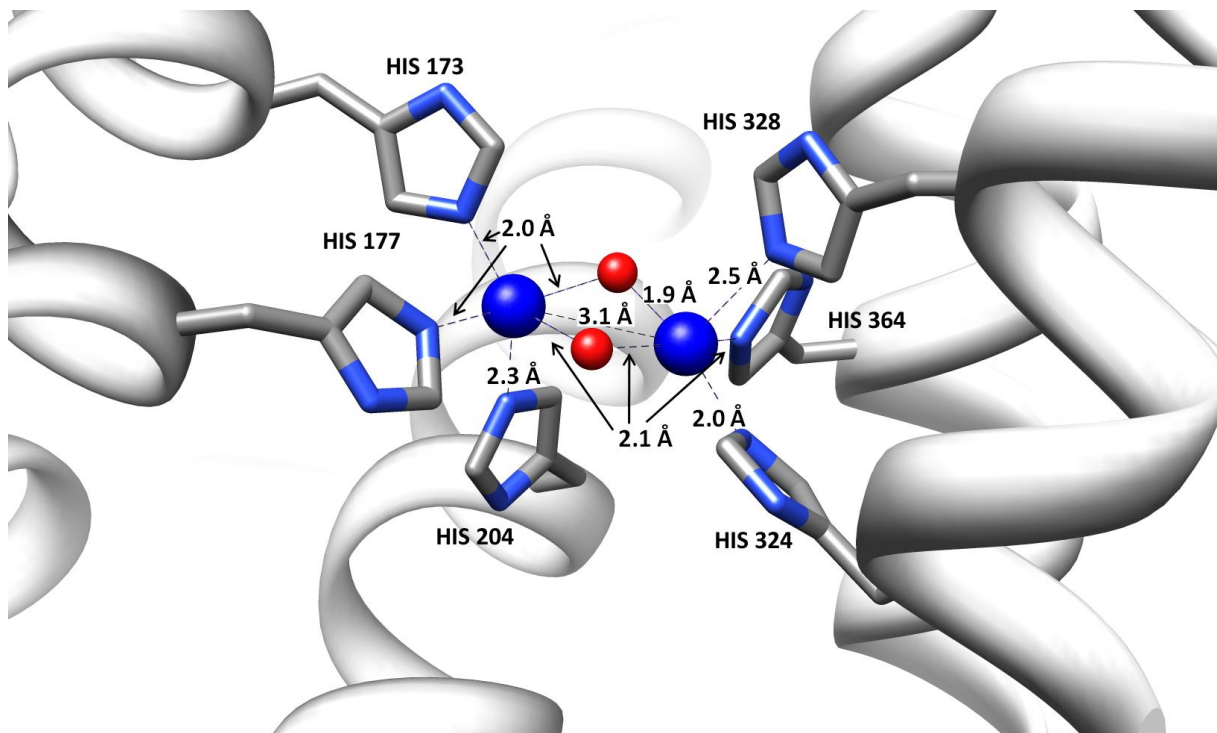
Auch in der Literatur finden sich Befunde, dass ein solcher schädigender Einfluss nicht auftrat bzw. nicht detektierbar war. Untersuchungen von sauerstoffbeladenem Mollusken-Hämocyanin mit Röntgen-Nahkanten-Spektroskopie an der Kupfer-K-Kante lieferten entsprechende Resultate [111,112]. Die für deren Versuche verwendete Röntgenstrahlung zur Anregung der Elektronen der K-Kante (Energiebereich: 8900 – 9100 eV) lag in einem deutlich energetischeren Bereich, als die in unseren Versuchen eingesetzte Röntgenstrahlung zur Untersuchung von Übergängen an der L-Kante (Energiebereich: 920 – 970 eV). Die Tatsache, dass selbst bei Bestrahlung von sehr ähnlichen Proteinproben (Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanine) mit einer, im Vergleich zu unseren Versuche zehnfach höheren Energie, keine Schädigungen detektiert wurden [111,112], kann ebenfalls als Indiz angesehen werden, dass ein Einfluss der Röntgenstrahlung vernachlässigbar ist

### **6.1.3.3 *Ausschluss des Met-Zustandes***

Eine weitere mögliche Ursache für die ungewöhnliche Signatur im Deoxy-Spektrum war die Ausbildung des Met-Zustandes der Hämocyanine. Diese Form ist in der Literatur beschrieben [220,221,222] und bildet eine wichtige Zwischenstufe komplexer Redox-Prozesse des zweikernigen Kupferzentrums [222], welches in der Folge nicht mehr in der Lage ist Sauerstoff zu binden. Zur gezielten Herstellung dieser Situation am aktiven Kupfer-Zentrum kann eine Lösung mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) eingesetzt werden [223]. Dabei kommt es zu einer Zwei-Elektronen-Oxidation des zweikernigen Kupferzentrums im Deoxy-Zustand durch das Peroxid [220,221,222]. Dieser Vorgang ist nur für Arthropoden-Hämocyanine praktikabel, da der Met-Zustand der Mollusken-Hämocyanine durch eine Folgereaktion mit einem weiteren Peroxid-Molekül in den Oxy-Zustand zurückgeführt wird [222], was für Arthropoden-Hämocyanine nicht bzw. nicht ohne weiteres möglich ist [224,115]. Für Arthropoden-Hämocyanine ist dieser Schritt nur mit Hilfe bestimmter chemischer Komponenten durchführbar ( $H_2S$ , HCN) und beansprucht zusätzlich große Zeiträume von bis zu 48h [224]. Im Fall der Mollusken-Hämocyanine ist dieser Prozess auf die bekannte Katalase-ähnliche Aktivität dieser Proteinklasse zurückzuführen [225,221], welche für Arthropoden-Hämocyanine nicht auftritt. Um Mollusken-Hämocyanine in eine stabile Met-Form zu überführen, muss eine Langzeitinkubation (60h) mit Wasserstoffperoxid durchgeführt werden, wobei gleichzeitig Azid oder Fluorid in der Lösung

vorliegen müssen [226]. Azid scheint allgemein einen Einfluss auf das aktive Zentrum von Mollusken-Hämocyaninen zu haben [226] und auch eine Rolle bei der Entstehung der Met-Form dieser Proteingruppe zu spielen. Für Arthropoden-Hämocyanine liegt ein solcher Einfluss allerdings nicht vor [224,227]).

Röntgenkristallographische Daten für den Met-Zustand eines Arthropoden-Hämocyanins sind ebenfalls in der Proteindatenbank zu finden. Die hinterlegte Struktur (PDB-Code: 1LL1) wurde 1997 von Magnus et al. in die Datenbank eingestellt und zeigt das aktive Zentrum von *Limulus polyphemus* im Met-Zustand (Abbildung 65). Eine dazugehörige Publikation lässt allerdings bis heute auf sich warten, wodurch keine genaueren Aussagen diese Struktur betreffend gemacht werden können.



**Abbildung 65: Röntgenstruktur des aktiven Zentrums von *Limulus polyphemus* im Met-Zustand.** Zwei Sauerstoffatome (rot) sind unmittelbar zwischen den Kupferatomen koordiniert, jedoch nicht als Peroxid. Diese sind entweder zwei Hydroxyl-Gruppen oder zwei Wassermolekülen zuzuordnen, die zwischen den beiden Kupfern koordiniert sind. Der Abstand zwischen den Kupferatomen beträgt hier 3,1 Å, und ist somit gegenüber der Oxy-Form um ca. 0,5 Å, und gegenüber der Deoxy-Form um ca. 1,5 Å verringert. (nach Magnus 1994 – PDB-Code: 1LL1).

In von uns gemachten und hier beschriebenen Versuchen wurde weder der Met-Zustand für das verwendete Arthropoden-Hämocyanin gezielt hergestellt, noch traten die beschriebenen

Eigenschaften einer Met-Hämocyaninlösung, wie eine grünliche Verfärbung [224,109], auf. Auf Grund dieser Zusammenhänge kann das Auftreten eines Met-Zustandes für die von uns verwendeten Versuche ausgeschlossen werden. Des Weiteren war eine Reoxygenierung der Hämocyanin-Lösungen an Raumluft möglich und die charakteristische Blaufärbung des Oxy-Zustands erfolgte. Es kann als davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Proteinlösungen den oxygenierten bzw. den deoxygenierten Zustand widerspiegeln und kein Met-Zustand vorlag.

#### 6.1.4 Wasser als Ligand von Typ-3-Kupferzentren

Nach Ausschluss der von uns erwogenen möglichen Faktoren (unvollständige Deoxygenierung, Strahlenschäden, Met-Form) für das Auftreten des Kupfer-(II)-Anteils im Spektrum für die deoxygenierte Hämocyanin-Lösung musste eine andere Ursache in Erwägung gezogen werden. In diesem Zusammenhang war es sehr wahrscheinlich, dass die klassische Interpretation des reinen Kupfer-I-Zustandes für alle aktiven Zentren des deoxygenierten Hämocyanin nicht zutreffend sein kann. Da Wassermoleküle die vorherrschenden Moleküle innerhalb der Proteinlösung sind, ist es möglich, dass diese einen Einfluss auf das aktive Zentrum ausüben können, wenn kein Sauerstoff als Bindungspartner zur Verfügung steht. Durch eine Interaktion der Kupferatome mit den Wassermolekülen, wäre eine Hybridisierung der d-Orbitale des Kupfers mit den p-Orbitalen (LUMO – Lowest Unoccupied Molecular Orbital) der benachbarten Wassermoleküle die wahrscheinlichste Konsequenz. Dabei wird ein MLCT-Prozess (Metal to Ligand Charge Transfer) ermöglicht, wodurch das aktive Kupferzentrum im Spektrum als teilweise oxygeniert erscheint. Bei diesem Prozess können Elektronen aus den d-Orbitalen der Kupferatome auf die p-Orbitale des Wassers übertragen werden. Als Folge entsteht eine freie Position im d-Orbital ( $3d^9$ ) und die Anregung eines Elektrons aus dem p-Orbital des Kupfers in das nun freie d-Orbital wird ermöglicht. Ein solcher 2p-3d-Übergang ist charakteristisch für zweiwertiges Kupfer, was den im Deoxy-Spektrum auftretenden Peak bei 932 eV und den verbreiterten Peak bei 936 eV, welcher wiederum charakteristisch für einen MLCT ist [219], erklären würde. Wasser fungiert in diesem Fall als Ligand und somit als Akzeptormolekül für den Ladungstransfer. Ein solcher Transfer ist im oxygenierten Zustand nicht möglich, da das Peroxidmolekül keine geeigneten unbesetzten Orbitale aufweist, um einen Ladungstransfer durchzuführen. Wie genau eine solche Interaktion und ein solcher Ladungstransfer ablaufen ist Gegenstand aktueller Forschung.

Dieser These zufolge nimmt Wasser als Ligand Einfluss auf das aktive Zentrum. Um die Stichhaltigkeit dieser Vermutung weiter zu untersuchen, wurden Kristallstrukturen von Typ-3-Kupferproteinen auf das Vorkommen von Wassermolekülen innerhalb ihrer Proteinmatrix und auf einen Zugang zum aktiven Zentrum hin untersucht. Da keine Struktur des hier verwendeten Hämocyanins aus *Homarus americanus* in der Proteindatenbank (PDB) verfügbar ist, wurden andere Typ-3-Kupferproteine zum Vergleich herangezogen. Der Fokus lag dabei auf den Strukturen der deoxygenierten und der oxygenierten Form des Hämocyanins aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*. Dabei handelt es sich zwar um ein Cheliceraten-Hämocyanin, es besitzt aber das gleiche aktive Zentrum wie das Crustaceen-Hämocyanin aus *Homarus americanus*. Zwar ist das Hämocyanin aus *Panulirus interruptus* dem Hämocyanin aus *Homarus americanus* verwandtschaftlich näher, jedoch war für das Hämocyanin aus *Limulus polyphemus* eine strukturell besser aufgelöste Röntgenstruktur verfügbar. Außerdem lagen Strukturen für beide Beladungszustände (Oxy-, Deoxy-Form) vor. Auf Grund dieser Vorteile wurden für die hier gemachten Untersuchungen die Röntgenstrukturen des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus* (PDB-Codes: 1OXY, 1LLA) verwendet.

Wie Abbildung 55, Abbildung 56 und Abbildung 57 zeigen, liegen zahlreiche Wassermoleküle im Umfeld des aktiven Zentrums vor. Im oxygenierten Zustand sind es fünf Wassermoleküle, die einen Abstand kleiner als 7 Å zu den Kupferatomen aufweisen (Abbildung 55). Die Werte liegen dabei im Bereich zwischen 5,1 Å und 6,7 Å. Für die deoxygenierte Form liegen drei Wassermoleküle vor, die Abstände kleiner als 7 Å zeigen (6,0 – 6,6 Å) (Abbildung 56). Bei den hier aufgeführten Werten wurden die kristallinen Wassermoleküle innerhalb des Proteinkristalls als Grundlage für die Abstandsbestimmungen herangezogen. Deren Positionen sind innerhalb des Kristalls fixiert, können aber gegenüber dem Protein *in vivo* abweichen.

In diesem Zusammenhang ist es also durchaus möglich, dass die Wassermoleküle noch weiter ins aktive Zentrum vordringen können als dies in den Kristallstrukturen von *Limulus polyphemus* der Fall ist. Beispielhaft dafür könnten andere Typ-3-Kupferproteine sein. Verfügbare Strukturen aus dem Tabakswärmer *Manduca sexta* (Pro-Phenoloxidase) und dem Bakterium *Bacillus megaterium* (Tyrosinase) weisen kristalline Wassermoleküle auf, die Positionen mit Abständen von unter 3 Å zu den Kupferatomen der aktiven Zentren einnehmen (Abbildung 59 & Abbildung 66). Zwar weichen die Tertiärstrukturen dieser Proteine von denen der Hämocyanine ab, allerdings sind die aktiven Zentren von Typ-3-Kupferproteinen strukturell und evolutionär konserviert [64,65,77], wodurch Vergleiche bezüglich der Lage kleiner Moleküle (in unserem Fall

Wassermoleküle) im aktiven Zentrum und unmittelbar um den Bereich des aktiven Zentrums, gemacht werden können.

In den dazu verwendeten Strukturen der Pro-Phenoloxidase aus *Manduca sexta* und der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* finden sich Wassermoleküle unmittelbar zwischen den Kupferatomen und somit innerhalb des aktiven Zentrums (Abbildung 66). Die Untereinheit A der Pro-Phenoloxidase zeigt ein Wassermolekül, das genau zwischen den beiden Kupferatomen liegt und Abstände von 2,5 Å und 2,7 Å zu diesen aufweist (Abbildung 66 oben). Im Fall der Tyrosinase liegen zwei Wassermoleküle im aktiven Zentrum vor, deren Abstände 3,0 Å und 3,5 Å bzw. 2,2 Å und 2,2 Å zu den beiden Kupfer betragen (Abbildung 59 D – Abstände 5, 6, 8, 9). Um die räumliche Situation besser zu verdeutlichen, sind in Abbildung 66 diese beiden aktiven Zentren in einer leicht variierten Darstellung gezeigt.

Im oberen Bild der Abbildung 66 ist das aktive Zentrum der Untereinheit A der Pro-Phenoloxidase aus dem Tabakswärmer dargestellt. Das zentral positionierte Wassermolekül ist rot eingefärbt. Die beschriebenen Abstände sind eingezeichnet und es wird deutlich wie nahe sich die Kupferatome und das Wassermolekül kommen (2,7 Å zum Kupfer A bzw. 2,5 Å zum Kupfer B). Im unteren Bild ist das aktive Zentrum der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* gezeigt. Die Wassermoleküle, die zu einem oder beiden Kupferatomen Abstände von unter 4 Å aufweisen, sind gezeigt und in den Farben rot, orange und gelb eingefärbt. Auf Grund der besseren Übersicht sind die Abstände nicht eingezeichnet, sondern nur in der Bildunterschrift und im Text erklärt. Sie betragen zwischen beiden Kupferatomen (Kupfer A links; Kupfer B rechts im Bild) und dem roten, zentralen Wassermolekül je 2,2 Å. Für das orange eingefärbte Wassermolekül besteht ein Abstand zu den Kupferatomen (A & B) von 3,0 Å bzw. 3,5 Å, und das gelb eingefärbte Wassermolekül weist einen Abstand zum Kupfer A von 2,3 Å auf. Auch in dieser Darstellung wird deutlich, dass der Abstand zwischen Wassermolekülen und Kupfern sehr gering ist, und es deshalb durchaus möglich ist, dass Wassermoleküle innerhalb der aktiven Zentren die Rolle eines Liganden übernehmen können. Ihre hier dargestellten Abstände zu den Kupferatomen von 2,2 Å bis 3,5 Å liegen innerhalb der Reichweite von van der Waals-Wechselwirkungen (3 – 6 Å). Eine Interaktion der Wassermoleküle mit den Kupfern erfolgt allerdings eher über ionische Wechselwirkungen zwischen der negativen Partialladung auf einer Seite des Wassers und der positiven Ladung der Kupferatome.

Eine für Wassermoleküle zugängliche Passage durch die Proteinmatrix von Hämocyaninen kann prinzipiell auftreten, wie die Darstellungen in Abbildung 60 und Abbildung 61 für das

Hämocyanin aus *Limulus polyphemus* zeigt. In dessen Kristallstruktur sind sehr viele Wassermoleküle zu sehen.

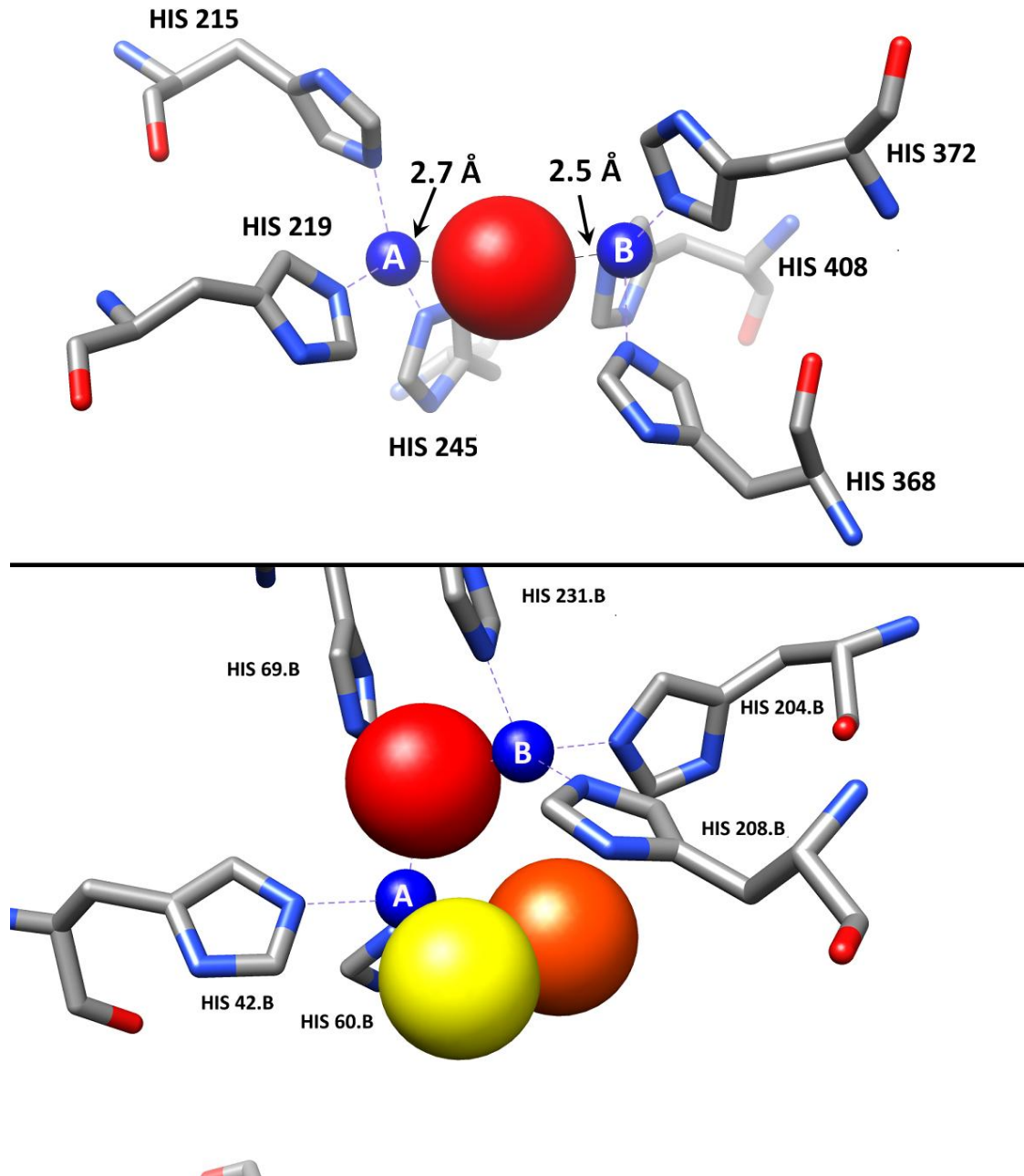
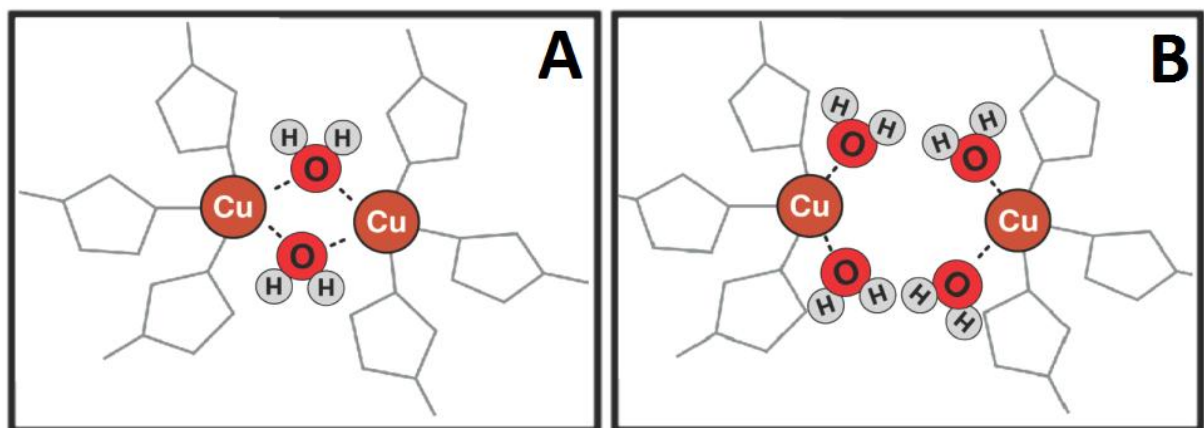


Abbildung 66: Typ-3-Kupferzentren aus *Manduca sexta* (oben) und *Bacillus megaterium* (unten) mit Wassermolekülen der Proteinmatrix. Für die Untereinheit B der Pro-Phenoloxidase aus *Manduca sexta* liegt ein Wassermolekül (rot) direkt zwischen den beiden Kupferatomen. Dieses Molekül weist Abstände zu den beiden Kupferm von 2,5 Å und 2,7 Å auf. In der Struktur der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* liegt ebenfalls ein Wasser (rot) sehr nahe an den Kupferm (2,2 Å zu beiden Kupferatomen). Zwei weitere Wassermoleküle (gelb & orange) liegen etwas außerhalb der Ebene der Kupferatome, weisen aber ebenfalls sehr geringe Abstände zu den Kupferm auf (2,3 Å – 3,5 Å).

In einem Bereich tritt eine durchgängige Folge von Wassermolekülen zum aktiven Zentrum auf. Zusammen mit der weiter oben beschriebenen Situation an verschiedenen Typ-3-Kupfer-Zentren scheint es möglich zu sein, dass Wassermoleküle ins Innerste des aktiven Zentrums eindringen, und dort Einfluss auf die Zustandsform der Kupferatome nehmen können.

Wasser besitzt auf Grund seines Aufbaus aus einem Atom Sauerstoff und zwei Atomen Wasserstoff ein Dipolmoment. Das Sauerstoffatom ist dabei kovalent mit zwei Wasserstoffatomen verknüpft. Der Wasserstoff hat nach Pauling eine geringere Elektronegativität (2,1) als Sauerstoff (3,5), wodurch eine stärkere Anziehung der Elektronen innerhalb der Bindung zum Sauerstoffatom erfolgt und innerhalb des Moleküls ein Dipol entsteht. Sauerstoff besitzt dadurch einen Ladungsüberschuss und ist partiell negativ geladen. Bei einer Interaktion von Wassermolekülen mit den positiv geladenen Kupfern der aktiven Zentren sollte sich demnach der negativ geladene Anteil des Wassers, also die Seite des Sauerstoffatoms, zu den Kupfern orientieren. Zwei Vorschläge wie eine solche Wasseranordnung im aktiven Zentrum aussehen könnte sind in Abbildung 67 als Schema gezeigt. Diesbezüglich wurden allerdings keine Berechnungen durchgeführt. Dabei werden entweder zwei Wassermoleküle zwischen den Kupferatomen koordiniert (Abbildung 67 / A), die quasi die beiden Metallatome verbrücken, oder aber es sind mehrere Wassermoleküle koordiniert (Abbildung 67 / B), was eher zum vergrößerten Abstand der Kupferatomen im Deoxy-Zustand 4,6 Å gegenüber dem Oxy-Zustand (3,6 Å) passen würde, wie er in den Kristallstrukturen gefunden wurde [114,63].



**Abbildung 67: Schematische Darstellungen einer möglichen Kupfer-Wasser-Koordination im aktiven Kupfer-Zentrum.** Bild A zeigt das aktive Zentrum mit zwei koordinierten Wassermolekülen. Bild B zeigt eine Anordnung mit vier Wassermolekülen. Konkrete Aussagen zur Art der Bindung und zur Anzahl der Bindungspartner sind nicht möglich, und diese Darstellungen sollen lediglich Vorschläge diesbezüglich liefern. Eine Koordination mit mehreren Wassermolekülen im aktiven Zentrum würde, auf Grund des größeren räumlichen Bedarfs, die Aufweitung des aktiven Zentrums im Deoxy-Zustand gegenüber dem Oxy-Zustand von ca. 1,0Å besser erklären [210].

Auf Grund der hier diskutierten Ergebnisse stellt sich die Frage, warum eine solche Interaktion von Kupferatomen und Wassermolekülen in Typ-3-Kupferzentren nicht bereits vorher detektiert wurde. Untersuchungen mit EXAFS hätten eigentlich in der Lage sein müssen das Vorkommen von Wassermolekülen in unmittelbarer Nähe zu den Kupferatomen der aktiven Zentren aufzuzeigen.

Interpretationen der EXAFS-Daten für untersuchte Hämocyanine führten im Laufe der Zeit zu unterschiedlichen Ergebnissen. Anfänglich wurde davon ausgegangen, dass im deoxygenierten Zustand zwei Nachbaratome pro Kupferatom und im oxygenierten Zustand vier Nachbaratome pro Kupferatom vorliegen [111,112,113]. Für das Sauerstoffmolekül wurde dabei eine „End-on“-Konfiguration angenommen. Eine neuere Studie ging dann von drei bis vier Nachbaratomen im deoxygenierten Zustand und von fünf bis sechs Nachbaratomen im oxygenierten Zustand aus [115]. Der Sauerstoff lag in diesem Zusammenhang in der mittlerweile akzeptierten „Side-on“-Konfiguration vor, wie sie auch in Kristallstrukturen von Hämocyaninen und Tyrosinasen gefunden wurden [114,63,212]. Zwar wechselte die Anzahl der postulierten Nachbaratome für die beiden Beladungszustände über die Jahre, allerdings blieb der Konsensus, dass es beim Wechsel vom sauerstoffbeladenen zum sauerstoffunbeladenen Zustand zu einer Abnahme um zwei Bindungspartner kommt, bestehen. Dies wäre nicht der Fall, wenn Wasser als Ligand eine Rolle spielen würde.

Frühe Studien unterschieden sich von den hier gemachten Versuchen bezüglich des Wassergehalts der eingesetzten Proben und auch hinsichtlich ihrer physikalischen Beschaffenheit. Gefriergetrocknete Proben [228] wurden ebenso verwendet wie Gel-Proben [111], gefrorene Proben [219,111] und in eine Saccharose-Matrix eingebettete Proteinproben [115]. Dabei hätten zumindest die letzten beiden Ansätze das Vorhandensein von Wassermolekülen bzw. deren Interaktion mit den Kupferatomen aufzeigen müssen/können.

Außerdem sind aktive Zentren von Hämocyanin im deoxygenierten Zustand prinzipiell toleranter gegenüber Modifikationen, da es auf Grund des fehlenden Liganden keine fixierte Koordination des aktiven Zentrums gibt [115]. Deshalb ist es möglich, dass sich die Affinität von Wasser gegenüber den Kupferatomen der aktiven Zentren zwischen den Hämocyaninen verschiedener Arten und Stämme unterscheidet. Die einzige Studie, die einen Vergleich bezüglich des strukturellen Aufbaus von verschiedenen Hämocyaninen beschreibt [115], zeigt zwar den generellen Trend auf, dass die deoxygenierten Zustände flexibler sind, aber keine Hinweise darauf, dass für das Hämocyanin aus *Homarus americanus* eine Abweichung gegenüber anderen

Hämocyaninen auftritt. Auf Grund dieser Sachlage gibt es momentan keine endgültige Erklärung für dieses Phänomen.

Auch in der aktuell veröffentlichten Publikation von Matoba et al. [229], welche die Röntgenstruktur einer Tyrosinase mit einer Auflösung von 1,16 – 1,58Å darstellt, werden zahlreiche Wassermoleküle unmittelbar am aktiven Zentrum des Proteins beschrieben. Postuliert wird hier ein entscheidender Einfluss dieser Moleküle auf den Katalyseprozess der Tyrosinase. Die Ergebnisse unterstützen die von uns postulierte Rolle von Wassermolekülen an den aktiven Zentren von Typ-3-Kupferproteinen. Ein Einfluss auf den Hydroxylierungsprozess im Laufe der Katalyse scheint vorzuliegen [229].

### **6.1.5 Chemische Vergleichslösungen**

Die vergleichenden Experimente mit verschiedenen anorganischen Testlösungen, bestehend aus Kupfer-II-Chlorid, Imidazol und Histidin, lieferten Spektren, welche die These einer Interaktion der freien Kupfer-Ionen mit dem Lösungsmittelmolekül Wasser als Ursache für dieses Phänomen unterstützten.

Interpretiert man die Spektren in Abbildung 53 und Abbildung 54, kommt es für reines Kupfer-II-Chlorid, in entsalztem Wasser zu einem Zerfall des Kupfer-Chlorid-Komplexes, und somit zu einer Auftrennung in Kupfer- ( $\text{Cu}^{2+}$ ) und Chlorid-Ionen ( $\text{Cl}^-$ ). Für die hochkonzentrierte Kupfer-II-Chlorid-Lösung ([1M]) scheint der Zerfall noch nicht so weit fortgeschritten zu sein, so dass eine Interaktion der Kupfer-Ionen mit Wassermolekülen durch die Interaktion der Kupfer-Ionen mit ihren Chlorid-Gegenionen überlagert wird (Abbildung 53). Eine Interaktion mit Wasser, und somit ein „metal to ligand charge transfer“, erfolgt demnach bei dieser Konzentration nicht. Für die 5mM Kupfer-II-Chlorid-Lösung tritt dieser Vorgang dann auf (Abbildung 53). Durch den bei dieser Verdünnung eintretenden Zerfall des Kupfer-II-Chlorid-Komplexes in Wasser, fehlt dem Kupfer in der Folge wahrscheinlich das Gegenion ( $\text{Cl}^-$ ). Dadurch können die d-Orbitale der Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) mit den p-Orbitalen der Wassermoleküle, anstatt mit den p-Orbitalen der Chloridionen ( $\text{Cl}^-$ ), interagieren, woraus eine Vermischung der Orbitalzustände resultiert. Ein solcher Prozess der Vermischung der Orbitale von Wassermolekülen und solvatisierten Übergangs-Metallionen ( $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) ist aus der Literatur bekannt, und für Chrom und Eisen

beschrieben [230]. Der im Spektrum für die 5mM Kupfer-II-Chlorid-Lösung auftretende Peak bei 936eV ist auf Grund seiner Position im Spektrum, dem Kupfer-I-Peak im deoxygenierten Hämocyanin-Spektrum (Abbildung 51 & Abbildung 52), in dem keine Chlorid-Ionen in der Nähe des aktiven Kupfer-Zentrums vorlagen, zuzuordnen. Allerdings ist die Ausprägung des Peaks im Spektrum für die Kupfer-II-Chlorid-Lösung deutlich ausgeprägter als im Spektrum für die Proteinlösung (Abbildung 53).

Durch Zugabe von Imidazol als zusätzliche Komponente zu Kupfer-II-Chlorid kommt es zu einer Zunahme der relativen Intensität der „White line“ bei 932 eV (Abbildung 54). Imidazol ist innerhalb des Proteins der unmittelbare Nachbar der Kupferatome, wobei drei Histidine je ein Kupferatom komplexieren, und somit je drei Imidazol-Ringe mit einem Kupferatom interagieren. Allerdings kann Imidazol innerhalb des Proteins wahrscheinlich nicht so stark mit den Kupfern interagieren wie in der hier beschriebenen einfachen Lösung aus Imidazol (100 mM) und Kupfer-II-Chlorid (25 mM), da die Histidine welche die Imidazole liefern, im Gegensatz zu den freien Imidazolen in Lösung, innerhalb des Proteinrückrats fixiert vorliegen. Die Zugabe von Histidin (200 mM) zu einer Kupfer-II-Chlorid-Lösung (50 mM), bei einem pH-Wert von 5,5, führt zu einer Vergrößerung des Peaks bei 937 eV, relativ zum Peak bei 932 eV. Eine mögliche Ursache für diese Intensitätsverschiebung innerhalb des Spektrums ist die Interaktion der deprotonierten Carboxyl-Gruppen der frei in Lösung vorliegenden Histidine mit den Kupferatomen. Sollte dies zutreffen würde das für alle Aminosäuren und deren Carboxyl-Gruppen bei einem pK-Wert von vier erfolgen. Zudem kann eine Wechselwirkung mit dem Stickstoff des Imidazol-Ringsystems ausgeschlossen werden, da dieser bei diesem pH-Wert protoniert vorliegen würde. Im Proteingerüst komplexiert dieser Stickstoff jedoch die Kupferatome.

Dieser Zusammenhang muss in nachfolgenden Arbeiten überprüft werden. Gegen eine solche Chelatierung spricht jedoch die Tatsache, dass die Spektren für die Histidin- und Imidazol-Lösungen mit den Hämocyanin-Spektren sehr gut vergleichbar sind. Daher wäre eine Koordination der Kupferatome über die protonierbaren Stickstoffe der Histidine, wie sie auch *in vivo* auftritt, denkbar. Innerhalb des Proteins sind außerdem die Carboxyl-Gruppen für die Ausbildung der Peptid-Bindungen mitverantwortlich, wodurch sie *in vivo* für eine Komplexbildung mit den Kupferatomen nicht zur Verfügung stehen. Vergleicht man die beiden zuletzt besprochenen Spektren mit dem des deoxygenierten Hämocyanins, sieht es so aus, als würden diese Vergleichsspektren die Situation am aktiven Zentrum für den deoxygenierten Zustand am besten widerspiegeln. Zwei deutliche Peaks bei 932 eV und 936 eV traten auf. Eine

kombinierte Interaktion von Kupfer-Ionen mit Imidazolen bzw. Histidinen und Wassermolekülen könnte erfolgt sein und dadurch einen dem aktiven Zentrum ähnlichen Zustand widerspiegeln.

Die Resultate für diese Experimente unterstützen zwar die These der hier aufgezeigten alternativen Form des deoxygenierten Hämocyanin-Zustands um eindeutige Aussagen bezüglich der Situation am aktiven Zentrum zu gewinnen bedarf es allerdings weiterer Experimente und Berechnungen.

## **6.2 Zusammenfassung**

Abschließend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit ein neuer Aspekt bezüglich der Abgabe und Aufnahme des Sauerstoffs von Hämocyaninen aufgezeigt werden konnte. Ein zuvor nicht in Betracht gezogener und diskutierter Einfluss von Wassermolekülen bei diesem Prozess konnte mittels der Methode der Röntgen-L-Kantenspektroskopie dargestellt werden. Erstmals war es möglich die beiden verschiedenen Beladungszustände (Oxy-, Deoxy-Zustand) des Sauerstofftransportproteins Hämocyanin mittels dieser Methode in physiologisch ähnlicher Umgebung zu untersuchen. Vergleiche der dazu erhaltenen L-Kanten-Spektren mit anorganischen Vergleichslösungen ließen auf eine Interaktion von Wassermolekülen mit den Kupferatomen des aktiven Zentrums schließen, und zeigten somit erstmals einen möglichen Einfluss des Wassers auf den Oxygenierungsprozess des Hämocyanins auf.

Untersuchungen von Röntgenstrukturen verschiedener Typ-3-Kupferproteine zeigten, dass ein Einfluss von Wassermolekülen auf die aktiven Zentren dieser Proteine durchaus möglich ist. In allen untersuchten Kristallstrukturen waren kristalline Wassermoleküle zu finden, die mehr oder weniger dicht an den Kupferatomen der aktiven Zentren lagen, und durchaus in der Lage sind einen Einfluss auf den Bindeprozess von Sauerstoff auszuüben.

Vorgeschlagen wird dabei, dass an Stelle der Überlappung der 3d-Orbitale des Kupfers mit den 2p-Orbitalen des Sauerstoffs, wie sie im sauerstoffbeladenen Zustand auftritt, eine Wechselwirkung der 3d-Orbitale des Kupfers mit den LUMOS der Wassermoleküle möglich wird, und ein Elektronen- bzw. Ladungstransfer von den Kupfern auf die Wassermoleküle erfolgen kann. Wie genau dieser Vorgang abläuft gilt es in Zukunft durch weitere Untersuchungen an Hämocyaninen in physiologischer Umgebung zu eruieren.

### 6.3 Ausblick

Auch in Zukunft sollte weiterhin die Wechselwirkungen des aktiven Kupferzentrums mit unterschiedlichen Liganden mittels L-Kanten-Spektroskopie untersucht werden. Die spektrale Kupfersignatur soll dabei Informationen über die Art und Ausprägung der Liganden-Bindung liefern. Neben einer erneuten Betrachtung des Bindungspartners Sauerstoff, sollte auch Kohlenstoffmonoxid als Interaktionspartner eingesetzt werden. Im Gegensatz zu den Sauerstoffmolekülen, die in „side-on“-Koordination zwischen den beiden Kupferatomen des aktiven Zentrums gebunden sind, bindet Kohlenstoffmonoxid (CO) nur an eines der beiden Kupferatome, was gegenüber Sauerstoff mit einer wesentlich geringeren Affinität erfolgt [231,232,233,234,235]. Die genaue Konfiguration dieses Bindungszustandes ist immer noch unbekannt. In diesem Zusammenhang können XAS/XES-Spektren wichtige Informationen liefern.

Außerdem könnten durch den Einsatz dieser beiden unterschiedlichen Bindungspartner Aussagen zur Kooperativität der hochkomplexen Hämocyanin-Multimere gewonnen werden. Die Kooperativität von Hämocyaninen wurde bisher auf strukturelle Veränderungen der Protein-Matrix zurückgeführt. Diese wird durch die Verringerung des Abstandes der Kupferatome erzeugt, wenn der Sauerstoff als Peroxid im aktiven Zentrum zwischen den Kupferatomen bindet. Für die einseitige (schwache) CO-Bindung zeigt sich aber ebenfalls ein kooperativer Effekt. Daraus ist zu schließen, dass mehr als zwei Konformationszustände für die Beschreibung der Bindung dieser beiden Liganden notwendig sind. Durch den Affinitätsunterschied zwischen den beiden Bindungspartnern ( $O_2$  &  $CO_2$ ) kommt es zu einer Verschiebung im Beitrag der allosterischen Zustände, wenn CO gebunden wird. Würde es gelingen neue Erkenntnisse über die elektronische Konfiguration dieser Zustände zu erzielen, könnten diese zum Verständnis des Prozesses der Ligandenbindung beitragen und das postulierte Modellsystem (Nested-Model) verifizieren [99,100].

Weiterhin sollte der Einfluss von Wasser auf die Wechselwirkungen dieser Moleküle mit dem aktiven Zentrum genauer untersucht, und die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse diesbezüglich vertieft und ergänzt werden. Wichtige Informationen bezüglich des postulierten Ladungstransfers der Kupferatome auf die Wassermoleküle und die Rolle der LUMOs des Wassers bei diesem Vorgang können so gewonnen werden. Erste Versuche diesbezüglich wurden bereits in einer gerade abgeschlossenen Strahlzeit durchgeführt. Die erhaltenen

Ergebnisse werden zeitnah ausgewertet und in einer noch folgenden Arbeit von Panzer et al. besprochen.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen an zwei verschiedenen multimeren Proteinkomplexen durchgeführt: Zum einen am Hämocyanin aus *Homarus americanus* mittels Röntgen-L-Kantenspektroskopie und zum anderen am  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus*, hinsichtlich der Interaktion an speziellen Raft-artigen Membranabschnitten, mittels AFM.

Für das Hämocyanin aus *Homarus americanus* konnte ein neuer Aspekt bezüglich der Bindung von Sauerstoff aufgezeigt werden. Ein zuvor nicht in Betracht gezogener und diskutierter Einfluss von Wassermolekülen auf diesen Vorgang konnte mittels der Methode der Röntgen-L-Kantenspektroskopie dargestellt werden. Erstmals war es möglich die beiden verschiedenen Beladungszustände (Oxy-, Deoxy-Zustand) des Hämocyanin mittels dieser Methode in physiologisch ähnlicher Umgebung zu untersuchen. Vergleiche der erhaltenen L-Kantenspektren mit denen anorganischer Vergleichslösungen ließen auf eine Interaktion von Wassermolekülen mit den beiden Kupferatomen des aktiven Zentrums schließen. Dadurch wurde erstmals ein möglicher Einfluss des Wassers auf den Oxygenierungsprozess des Hämocyanins auf elektronischer Ebene aufgezeigt. Vergleichende Betrachtungen von Röntgenkristallstrukturen verschiedener Typ-3-Kupferproteine bestätigten, dass auch hier ein Einfluss von Wassermolekülen auf die aktiven Zentren möglich ist. Vorgeschlagen wird dabei, dass an Stelle der Überlappung der 3d-Orbitale des Kupfers mit den 2p-Orbitalen des Sauerstoffs, wie sie im sauerstoffbeladenen Zustand auftritt, im sauerstoffunbeladenen Zustand eine Wechselwirkung der 3d-Orbitale des Kupfers mit den LUMOS der Wassermoleküle möglich wird, und ein Elektronen- bzw. Ladungstransfer von den Kupfern auf die Wassermoleküle erfolgen kann.

AFM-Untersuchungen hinsichtlich der Interaktion des  $\alpha$ -Toxins aus *Staphylococcus aureus* mit oberflächenunterstützten Modellmembranen wiesen darauf hin, dass eine bevorzugte Anbindung und zumindest teilweise Integration der  $\alpha$ -Toxine in Raft-artige Membranbereiche stattfindet. Für verschiedene ternäre Lipidsysteme konnten phasenseparierte

Modellmembranen abgebildet und die unterschiedlichen Domänenformen zugeordnet werden. Der Anbindungsprozess der Toxine an diese oberflächenunterstützte Modellmembranen erfolgte dann wahrscheinlich vornehmlich an den speziellen Raft-artigen Domänen, wohingegen die Insertion der Poren vorrangig an den Grenzbereichen zwischen den Domänen auftrat. Mögliche Ursache dafür sind die räumlichen Besonderheiten dieser Grenzflächen. Membranen weisen an den Schnittstellen zwischen zwei Domänenformen eine erhöhte Unordnung auf, was sich u.a. in einer geringeren Packungsdichte der Phospholipide und dem erhöhten Freiheitsgrad ihrer Kopfgruppen bemerkbar macht. Außerdem kommt es auf Grund der Interaktion der beteiligten Membranbestandteile Sphingomyelin und Cholesterol untereinander zu einer speziellen Ausrichtung der Phosphocholin-Kopfgruppen und innerhalb der Raft-artigen Domänen zu einer erhöhten Packungsdichte der Phospholipide. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse unterstützen demnach die in der Literatur postulierte Vermutung der bevorzugten Interaktion und Integration der Toxin-Moleküle mit Raft-artigen Membrandomänen. Die Insertion der Pore erfolgt aber wahrscheinlich bevorzugt an den Grenzbereichen zwischen den auftretenden Domänen.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AFM	=	<u>A</u> tomic <u>F</u> orce <u>M</u> icroscopy
AUZ	=	<u>A</u> nytische <u>U</u> ltra <u>Z</u> entrifugation
DLS	=	<u>D</u> ynamic <u>L</u> ight <u>S</u> cattering
DOC	=	Deoxycholate
EXAFS	=	<u>E</u> xtended <u>X</u> -ray <u>A</u> bsorption <u>F</u> ine <u>S</u> tructure
FM	=	<u>F</u> luorescence <u>M</u> icroscopy
GUV	=	<u>G</u> iant <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esicles
hPa	=	Hektopascal
Hz	=	Hertz
ITO	=	<u>I</u> ndium- <u>T</u> in- <u>O</u> xide
$l_d$	=	flüssig ungeordnete Phase
Lim II	=	<i>Limulus polyphemus</i> Untereinheit 2
Liss-Rhod-PE	=	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl)
$l_o$	=	flüssig geordnete Phase
LUMO	=	<u>L</u> owest <u>U</u> noccupied <u>M</u> olecular <u>O</u> rbital
LUV	=	<u>L</u> arge <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esides
mbar	=	Millibar
ml	=	Milli-Liter
MLCT	=	<u>M</u> etal to <u>L</u> igand <u>C</u> harge <u>T</u> ransfer
mM	=	Milli Molar
mm	=	Millimeter
NEXAFS	=	<u>N</u> ear- <u>E</u> dge-Ray- <u>A</u> bsorption- <u>F</u> ine- <u>S</u> tructure
nM	=	Nano Molar
nm	=	Nanometer
PDB	=	Proteindatenbank
QCM-D	=	<u>Q</u> uartz <u>C</u> rystal <u>M</u> icrobalance with <u>D</u> issipation

RMS	=	<u>R</u> oot <u>M</u> ean <u>S</u> quare
SDS	=	<u>S</u> odium- <u>D</u> odecyl- <u>S</u> ulfat (Natrium-Dodecyl-Sulfat)
$s_0$	=	Gel-Phase
SPB	=	<u>S</u> upported <u>P</u> hospholipid <u>B</u> ilayer
SUV	=	<u>S</u> mall <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esicles
SVL	=	<u>S</u> upported <u>V</u> esicle <u>L</u> ayer
TFY	=	<u>T</u> otal <u>F</u> luorescence <u>Y</u> ield
$T_M$	=	Schmelzpunkt / Übergangstemperatur
$T_{M-low}$	=	hoher Schmelzpunkt
$T_{M-high}$	=	niedriger Schmelzpunkt
UZ	=	<u>U</u> ltra <u>Z</u> entrifugation
V	=	Volt
XANES	=	<u>X</u> - <u>R</u> ay- <u>A</u> bsorption- <u>N</u> ear- <u>E</u> dge- <u>S</u> tructure
XAS	=	<u>X</u> - <u>R</u> ay <u>A</u> bsorption <u>S</u> pectroscopy
$\mu$ l	=	Micro-Liter
$\mu$ M	=	Micro Molar
$\mu$ m	=	Micrometer
Å	=	Angström

## 9 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1: Darstellung der heptameren Pore des  $\alpha$ -Toxins aus *S. aureus*. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm *Chimera* [35]. Die verwendete PDB-Datei war 7AHL [31]. Alle Untereinheiten des Heptamers sind unterschiedlich eingefärbt..... 6**

**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Porenbildungsmechanismus - nach Olson et al 1999 [1]. Die vom Bakterium abgesonderten Monomere liegen zunächst frei in Lösung vor (1) bevor sie an die Zielmembran binden (2). Dort treffen mehrere Monomere aufeinander, lagern sich zu Oligomeren zusammen und bilden eine Präpore aus (3). Diese führt eine Konformationsänderung durch und die finale, die Membran durchspannende Pore, wird ausgebildet. .... 6**

**Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Zellmembran nach dem Flüssig-Mosaik-Modell nach Singer und Nicholson [51].** ..... 10

**Abbildung 4: Strukturformel von Phosphatidylcholin (links) und Sphingomyelin (rechts). Die einzelnen Komponenten sind farblich hinterlegt und beschriftet.** Der Hauptunterschied dieser beiden Molekülgruppen ist das jeweilige Grundgerüst an welches die Kopfgruppe (gelb) und die Fettsäureschwänze (rot & lila) gekoppelt sind. Das Grundgerüst wird für Phosphatidylcholine von Glycerin (blau) und für Sphingomyeline von Sphingosin (grau) gebildet. (Quelle der Strukturen: Avanti Polar Lipids - <http://www.avantilipids.com/>)..... 11

**Abbildung 5: Schematische Darstellung unterschiedlicher Membran-Phasen.** Von links nach rechts sind die Gel-Phase ( $s_o$ ), die flüssig-ungeordnete-Phase ( $l_d$ ) sowie die flüssig-geordnete-Phase ( $l_o$ ) dargestellt. Die blau dargestellten Cholesterol-Moleküle in der rechten Ansicht verleihen der flüssig-geordneten Phase eine erhöhte Fluidität. (Nach Johnston 2007 [60]). ..... 14

**Abbildung 6: aktives Zentrum der Typ-III-Kupferproteine im oxygenierten Zustand (links) und im deoxygenierten Zustande (rechts).** Durch die Bindung des Sauerstoffmoleküls verändern die Kupferatome ihre Wertigkeit von Cu(I) nach Cu(II), was mit der Vergrößerung ihres Abstandes von 3,2 Å auf 4,7 Å einhergeht [63]..... 16

**Abbildung 7: Hämocyanin aus *Eurypelma californicum*.** Das Protein liegt als 24mer vor und die hier dargestellte Struktur wurde durch SAXS/EM-Aufnahmen erhalten [70]..... 17

**Abbildung 8: Mögliche Zustände der Sauerstoffbindung des Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum* nach dem Nesting-Modell [100].**..... 19

**Abbildung 9: Darstellung der einzelnen Messbereiche anhand einer Röntgenabsorptionskante. Der gelb unterlegte Bereich markiert die Nah-Kante (XANES bzw. NEXAFS). Der blau unterlegte Bereich die EXAFS-Region.** *Quelle:* [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:NEXAFS\\_EXAFS\\_schematic.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:NEXAFS_EXAFS_schematic.svg), Urheber: Michael Schmid, Lizenz CC BY-SA 3.0) ..... 21

**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Anordnung von Atomshalen um den Atomkern.** Links ist ein allgemeines Schema gezeigt. Die Atomshalen sind mit K bis O durchnummeriert. K ist die kernnächste Schale und besitzt die höchste Bindungsenergie für die in ihr enthaltenen Elektronen. Die Pfeile kennzeichnen die möglichen Elektronenübergänge zwischen den Atomshalen. Rechts ist eine schematische Abbildung dargestellt, welche die Elektronenverteilung im Kupferatom aufzeigt. .... 23

**Abbildung 11: Schematischer Aufbau der Endstation *Liquidrom*.** *Oben:* Durchflusszelle. Bei diesem Versuchsaufbau steht die Hauptkammer mit der Messzelle unter Hochvakuum. Die Probenlösung wird durch eine 150 nm Dicke Siliziummembran von der Kammer abgetrennt. *Unten:* Statische Zelle. Hierbei ist die Hauptkammer mit Helium geflutet und die statische Zelle mit der enthaltenen Proteinlösung steht in direktem Kontakt dazu. Eine Siliziummembran trennt die Hauptkammer vom Strahlrohr. .... 25

**Abbildung 12: *Homarus americanus* (amerikanischer Hummer)**..... 31

**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Präparations-Trogs für SPBs auf Mica oder Silizium.** Links ist die Seitenansicht der einzelnen Komponenten gezeigt. Das Oberteil wird über ein Schraubgewinde auf das Unterteil des Trogs geschraubt. Dazwischen wird das jeweilige Substrat eingeklemmt. Die Übersichtung mit Vesikeln erfolgt von oben (schwarzer Pfeil). In der Mitte ist die entsprechende Aufsicht für diesen Aufbau dargestellt. .... 39

**Abbildung 14: Schema des Vesikelspreitungs-Prozess zur Ausbildung eines SPB (Schema, modifiziert nach Tero 2006 [132]).** In Schritt eins liegen die Vesikel frei im Lösungsmittel vor und beginnen mit dem jeweiligen Substrat zu interagieren wodurch sie meist abflachen. Schritt 2 beschreibt dann die Ruptur der Vesikel auf Grund der erhöhten Spannung in deren Membran. Dadurch kommt es in Schritt drei zum Aufreißen der Vesikel und zur Ausbildung einer oberflächenunterstützten Modellmembran. .... 40

**Abbildung 15: Schematische Darstellung des AFM-Aufbaus.** Ein Laserstrahl wird auf die Oberseite des Federbalkens fokussiert und die Reflektion mittels einer Viersegment-Fotodiode detektiert. Darüber wird die Auslenkung des Federbalkens und somit das Höhenprofil der untersuchten Probe erfasst und über einen Regelkreis das Piezo-Stellelement nachreguliert.... 43

**Abbildung 16: Piezoelektrischer Kristall oder Schwingquarz mit aktiver Elektrode und Gegenelektrode (Firma Q-Sense, SE-426 77 Västra Frölunda, Schweden).**..... 46

**Abbildung 17: Typisches Absorptionsspektrum von Hämocyanin aus *Homarus americanus* (oxygeniert).** Der Peak bei 280 nm ist etwa um einen um Faktor 5 größer als der Peak bei 340 nm, was charakteristisch ist für Crustaceen-Hämocyanine. .... 54

**Abbildung 18: Strukturformel von Phosphatidylcholin.** Abgebildet ist 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-Phosphocholine (POPC) die Hauptkomponente der heterogenen Mischung des aus Eigelb gewonnen Lipids..... 59

**Abbildung 19: Typischer Verlauf einer Messkurve für die Ausbildung eines SPBs, hier dargestellt für Vesikel aus ePC auf einer Siliziumoberfläche.** Die mit I, II und III markierten Bereiche entsprechen der Beschreibung im Text. .... 60

**Abbildung 20: Oberflächenunterstützte Phospholipid-Membran, hergestellt aus ePC-Molekülen, auf Mica (oben) und Silizium (unten).** Die linken Bilder zeigen die verschiedenen Oberflächentypen ohne ausgebildete Modellmembran. In der mittleren Darstellung sind ausgebildete SPBs zu sehen. Detektierte Membranschichtdicken betragen für beide Substrate ca. 4 nm. Ergebnisse mit und ohne SPB wurden an verschiedenen Proben erzielt. Rechts im Bild sind die Höhenprofile dargestellt, die den schwarzen Balken der mittleren Darstellungen entsprechen..... 63

**Abbildung 21: Membranstapel auf Siliziumoberflächen ausgebildet aus reinen ePC-Vesikeln.** Der schwarze Balken der mittleren Darstellung entspricht dem Höhenprofil rechts im Bild. Multilagen sind zu sehen deren Stufenkanten 4, 8, 12 und 16 nm betragen. .... 64

**Abbildung 22: Übersicht SPB-Ausbildung verschiedener Lipid-Mischungen (oben: Resonanzfrequenz - unten: Dissipation).** Dargestellt ist das Adsorptionsverhalten für einkomponentige, binäre und ternäre Phospholipid-Mischungen. Der für die Ausbildung eines SPBs typische Kurvenverlauf ist mit Abstrichen für alle untersuchten Mischungen zu sehen..... 68

**Abbildung 23: Darstellung der beiden Hauptkomponenten des ePCs.** Die verschiedenen Phosphatidylcholins tragen Fettsäureschwänze die sich in Kettenlänge und Sättigungsgrad unterscheiden. *Oben:* POPC - ein ungesättigter Fettsäureschwanz. *Unten:* DOPC - beide Fettsäureschwänze ungesättigt ..... 69

**Abbildung 24: SPB auf Silizium (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3).** Das Höhenprofil in der Mitte entspricht dem schwarzen Balken der linken Abbildung. Die Höhenlinien für die verschiedenen Schichtdicken der Membran sind eingezeichnet. Eine Domänenbildung ist für diese Art SPB deutlich zu erkennen. .... 70

**Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der SPBs des Systems I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) auf Silizium (links), Mica (Mitte) und APTES-modifiziertem Mica (rechts).** Die eingezeichneten Pfeile markieren Defekte im SPB, in der unteren Bildreihe gezeigte Höhenprofile entsprechen den weißen Linien in der oberen Bildreihe. Für alle Oberflächen ist eine Domänenbildung deutlich zu erkennen. Die Höhendifferenzen zwischen den verschiedenen Lipid-Phasen liegen im Bereich um 1,2 – 1,4 nm (links), 0,8 – 1 nm (Mitte) und 1,2 - 1,4 nm (rechts). Der relative Anteil der Domänen variiert hier sehr stark. Gründe dafür können neben den unterschiedlichen Substraten auch die unterschiedlich langen Lagerungszeiten der untersuchten Proben sein. .... 71

**Abbildung 26: Vergleich der ternären Lipidsysteme I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3), II (DOPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3), ausgebildet auf Silizium (von links nach rechts).** Phasenseparation ist für alle drei Systeme zu sehen. Die Höhenunterschiede zwischen der  $I_d$ -Phase (dunkle Membranbereiche) und der  $I_o$ -Phase (helle Bereiche) liegen für die unterschiedlichen Kompositionen zwischen 1 und 1,5nm. Der relative Anteil der Domänen variierte auch hier relativ stark. Gründe dafür können ebenfalls die unterschiedlichen Substrate sowie die unterschiedlich langen Lagerungszeiten der untersuchten Proben sein. Für System I (links oben) traten auch hier drei Domänenformen auf. .... 74

**Abbildung 27: Einfluss der Tastspitze auf die Domänenbildung.** Links im Bild ist eine vergrößerte Ansicht des mittleren Quadranten des rechten Bildes gezeigt. Der weiße Balken entspricht dem Höhenprofil in der mittleren Darstellung. Der Einfluss der AFM-Tastspitze auf die Domänenbildung ist hier eindrucksvoll zu sehen. .... 75

**Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopie an GUVs.** Ein Vergleich der ternären Lipidsysteme I (ePC:eSM:Chol - 0.35:0.35:0.3), II (DOPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) und III (POPC:PSM:Chol - 0.35:0.35:0.3) ist von oben nach unten dargestellt. System I und II zeigen Phasentrennung, System III dagegen nicht. Weiße Pfeile markieren Membranbereiche ohne Fluoreszenzfarbstoff. Weiße Sterne markieren Einschlüsse in den GUVs. .... 78

**Abbildung 29: Phasenseparierter SPB aus ePC:eSM:Chol (0.35:0.35:0.3).** Rote Bereiche sind Abschnitte der Membran die in der  $I_d$ -Phase vorliegen. Dunkle Abschnitte liegen dagegen in der  $I_o$ -Phase vor. Der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff war DOPE-Liss-Rhod. Dieser lagert sich bevorzugt in die  $I_d$ -Phase ein. .... 79

**Abbildung 30: Darstellung der drei hier besprochenen Phospholipid-Komponenten mit niedrigem Schmelzpunkt.** Von oben nach unten: ePC, DOTAP und DOPS. (Quelle: Avanti Polar Lipids - <http://www.avantilipids.com/>)..... 81

**Abbildung 31: Adsorption von DOTAP-enthaltenden ternären Vesikeln auf einer Siliziumoberfläche (DOTAP:SM:Chol - 1:1:1).** Der Kurvenverlauf ist nicht typisch für eine SPB-Ausbildung. Die finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  entsprechen eher einer Mischform aus intakten oberflächengebundenen Vesikeln und teilweise ausgebildeten oberflächenunterstützten Membranbereichen..... 83

**Abbildung 32: Adsorption von DOPS-enthaltenden ternären Vesikeln auf einer Siliziumoberfläche (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1).** Auch hier ist der Kurvenverlauf nicht typisch für eine SPB-Ausbildung. Die finalen Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta D$  lagen dabei in Bereichen, die eher einer Mischform aus intakten oberflächengebundenen Vesikeln und teilweise ausgebildeten oberflächenunterstützten Membranbereichen entsprechen. Der Kurvenverlauf war ähnlich dem der ternären DOTAP-Vesikel, wenn auch der zeitliche Verlauf deutlich länger ausfiel. .... 84

**Abbildung 33: Phasenseparierter SPB aus DOTAP:PSM:Chol (1:1:1) auf Mica. Phasenseparation im SPB ist zu sehen.** Die unterschiedlichen Domänen unterscheiden sich im Höhenprofil um ca. 1,2 nm. Dabei entsprechen die dunkleren Membran-Bereiche der sehr wahrscheinlich der  $I_{\sigma}$ -Phase und die helleren der  $I_o$ -Phase..... 86

**Abbildung 34: Phasenseparierter SPB aus DOPS:PSM:Chol (1:1:1). Phasenseparation im SPB ist zu sehen.** Die unterschiedlichen Domänen unterscheiden sich im Höhenprofil um ca. 1,1 – 1,4 nm. Die dunkleren Membran-Bereiche entsprechen sehr wahrscheinlich auch für dieses System der  $I_{\sigma}$ -Phase. Die helleren Abschnitte sind der  $I_o$ -Phase zuzuordnen. .... 86

**Abbildung 35: Interaktion des  $\alpha$ -Toxins mit reinen ePC-Membranen. Obere Bildreihe: monomere Modellmembran aufgebaut aus ePC-Molekülen auf Silizium.** Das Höhenprofil ganz rechts entspricht dem weißen Balken in der Bildmitte. Die für eine solche Modellmembran typische Schichtdicke von 4 nm konnte dargestellt werden. *Untere Bildreihe:* Toxin-Interaktion mit einer solchen Lipiddoppelschicht. Toxin-Konzentration [1,2 $\mu$ M]. Eine Strukturierung des SPB durch die  $\alpha$ -Toxine ist zu sehen. Das Höhenprofil rechts entspricht dem weißen Balken in der Bildmitte. Erhebungen die ca. 4nm aus der SPB-Oberfläche herausragen wurden detektiert. Publierte Werte von Song et al. [31], die 4-5 nm für die aus der Membran herausstehende Kragendomäne der Pore angeben, entsprechen meinen Resultaten relativ gut. .... 90

**Abbildung 36: Modellmembran aus ePC-Molekülen auf Mica nach Interaktion mit 1,2  $\mu$ M Toxin.** Zwei verschiedene Proben sind dargestellt. Die weißen Balken in den mittleren Darstellungen entsprechen den Höhenprofilen rechts. Für die obere Bildreihe beträgt die Breite der abgebildeten rundlichen Struktur ca. 20nm. Für die untere Bildreihe ist dagegen eine Ausdehnung von lediglich 10 nm zu sehen, die zusätzlich einen Einschnitt in ihrer Mitte aufweist der ca. 4 nm breit ist. Die Resultate für die untere Bildreihe entsprachen den Ausmaßen einer Toxin-Pore. Die Resultate der oberen Bildreihe könnten durch die angewandte Scanrichtung im AFM verbreitert erscheinen, oder möglicherweise eine Präporen-Struktur darstellen..... 92

**Abbildung 37: Toxin-Interaktion mit ternärer oberflächenunterstützter Modell-Membran, aufgebaut aus ePC:eSM:Cholesterol (0.35:0.35:0.3) auf Silizium.** Die eingesetzte Proteinkonzentration lag bei [150 nM]. Im linken Bild ist eine Toxin-Anlagerung an den SPB innerhalb räumlich begrenzter Bereiche zu sehen. Teilweise scheint die Membran zerfetzt zu sein. Das Höhenprofil in der Mitte entspricht dem weißen Balken im linken Bild. Eine ca. 4 nm dicke Membran ist zu sehen, aus der Toxin-Strukturen ca. 4-5 nm herausragen. Das rechte Bild zeigt einen solchen Membranabschnitt in der Vergrößerung. Auch hier sind strukturierte Membranbereiche und solche ohne Strukturierung zu sehen..... 94

**Abbildung 38: Oberflächenunterstützte Modellmembran aus ePC:eSM:Cholesterol (0.35:0.35:0.3) auf Mica.** Strukturierte, räumlich begrenzte Membranabschnitte sind zu erkennen. Die eingesetzte Toxin-Konzentration lag bei 150 nM. Die Pfeile markieren die Höhenunterschiede zwischen der  $I_{\sigma}$ -Phase und der  $I_o$  -Phase. Dieser beträgt ca. 1 nm.

Strukturierungen der I<sub>o</sub>-Phase durch die Toxine ragen ca. 2 – 2,5 nm aus der Membran heraus. Die Proteininteraktion erfolgte verstärkt an Membranabschnitten dieser Phase. .... 97

**Abbildung 39: SDS-Gelelektrophorese an zwei verschiedenen SPBs des Systems I (ePC:eSM:Chol – 0.35:0.35:0.3) nach Interaktion mit 1µM Toxin.** Für die SPBs sind sowohl Banden für die Monomere als auch für die SDS-stabile Pore zu finden. Die Überstände enthalten lediglich Monomere. Eine Porenausbildung in den Modellmembranen ist demnach erfolgt. Volumen der SPB-Überschichtung mit Toxin? – MW der Markerbanden? ..... 98

**Abbildung 40: SDS-Gelelektrophorese an LUVs des System I (ePC:eSM:Chol – 0,35:0,35:0,3).** LUVs mit 1 µM bzw. 5 µM wurden aufgetragen, genauso wie LUVs ohne Toxin sowie reines Toxin in Konzentrationen von 1 µM und 5 µM. Hochmolekulare Banden die der Toxin-Pore entsprechen sind für die LUV-Proben mit Toxin sowie für die hochkonzentrierte Toxin-Probe (5 µM) zu sehen. .... 100

**Abbildung 41: Übersichtsdarstellung System IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) mit 20nM Toxin.** Unterschiedlich strukturierte Bereiche sind zu erkennen. Teilweise sind reine, unstrukturierte SPB-Abschnitte zu sehen (weiße Sterne), teilweise traten räumlich begrenzte Bereiche von strukturierten SPBs auf (schwarze Sterne). Außerdem sind Bereiche sichtbar, die das Substrat zeigen (Pfeile). Teile davon erscheinen unstrukturiert (weiße Pfeile), wohingegen andere Bereiche eine Strukturierung aufweisen (schwarze Pfeile)..... 102

**Abbildung 42: Höhenprofile unterschiedlicher Oberflächenbereiche des Systems IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) mit 20 nM Toxin.** Strukturierte sowie unstrukturierte Membranbereiche sind zu erkennen. Außerdem kam es zur teilweisen Strukturierung des Substrats. Eine Interaktion des Toxins erfolgte demnach mit Membranabschnitten der I<sub>o</sub>-Phase, sowie teilweise mit der Micaoberfläche. .... 104

**Abbildung 43: SDS-Gelelektrophorese an zwei verschiedenen SPBs des Systems IV nach Toxin-Interaktion.** Für die SPBs sind sowohl Banden für die Monomere als auch für die SDS-stabile Pore zu finden. Die Überstände enthalten lediglich Monomere. Die eingesetzte Toxin-Konzentration betrug 1 µM. Volumen der SPB-Überschichtung mit Toxin?..... 105

**Abbildung 44: Toxin-Interaktion mit reiner, unbehandelter Micaoberfläche.** Toxin-Konzentration [500nM]. Es zeigen sich klare Strukturierungen an der Oberfläche welche auf die Interaktion der Toxine mit dem Mica zurückzuführen sind. Eine relativ homogene Verteilung der Toxine ist zu erkennen. .... 106

**Abbildung 45: Schema zum Adsorptions- und Interaktionsverhalten für Vesikel der Lipidsystem IV (B) und V (A) auf Silizium.**..... 118

**Abbildung 46: Vergleich von SPBs hergestellt aus ePC auf Mica, vor (links) und nach Interaktion mit dem  $\alpha$ -Toxin.** Eine starke Strukturierung der Oberfläche der Membran nach Zugabe des Toxins ist erkennbar (rechts). ..... 132

**Abbildung 47: Vergleichende Darstellung eines SPBs aus Lipidsystem I auf Silizium, vor (links) und nach Interaktion mit dem  $\alpha$ -Toxin [150 nM].** Nach Toxin-Zugabe sind deutliche Strukturierungen und Erhöhungen innerhalb des SPBs zu erkennen. .... 136

**Abbildung 48: Vergleichende Darstellung eines SPBs aus Lipidsystem I auf Mica, vor (links) und nach Interaktion mit dem  $\alpha$ -Toxin [150 nM].** Nach Toxin-Zugabe sind auch hier deutliche Strukturierungen und Erhöhungen innerhalb des SPBs zu erkennen. .... 137

**Abbildung 49: Typisches Absorptionsspektrum für Crustaceen-Hämocyanin.** Der Peak bei 280 nm ist um Faktor 4,8 größer als der Peak bei 340 nm, was charakteristisch für Hämocyanine aus Crustaceen ist..... 144

**Abbildung 50: Röntgenabsorptionsspektren von oxygeniertem (rot) und deoxygeniertem (schwarz) Hämocyanin.** Die eingesetzte Hämocyanin-Konzentration lag bei 60 mg/ml, der verwendete Puffer war TRIS-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5. Die Temperatur in der Kammer betrug bei angelegtem Vakuum (Oxy-Spektrum) etwa Raumtemperatur was für eine vollständige Oxygenierung spricht. Bei eingesetzter Helium-Atmosphäre (Deoxy-Spektrum) lag die Temperatur bei ca. 15 bis 20°C [210]. ..... 146

**Abbildung 51: Röntgenabsorptionsspektren von deoxygenierten Hämocyanin-Lösungen.** Der rote Graph zeigt das Ergebnis für das mittels Natriumdithionit deoxygenierte Hämocyanin, der schwarze Graph das Resultat für das unter Heliumatmosphäre deoxygenierte Hämocyanin. Eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Spektren ist zu erkennen [210]..... 147

**Abbildung 52: Serienmessung über einen Zeitraum von 2.5 Stunden an einer deoxygenierten Hämocyanin-Lösung.** Die Reihenfolge der gemachten Messungen ist von oben (schwarz) nach unten (orange) aufgetragen. In den Spektren erfolgen keine nennenswerten Veränderungen über die Zeit. Eine Strahlenschädigung ist deshalb auszuschließen [210]..... 149

**Abbildung 53: Röntgenspektroskopische Messungen an Lösungen aus Kupfer-(II)-Chlorid.** *Oben:* 1M Kupfer-(II)-Chlorid-Lösung mit zwei auftretenden „White Lines“ bei 932 eV und 952 eV. *Unten:* 5 mM Kupfer-(II)-Chlorid-Lösung. Der Peak bei 932 eV ist gegenüber der 1M-Lösung schwächer ausgeprägt. Dafür tritt ein starker Peak bei 936 eV, sowie Strukturen zwischen 936 eV und 948 eV auf, die auf einen MLCT-Prozess schließen lassen. Weiterhin sind Peaks bei ca. 952 eV und 957 eV zu sehen. Der Peak bei 952 eV ist gegenüber der 1M-Kupfer-(II)-Chlorid-Lösung

schwächer ausgeprägt. Im unteren Graphen ist zusätzlich noch das Ergebnis für die deoxygenierte Hämocyanin-Lösung eingezeichnet (gestrichelte Linie) [210]..... 151

**Abbildung 54: Röntgenspektroskopische Messungen an Testlösungen die Kupfer-(II)-Clorid und Imidazol bzw. Histidin enthielten.** *Oben:* 25 mM Kupfer-II-Chlorid-Lösung mit 100 mM Imidazol; *Unten:* 50 mM Kupfer-II-Chlorid-Lösung mit 200 mM Histidin [210]. ..... 152

**Abbildung 55: Oxygeniertes aktives Zentrum aus *Limulus polyphemus* in unterschiedlichen Darstellungen.** Das Bild links oben zeigt das aktive Zentrum mit eingezeichneten Kupfer-Wasser-Abständen ohne weitere Proteinstrukturen. Die rechten Bilder zeigen noch Sekundärstrukturbereiche im unmittelbaren Umfeld des aktiven Zentrums. Die unteren Bilder stellen sowohl die Wassermoleküle als auch das gebunden Peroxid mit ihren van-der-Waals-Radien dar. Abstände und Aminosäure-Bezeichnung sind wegen der besseren Differenzierung nur in der „reduzierten Darstellung“ (links oben) eingezeichnet. .... 156

**Abbildung 56: Aktives Zentrum aus *Limulus polyphemus* in der oxygenierten und deoxygenierten Struktur.** Links oben ist die oxygenierte Form der Untereinheit II aus *L. polyphemus* mit den Kupfer-Wasserabständen eingezeichnet. Rechts oben ist die entsprechende Darstellung für die deoxygenierte Form dargestellt. Die untere Bildreihe zeigt die aktiven Zentren mit eingezeichneten van-der-Waals-Radien für Wassermoleküle und Peroxide. Weiterhin sind hier Teile der Proteinmatrix in der Bänderdarstellung gezeigt..... 157

**Abbildung 57: Vergleichende „reduzierte Darstellung“ der aktiven Zentren von *Limulus polyphemus* im oxygenierten (oben) und deoxygenierten Zustand (unten).** Die mit den roten, blauen und grünen Pfeilen markierten Wassermoleküle kommen in ähnlichen Positionen beiden Strukturen des Hämocyanins vor. Für die rot markierten Wassermoleküle variieren die Abstände zu den Kupferatomen zwischen 5,1 Å und 5,2 Å (oxygenierter Zustand), sowie 6,0 Å und 6,2 Å (deoxygenierter Zustand). Der Abstand für das blau markierte Wassermolekül bleibt dabei in beiden Zuständen gleich (6,6 Å). Für die grün markierten Wasser tritt wieder eine Variation der Abstände zwischen deoxygeniertem und oxygeniertem Zustand von 0,5 Å auf. Das obere Bild zeigt außerdem noch den sehr kurzen Abstand von 3,8 Å des zentralen Wassermoleküls zum Peroxid (magenta)..... 159

**Abbildung 58: Kupferzentren von *Panulirus interruptus*, *Octopus dofleini*, *Manduca sexta* und *Bacillus megaterium* (A - D).** Wassermoleküle sind rot eingefärbt und mit ihren Van-der-Waals-Radien eingezeichnet. Außerdem sind Teile der Sekundärstruktur in der Bänderdarstellung gezeigt, um die räumlichen Dimensionen zu verdeutlichen. .... 163

**Abbildung 59: Kupferzentren von *Panulirus interruptus*, *Octopus dofleini*, *Manduca sexta* und *Bacillus megaterium* (A - D).** Die grünen und magentafarbenen Pfeile markieren

Wassermoleküle, die in allen hier gezeigten Strukturen eine relativ ähnliche Lage aufweisen. In allen Fällen entspricht das linke Kupferatom dem Kupfer A und das rechte dem Kupfer B. .... 164

**Abbildung 60: Darstellung der möglichen Wasserpassage durch die Proteinmatrix des oxygenierten Hämocyanins aus *Limulus polyphemus*.** Die Bilder zeigen verschiedene Schnittebenen durch das Protein und die Pfeile markieren die beteiligten Wassermoleküle. Ganz rechts sind jeweils die Seitenansichten der Darstellungen und die entsprechende Schnittebene im Protein gezeigt. Die Bildfolge beginnt an der Außenseite und erstreckt sich ins Innere des Proteins (A – C)..... 166

**Abbildung 61: Darstellung der möglichen Wasserpassage durch die Proteinmatrix des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus*.** Die Bilder zeigen ebenfalls verschiedene Schnittebenen durch das Protein und die Pfeile markieren die beteiligten Wassermoleküle. Die Bildfolge schließt an die letzte Darstellung in Abbildung 60 (C) an und erstreckt sich bis zum aktiven Zentrum (D – E). .... 167

**Abbildung 62: Darstellung des oxygenierten aktiven Zentrums aus *Limulus polyphemus* mit allen kristallinen Wassermolekülen (PDB: 1OXY).** Bild (A) zeigt die Ansicht ohne Sekundärstrukturelemente und Darstellung (B) mit den Sekundärstrukturelementen in der Bänderdarstellung. Rechts ist jeweils eine Seitenansicht gezeigt. Die gelben Pfeile beschreiben die Abfolge der kristallinen Wassermoleküle die eine mögliche Wasserpassage durch die Proteinmatrix ausbilden..... 168

**Abbildung 63: Sauerstoffbeladenes aktives Zentrum aus *Limulus polyphemus*.** Dargestellt sind die sechs Histidine des aktiven Zentrums und ihre Abstände zu den Kupferatomen (blaue Kugeln), sowie die Distanz zwischen den Kupfern und den beiden Sauerstoffen des gebundenen Peroxids (dunkelrot). Die unterschiedlichen Abstände deuten sehr stark auf eine asymmetrische Bindungsgeometrie der beiden beteiligten Kupferatome hin (PDB-Code: 1OXY; [63])..... 171

**Abbildung 64: Schematische Darstellung der Elektronenverteilung im Kupferatom und der möglichen Elektronenübergänge.** Bild A zeigt die Elektronenverteilung für ein Kupferatom. Die kleinen schwarzen Punkte stellen die Elektronen dar. Die Linien die einzelnen Schalen und deren unterschiedliche Orbitale. Für den Kupfer-II-Zustand liegen nur 27 Elektronen auf den Schalen verteilt vor, was den schwarzen Punkten entspricht. Für den Kupfer-I-Zustand liegen 28 Elektronen vor (schwarze Punkte und der grüne Punkt). Atomares Kupfer hätte 29 Elektronen (schwarze Punkte, roter Punkt und grüner Punkt). Die Bilder B & C zeigen die möglichen Elektronenübergänge aus dem p-Orbital der L-Schale ins d-Orbital der M-Schale (Kupfer-II-Zustand / Bild B) sowie aus dem p-Orbital der L-Schale ins s-Orbital der N-Schale (Kupfer-I-Zustand / Bild C)..... 172

**Abbildung 65: Röntgenstruktur des aktiven Zentrums von *Limulus polyphemus* im Met-Zustand.** Zwei Sauerstoffatome (rot) sind unmittelbar zwischen den Kupferatomen koordiniert, jedoch nicht als Peroxid. Diese sind entweder zwei Hydroxyl-Gruppen oder zwei Wassermolekülen zuzuordnen, die zwischen den beiden Kupfern koordiniert sind. Der Abstand zwischen den Kupferatomen beträgt hier 3,1 Å, und ist somit gegenüber der Oxy-Form um ca. 0,5 Å, und gegenüber der Deoxy-Form um ca. 1,5 Å verringert. (nach Magnus 1994 – PDB-Code: 1LL1)..... 176

**Abbildung 66: Typ-3-Kupferzentren aus *Manduca sexta* (oben) und *Bacillus megaterium* (unten) mit Wassermolekülen der Proteinmatrix.** Für die Untereinheit B der Pro-Phenoloxidase aus *Manduca sexta* liegt ein Wassermolekül (rot) direkt zwischen den beiden Kupferatomen. Dieses Molekül weist Abstände zu den beiden Kupfern von 2,5 Å und 2,7 Å auf. In der Struktur der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* liegt ebenfalls ein Wasser (rot) sehr nahe an den Kupfern (2,2 Å zu beiden Kupferatomen). Zwei weitere Wassermoleküle (gelb & orange) liegen etwas außerhalb der Ebene der Kupferatome, weisen aber ebenfalls sehr geringe Abstände zu den Kupfern auf (2,3 Å – 3,5 Å)..... 180

**Abbildung 67: Schematische Darstellungen einer mögliche Kupfer-Wasser-Koordination im aktiven Kupfer-Zentrum.** Bild A zeigt das aktive Zentrum mit zwei koordinierten Wassermolekülen. Bild B zeigt eine Anordnung mit vier Wassermolekülen. Konkrete Aussagen zur Art der Bindung und zur Anzahl der Bindungspartner sind nicht möglich, und diese Darstellungen sollen lediglich Vorschläge diesbezüglich liefern. Eine Koordination mit mehreren Wassermolekülen im aktiven Zentrum würde, auf Grund des größeren räumlichen Bedarfs, die Aufweitung des aktiven Zentrums im Deoxy-Zustand gegenüber dem Oxy-Zustand von ca. 1,0Å besser erklären [210]..... 181

**Abbildung 68: Schematische Darstellung des Elektronenspeicherrings Bessy II am Helmholtz-Zentrum Berlin Adlershof.** Die Lage der Beamline U41-PGM im Segment 7 ist grau hinterlegt. .... XXXIV

## 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Übersicht zur Einteilung einschaliger Vesikel nach ihrer Größe. ....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zusammensetzungen einschaliger Vesikel.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 3: Verwendete Filter .....</b>	<b>50</b>
<b>Tabelle 4: Ternäre Phospholipidsysteme und ihre Komponenten.</b> Die Verhältnisse der eingesetzten Phospholipid-Komponenten in den einzelnen Systemen waren jeweils PC:SM:Chol - 0.35:0.35:0.3. ....	<b>66</b>
<b>Tabelle 5: Ternäre Lipidsysteme die eine alternative Phospholipid-Komponente mit niedrigem Schmelzpunkt enthielten.</b> Hier werden DOPS und DOTAP als Alternative zu den in System I – III verwendeten PC-Molekülen eingesetzt. Die Verhältnisse der Lipid-Komponenten waren für System IV (DOPS:PSM:Chol - 2:1:1) und für System V (DOTAP:PSM:Chol - 1:1:1).....	<b>80</b>
<b>Tabelle 6: Übersichtstabelle über die wichtigsten Parameter der in dieser Arbeit verwendeten ternären Lipidsysteme.....</b>	<b>88</b>
<b>Tabelle 7: Ternäre Phospholipidsysteme und ihre Komponenten.</b> Die Verhältnisse der Phospholipid-Komponenten für System I - III sind jeweils PC:SM:Chol (0.35:0.35:0.3). Für System IV wurde die Komposition DOPS:PSM:Chol (2:1:1), und für System V die Komposition DOTAP (1:1:1) verwendet.....	<b>111</b>
<b>Tabelle 8: Übersicht über die erhaltenen QCM-D-Werte bezüglich der Interaktion der verschiedenen Lipidsysteme mit Siliziumdioxid-Oberflächen.</b> Die in Klammern gesetzten Ziffern weisen auf die jeweilige Interaktionsform hin, wie sie in der Aufzählung weiter oben beschrieben ist.....	<b>113</b>
<b>Tabelle 9: Übersichtstabelle für in der Literatur beschriebene Vesikel-Adsorptionsprozesse.</b> Die in Klammern gesetzten Ziffern weisen auf die jeweilige Interaktionsform hin, wie sie in der Aufzählung weiter oben beschrieben ist.....	<b>115</b>
<b>Tabelle 10: Farb- und Formcodierung für die in den hier gezeigten Abbildungen dargestellten Strukturelemente.</b> Kristallines Wasser wird als Sauerstoffatom ohne Wasserstoffatome gezeigt. Die Darstellung erfolgt als rote Kugeln (Sauerstoffanteil des Wassers). Diese sind je nach Ansicht	

als kleine oder als raumfüllende Kugeln dargestellt. Die raumfüllende Darstellung entspricht den van der Waals Radien der gezeigten Atome..... 154

**Tabelle 11: Abstände der Wassermoleküle aus den aktiven Zentren des oxygenierten (1OXY) und des deoxygenierten (1LLA) Hämocyanins aus *Limulus polyphemus*.** Die in Betracht gezogenen Wassermoleküle wiesen zumindest zu einem der Kupferatome einen Abstand von weniger als 7 Å auf, und sind durch ihre Nummerierung in der jeweiligen Kristallstruktur gekennzeichnet. Dunkel hinterlegte Felder markieren Kupfer-Wasserabstände welche den Grenzwert von 7 Å leicht überschreiten. Diese sind in Abbildung 57 nicht eingezeichnet und hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt..... 160

## 11 Literaturverzeichnis

1. OLSON, R. et al. Crystal structure of Staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 2, p. 134-140, 1999.
2. VALEVA, A. et al. Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26014-26021, 2006.
3. BECK, C. **Hämocyanin-Adsorption an Siliziumstrukturen**. Johannes Gutenberg-Universität Mainz. [S.I.]. 2006.
4. PANZER, D. et al. Transmission photoemission electron microscopy for lateral mapping of the X-ray absorption structure of a metalloprotein in a liquid cell. **Eur Biophys J**, 38, n. 1, 2008. 53-58.
5. PANZER, D. **Ortsaufgelöste Röntgenabsorptions-Nahkantenspektroskopie am Atmungsprotein Hämocyanin**. Johannes Gutenberg Universität Mainz. [S.I.]. 2007.

6. ERKER, W. et al. Immobilization and AFM of single 4x6-mer tarantula hemocyanin molecules. **Micron**, v. 37, n. 8, p. 735-741, 2006.
7. MOLLER, M.; DECKER, H. Tarantula hemocyanins imaged by atomic force microscopy. **Micron**, v. 35, n. 1-2, p. 15-16, 2004.
8. AZIZ, E. F. et al. Cation-Specific Interactions with Carboxylate in Amino Acid and Acetate Aqueous Solutions: X-ray Absorption and ab initio Calculations. **J. Phys. Chem. B**, v. 112, n. 40, p. 12567-12570, 2008.
9. AZIZ, E. F. et al. Probing the Electronic Structure of the Hemoglobin Active Center in Physiological Solutions. **Phys. Rev. Lett.**, v. 102, n. 6, p. 68103-4, 2009.
10. GILBERT, R. J. C. Pore-forming toxins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 5, p. 832-844, 2002.
11. GONZALEZ, M. et al. Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 3, 2008. 493-507.
12. IACOVACHE, I.; VAN DER GOOT, F. G.; PERNOT, L. Pore formation: An ancient yet complex form of attack. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1778, n. 7-8, 2008. 1611-1623.
13. IACOVACHE, I.; BISCHOFBERGER, M.; VAN DER GOOT, F. G. Structure and assembly of pore-forming proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, 20, n. 2, 2010. 241-246.
14. REIG, N.; VAN DER GOOT, F. G. About lipids and toxins, 580, n. 23, 2006. 5572-5579.
15. AKTORIES, K. **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie**. [S.l.]: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 10, 2009.
16. SCHÖN, P. et al. Equinatoxin II Permeabilizing Activity Depends on the Presence of Sphingomyelin and Lipid Phase Coexistence. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 2, p. 691-698, 2008.
17. MOU, J.; YANG, J.; SHAO, Z. Atomic Force Microscopy of Cholera Toxin B-oligomers Bound to Bilayers of Biologically Relevant Lipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 248, n. 3, p. 507-512, 1995.
18. DIEP, D. B. et al. Glycosylphosphatidylinositol Anchors of Membrane Glycoproteins Are Binding Determinants for the Channel-forming Toxin Aerolysin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2355-2360, 1998.
19. LAKHAN, S. E.; SABHARANJAK, S.; DE, A. Endocytosis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, 2009.
20. GORDON, V. M. et al. Clostridium septicum Alpha Toxin Uses Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 27274-

27280, 1999.

21. OGSTON, A. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. **The British Medical Journal**, p. 369-375, 1881.
22. NOBLE, W. C. Skin bacteriology and the role of Staphylococcus aureus in infection. **British Journal of Dermatology**, v. 139, p. 9-12, 1998.
23. WIESE-POSSELT, M. et al. Successful termination of a furunculosis outbreak due to lukS-lukF-positive, methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in a German village by stringent decolonization. **Clinical Infectious Diseases**, 2002-2005, 44, n. 11, 2007. 88-95.
24. ARVOLA, T. et al. Rectal Bleeding in Infancy: Clinical, Allergological, and Microbiological Examination. **Pediatrics**, v. 117, n. 4, p. e760-e768, April 2006.
25. BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 55, n. 4, p. 733-751, 1991.
26. WARDENBURG, J. B.; SCHNEEWIND, O. Vaccine protection against Staphylococcus aureus pneumonia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 2, p. 287-294, 2008.
27. GRAY, G. S.; KEHOE, M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from Staphylococcus aureus wood 46. **Infect. Immun.**, v. 46, n. 2, p. 615-618, 1984.
28. BHAKDI, S. et al. Human Hyperimmune Globulin Protects Against the Cyto-toxic Action of Staphylococcal Alpha-toxin In vitro and In vivo. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 10, p. 3214-3220, 1989.
29. VALEVA, A.; PALMER, M.; BHAKDI, S. Staphylococcal alpha-toxin: Formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. **Biochemistry**, v. 36, n. 43, p. 13298-13304, 1997.
30. GOUAUX, E.; HOBAUGH, M.; SONG, L.  $\alpha$ -Hemolysin,  $\gamma$ -hemolysin, and leukocidin from Staphylococcus aureus: Distant in sequence but similar in structure. **Protein Science**, v. 6, n. 12, p. 2631-2635, 1997.
31. SONG, L. Z. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, n. 5294, p. 1859-1866, 1996.
32. WARD, R. J. et al. Identification of A Putative Membrane-inserted Segment In the Alpha-toxin of Staphylococcus-aureus. **Biochemistry**, v. 33, n. 23, p. 7477-7484, 1994.
33. VALEVA, A. et al. Molecular architecture of a toxin pore: A 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. **Embo Journal**, v. 15, n. 8, p. 1857-1864, 1996.

34. MEESTERS, C. et al. Structural characterization of the alpha-hemolysin monomer from *Staphylococcus aureus*. **Proteins**, v. 75, n. 1, p. 118-126, 2009.
35. PETERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
36. HARSHMAN, S.; BONDURANT, M. Susceptibility to staphylococcal alpha-toxin of Friend virus-infected murine erythroblasts during differentiation. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 1, p. 114-118, 1985.
37. WILKE, G. A.; WARDENBURG, J. B. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. **PNAS**, 107, n. 30, 2010. 13473-13478.
38. IKIGAI, H.; NAKAE, T. Interaction of the Alpha-toxin of *Staphylococcus-aureus* With the Liposome Membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 5, p. 2150-2155, 1987.
39. WATANABE, M.; TOMITA, T.; YASUDA, T. Membrane-damaging action of staphylococcal alpha-toxin on phospholipid-cholesterol liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 898, n. 3, p. 257-265, 1987.
40. AITTONIEMI, J. et al. Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 4, p. 1125-1137, 2007.
41. HUANG, J. Y.; FEIGENSON, G. W. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 4, p. 2142-2157, 1999.
42. BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic Force Microscope, 56, n. 9, 1986. 930-934.
43. MORII, T. et al. An AFM study of the elasticity of DNA molecules. **Thin Solid Films**, v. 464-465, p. 456-458, 2004.
44. WEISENHORN, A. L. et al. Streptavidin binding observed with an atomic force microscope. **Ultramicroscopy**, v. 42-44, n. Part 2, p. 1125-1132, 1992.
45. THOMSON, N. H. et al. Oriented, active *Escherichia coli* RNA polymerase: An atomic force microscope study. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 2, p. 1024-1033, 1999.
46. HUI, S. W. et al. The Structure and Stability of Phospholipid-bilayers By Atomic-force Microscopy. **Biophysical Journal**, v. 68, n. 1, p. 171-178, 1995.
47. IJIMA, K. et al. Observations of the distribution of GM3 in membrane microdomains by atomic force microscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 337, n. 2, p. 369-374, 2009.

48. PELLING, A. E. et al. Nanoscale visualization and characterization of Myxococcus xanthus cells with atomic force microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 18, p. 6484-6489, 2005.
49. TURNER, R. D. et al. Improvement of the pore trapping method to immobilize vital coccoid bacteria for high-resolution AFM: a study of Staphylococcus aureus. **Journal of Microscopy**, v. 238, n. 2, p. 102-110, 2010.
50. SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.
51. WINTER, R. Struktur und Dynamik von Modellmembranen. **Chem. unserer Zeit**, v. 24, p. 71-81, 1990.
52. SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569-572, 1997.
53. SIMONS, K.; VANMEER, G. Lipid Sorting In Epithelial-cells. **Biochemistry**, v. 27, n. 17, p. 6197-6202, 1988.
54. GINDY, M. E.; PRUD'HOMME, R. K. Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy. **Expert Opinion On Drug Delivery**, v. 6, n. 8, p. 865-878, 2009.
55. SCHROEDER, A.; KOST, J.; BARENHOLZ, Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 162, n. 1-2, p. 1-16, 2009.
56. SACKMANN, E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. **Science**, v. 271, n. 5245, p. 43-48, 1996.
57. REVIKINE, I.; BRISSON, A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. **Langmuir**, v. 16, n. 4, p. 1806-1815, 2000.
58. LIANG, X.; MAO, G.; SIMON, K. Y. Probing small unilamellar EggPC vesicles on mica surface by atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 34, n. 1, p. 41-51, 2004.
59. LEONENKO, Z. V.; CARNINI, A.; CRAMB, D. T. Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1509, n. 1-2, p. 131-147, 2000.
60. JOHNSTON, L. J. Nanoscale imaging of domains in supported lipid membranes. **Langmuir**, v. 23, n. 11, p. 5886-5895, 2007.
61. VAN HOLDE, K. E.; MILLER, K. I. Hemocyanins. [S.l.]: [s.n.], v. 47, 1995. p. 1-81.

62. VAN HOLDE, K. E.; MILLER, K. I.; DECKER, H. Hemocyanins and invertebrate evolution. [S.l.]: [s.n.], v. 276, 2001. p. 15563-15566.
63. MAGNUS, K. A. et al. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. **Protein. Struct. Funct. Genet.**, v. 19, n. 4, p. 302-309, 1994.
64. BURMESTER, T. Molecular Evolution of the Arthropod Hemocyanin Superfamily. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, n. 2, p. 184-195, 2001.
65. BURMESTER, T. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. **J. Comp. Physiol. B**, v. 172, n. 2, p. 95-107, 2002.
66. TERWILLIGER, N. B.; DANGOTT, L.; RYAN, M. Cryptocyanin, a crustacean molting protein: Evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 5, p. 2013-2018, 1999.
67. BURMESTER, T. Identification, molecular cloning, and phylogenetic analysis of a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13217-13222, 1999.
68. GAYKEMA, W. P. J. et al. 3.2 Å Structure of the Copper-containing, Oxygen-carrying Protein *Panulirus-interruptus* Hemocyanin. **Nature**, v. 309, n. 5963, 1984. 23-29.
69. MARKL, J. et al. Quaternary and Subunit Structure of *Calliphora-arylphorin* As Deduced From Electron-microscopy, Electrophoresis, and Sequence Similarities With Arthropod Hemocyanin. **Journal of Comparative Physiology B-biochemical Systemic and Environmental Physiology**, v. 162, n. 8, p. 665-680, 1992.
70. VOIT, R. et al. Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum* - Structure and intramolecular evolution of the subunits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39339-39344, 2000.
71. VOLBEDA, A.; J., W. G. Pseudo 2-fold Symmetry In the Copper-binding Domain of Arthropodan Hemocyanins - Possible Implications For the Evolution of Oxygen-transport Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 206, n. 3, p. 531-546, 1989.
72. VOLBEDA, A.; J., W. G. Crystal-structure of Hexameric Hemocyanin From *Panulirus-interruptus* Refined At 3.2-Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 209, n. 2, p. 249-279, 1989.
73. GEBAUER, W.; MARKL, J. Identification of four distinct subunit types in the unique 6 x 6 hemocyanin of the centipede *Scutigera coleoptrata*. **Naturwissenschaften**, v. 86, n. 9, p. 445-447, 1999.
74. JAENICKE, E. et al. Identification, structure, and properties of hemocyanins from diplopod

- myriapoda. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 41, p. 29071-29074, 1999.
75. DOLASHKA-ANGELOVA, P. et al. Structural and spectroscopic studies of the native hemocyanin from *Maia squinado* and its structural subunits. **Spectrochimica Acta Part A-molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 56, n. 10, p. 1985-1999, 2000.
76. DECKER, H.; TERWILLIGER, N. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 12, p. 1777-1782, 2000.
77. ROLFF, M. et al. Copper-O<sub>2</sub> reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, n. 7, p. 4077-4098, 2011.
78. PAUL, R. J. et al. Gas-transport In the Hemolymph of Arachnids.1. Oxygen-transport and the Physiological-role of Hemocyanin. **Journal of Experimental Biology**, v. 188, p. 25-46, 1994.
79. DECKER, H. et al. SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 17796-17799, 2001.
80. DECKER, H.; TUCZEK, F. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, n. 8, p. 392-397, 2000.
81. DECKER, H.; RIMKE, T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25889-25892, 1998.
82. RIMKE, T.; DECKER, H. Two different functions for one active site: Oxygen binding and phenoloxidase activity of tarantula hemocyanin. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 2, p. A66--A66, 1998.
83. ADACHI, K. et al. A 160-kDa protein is essential for hemocyanin-derived melanosis of prawn. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 3, 2003. 765-769.
84. ADACHI, K. et al. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology B-biochemistry & Molecular Biology**, v. 134, n. 1, p. PII S1096-4959(02)00220-8, 2003.
85. ADACHI, K. et al. An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. **Pigment Cell Res.**,v. 19, n. 3, 2005. 214-219.
86. JAENICKE, E.; DECKER, H. Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. **Micron**, v. 35, n. 1-2, p. 89-90, 2004.
87. MATOBA, Y. et al. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**,v. 281, n. 13, 2006. 8981-8990.

88. DECKER, H.; JAENICKE, E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, n. 7-8, p. 673-687, 2004.
89. BELTRAMINI, M. et al. The Reaction of Cu<sup>2+</sup> With the Binuclear Copper Site of Neurospora Tyrosinase - Its Relevance For A Comparison Between Tyrosinase and Hemocyanin Active-sites. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1040, n. 3, p. 365-372, 1990.
90. HARRIS, J. R.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. **Micron**, v. 30, n. 6, p. 597-623, 1999.
91. MARKL, J. et al. Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 127, p. German Cancer Soc, 2001.
92. GATSOGIANNIS, C.; MARKL, J. Keyhole Limpet Hemocyanin: 9-angstrom CryoEM Structure and Molecular Model of the KLH1 Didecamer Reveal the Interfaces and Intricate Topology of the 160 Functional Units. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 3, p. 963-983, 2009.
93. LIEB, B. et al. Molluscan mega-hemocyanin: an ancient oxygen carrier tuned by a similar to 550 kDa polypeptide. **Frontiers In Zoology**, v. 7, p. 14, 2010.
94. HARRIS, J. R. et al. Two-dimensional crystallization, transmission electron microscopy and image processing of keyhole Limpet Haemocyanin (KLH). **Micron and Microscopica Acta**, v. 23, n. 3, p. 287-301, 1992.
95. MEISSNER, U. et al. Structure of a molluscan hemocyanin didecamer (HtH1 from *Haliotis tuberculata*) at 12 Å resolution by cryoelectron microscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 298, n. 1, p. 21-34, 2000.
96. KOSHLAND, D. E.; NEMETHY, G.; FILMER, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models In Proteins Containing Subunits. **Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 365--\&, 1966.
97. MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J. P. On Nature of Allosteric Transitions - A Plausible Model. **Journal of Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 88--\&, 1965.
98. DECKER, H.; ROBERT, C. H.; GILL, S. J. Invertebrate Oxygen Carriers. [S.l.]: Springer-Verlag Heidelberg, 1986. Cap. Nesting - an extension of the allosteric model and its application to tarantula hemocyanin., p. 383-388.
99. ROBERT, C. H. et al. Nesting: Hierarchies of Allosteric Interactions. **PNAS**, v. 84, n. 7, p. 1891-1895, 1987.
100. DECKER, H.; STERNER, R. Nested allostery of arthropodan hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*). The role of protons. **J Mol Biol**, v. 211, n. 1, p. 281-

293, 1990.

101. HELLMANN, N. Bohr-effect and buffering capacity of hemocyanin from the tarantula *E-californicum*. **Bioophysical Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 157-167, 2004.
102. MENZE, M. A. et al. Allosteric models for multimeric proteins: Oxygen-linked effector binding in hemocyanin. **Biochemistry**, v. 44, n. 30, p. 10328-10338, 2005.
103. STERNER, R. R. et al. Tris - An Allosteric Effector of Tarantula Hemocyanin. **Febs Letters**, v. 339, n. 1-2, p. 37-39, 1994.
104. HARTMANN, H. et al. The allosteric effector L-lactate induces a conformational change of 2x6-meric lobster hemocyanin in the oxy state as revealed by small angle x-ray scattering. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19954-19958, 2001.
105. MENZE, M. A. et al. Binding of urate and caffeine to haemocyanin analysed by isothermal titration calorimetry. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 5, p. 1033-1038, 2001.
106. HELLMANN, N. et al. Urate as effector for crustacean hemocyanins. **Micron**, v. 35, n. 1-2, 2004. 109-110.
107. HERSKOVITS, T. T.; RUSSELL, M. W.; CARBERRY, S. E. Light-scattering investigation of the subunit structure and sequential dissociation of *Homarus americanus* hemocyanin. **Biochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1875-1881, 1984.
108. BROUWER, M.; WINGE, D. R.; GRAY, W. R. Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster *Homarus americanus*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 289-303, 1989.
109. MAGLIOZZO, R. S. et al. Cu(II) coordination in arthropod and mollusk green half-methemocyanins analyzed by electron spin-echo envelope modulation spectroscopy. **Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1513-1523, 1995.
110. STOEVA, S. et al. Subunit composition and N-terminal analysis of arthropod hemocyanins. **Comparative Biochemistry and Physiology B-biochemistry & Molecular Biology**, v. 122, n. 1, p. 69-75, 1999.
111. CO, M. S.; HODGSON, K. O. Copper site of deoxyhemocyanin. Structural evidence from x-ray absorption spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 103, n. 11, p. 3200-3201, 1981.
112. CO, M. S. et al. Copper site of molluscan oxyhemocyanins. Structural evidence from X-ray absorption spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 103, n. 4, p. 984-986, 1981.
113. WOOLERY, G. L. et al. EXAFS studies of binuclear copper site of oxy-, deoxy-, metaquo-, metfluoro-, and metazido hemocyanin from arthropods and molluscs. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 106, n. 1, p. 86-92, 1984.

114. HAZES, B. et al. Crystal-Structure Of Deoxygenated
115. SABATUCCI, A. et al. Comparison of the X-ray absorption properties of the binuclear active site of molluscan and arthropodan hemocyanins. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 7, n. 1-2, p. 120-128, 2002.
116. TEO, B. K. et al. **EXAFS: Basic principles and data analysis**. [S.l.]: van Nostrand, R., 1986.
117. SOLOMON, E. I. et al. Kupferproteine: Koordination und Aktivierung von Sauerstoff und seine Reduktion zu Wasser. **Angewandte Chemie**, v. 113, n. 24, p. 4702-4724, 2001.
118. AZIZ, E. F. et al. Interaction between liquid water and hydroxide revealed by core-hole de-excitation. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 89-91, 2008.
119. BONHOMMEAU, S. et al. Solvent effect of alcohols at the L-edge of iron in solution: X-ray absorption and multiplet calculations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 40, p. 12571-12574, 2008.
120. ASCONE, I. et al. Saccharose solid matrix embedded proteins: a new method for sample preparation for X-ray absorption spectroscopy. **European Biophysics Journal With Biophysics Letters**, v. 29, n. 6, p. 391-397, 2000.
121. STRANGE, R. W.; FEITERS, M. C. Biological X-ray absorption spectroscopy (BioXAS): a valuable tool for the study of trace elements in the life sciences. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 5, p. 609-616, 2008.
122. MYNENI, S. et al. Spectroscopic probing of local hydrogen-bonding structures in liquid water. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 14, n. 8, p. L213-L214, 2002.
123. STÖHR, J. **NEXAFS Spectroscopy**. [S.l.]: Springer-Verlag, 1996.
124. SCOPES, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 277-282, 1974.
125. BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Physical Structure of Phospholipids In Salts Solution. **J. Mol. Biol.**, n. 10, 1965. 421--428.
126. OLSON, F. et al. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 557, n. 1, p. 9-23, 1979.
127. MOSCHO, A. et al. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 21, p. 11443-11447, 1996. GUV.
128. JANOSCH, S. **Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Wechselwirkung von Peptiden und Proteinen mit Modellbiomembransystemen**. Universität Dortmund. [S.l.].

2004.

129. MCCONNELL, H. M. et al. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 864, n. 1, p. 95-106, 1986.
130. STEINEM, C.; JANSHOFF, A. Grounded and but mobile - Model membrane on surface. **Chemie In Unserer Zeit**, v. 42, n. 2, p. 116-127, 2008.
131. PETERSON, I. R. Langmuir-blodgett-films. **Journal of Physics D-applied Physics**, v. 23, n. 4, p. 379-395, 1990.
132. TERO, R.; WATANABE, H.; URISU, T. Supported phospholipid bilayer formation on hydrophilicity-controlled silicon dioxide surfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, p. 3885-3894, 2006.
133. RODAHL, M. QCMD-Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. **Rev. Sci. Instrum.**, v. 66, p. 3924-3930, 1995.
134. JUNG, C. et al. First results of the soft X-ray microfocus beamline U41-PGM. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 467-468, n. Part 1, p. 485-487, 2001.
135. VAN HOLDE, K. E.; WEISCHET, W. O. Boundary Analysis of Sedimentation-velocity Experiments With Monodisperse and Paucidisperse Solutes. **Biopolymers**, v. 17, n. 6, 1978. 1387-1403.
136. METHODEN in der Proteinanalytik. [S.l.]: Holtzhauser, 1996.
137. HILDEBRAND, A.; POHL, M.; BHAKDI, S. Staphylococcus-aureus Alpha-toxin - Dual Mechanism of Binding To Target-cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 26, p. 17195-17200, 1991.
138. YUAN, C. B. et al. The size of lipid rafts: An atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 5, p. 2526-2535, 2002.
139. MILHIET, P. E.; GIOCONDI, M.-C.; GRIMELLEC, C. L. AFM Imaging of Lipid Domains in Model Membranes. **TheScientificWorldJOURNAL**, v. 3, p. 59-74, 2003.
140. TOKUMASU, F. et al. Nanoscopic lipid domain dynamics revealed by atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 4, p. 2609-2618, 2003.
141. TOKUMASU, F. et al. Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. **Ultramicroscopy**, v. 97, n. 1-4, p. 217-227, 2003.

142. GIOCONDI, M. C. et al. Structural diversity of sphingomyelin microdomains. **Ultramicroscopy**, v. 100, n. 3-4, p. 135-143, 2004.
143. GIOCONDI, M. C. et al. Use of cyclodextrin for AFM monitoring of model raft formation. **Biophysical Journal**, v. 86, n. 2, p. 861-869, 2004.
144. LIN, W.-C. **Lipid Domains in Supported Lipid Bilayer for Atomic Force Microscopy - Methods in Molecular Biology - Chapter 34**. [S.l.]: Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 2008.
145. LIN, W.-C. et al. Lipid Asymmetry in DLPC/DSPC-Supported Lipid Bilayers: A Combined AFM and Fluorescence Microscopy Study. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 1, 2006. 228-237.
146. CHOUCAIR, A. et al. Preferential accumulation of A[ $\beta$ ](1-42) on gel phase domains of lipid bilayers: An AFM and fluorescence study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n. 1, p. 146-154, 2007.
147. ANDERSON, T. H. et al. Formation of Supported Bilayers on Silica Substrates. **Langmuir**, v. 25, n. 12, p. 6997-7005, 2009.
148. GUO, P. F. et al. AFM and Multiple Transmission-Reflection Infrared Spectroscopy (MTR-IR) Studies on Formation of Air-Stable Supported Lipid Bilayers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 3, p. 1407-1418, 2009.
149. REIMHULT, E.; KASEMO, B.; HOOK, F. Rupture Pathway of Phosphatidylcholine Liposomes on Silicon Dioxide. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 4, p. 1683-1696, 2009.
150. PFEIFFER, I. et al. Vesicle Adsorption and Phospholipid Bilayer Formation on Topographically and Chemically Nanostructured Surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 13, p. 4623-4631, 2010.
151. PFEIFFER, I. et al. Influence of Nanotopography on Phospholipid Bilayer Formation on Silicon Dioxide. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 16, p. 5175-5181, 2008.
152. SEEGER, H. M. et al. Supported Lipid Bilayers on Mica and Silicon Oxide: Comparison of the Main Phase Transition Behavior. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 27, p. 8926-8933, 2010.
153. RICHTER, R. P.; BRISSON, A. QCM-D on mica for parallel QCM-D-AFM studies. **Langmuir**, v. 20, n. 11, p. 4609-4613, 2004.
154. MASLOVA, M. V.; GERASIMOVA, L. G.; FORSLING, W. Surface Properties of Cleaved Mica. **Colloid Journal**, v. 66, n. 3, 2004. 322-328.
155. GARCIA-MANYES, S.; ONCINS, G.; SANZ, F. Effect of pH and ionic strength on phospholipid nanomechanics and on deposition process onto hydrophilic surfaces measured by AFM. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 24, p. 5029-5036, 2006. Bioelectrochemistry 2005 -

Bioelectrochemistry 2005.

156. REIMHULT, E.; HOOK, F.; KASEMO, B. Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. **Langmuir**, v. 19, n. 5, 2003. 1681-1691.
157. REIMHULT, E.; KASEMO, B. Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. **Langmuir**, v. 19, n. 5, p. 1681-1691, 2003.
158. BULDT, G. et al. Neutron-diffraction Studies On Phosphatidylcholine Model Membranes.1. Head Group Conformation. **Journal of Molecular Biology**, v. 134, n. 4, p. 673-691, 1979.
159. CZAJKOWSKY, D. M.; SHENG, S. T.; SHAO, Z. F. Staphylococcal alpha-hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers. **Journal of Molecular Biology**, v. 276, n. 2, p. 325-330, 1998.
160. SEANTIER, B. et al. In Situ Investigations of the Formation of Mixed Supported Lipid Bilayers Close to the Phase Transition Temperature. **Nano Letters**, v. 4, n. 1, p. 5-10, 2004.
161. TOKUMASU, F. et al. Nanoscopic lipid domain dynamics revealed by Atomic Force Microscopy. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 1, p. 763, 2002.
162. SUNDH, M.; SVEDHEM, S.; SUTHERLAND, D. S. Influence of phase separating lipids on supported lipid bilayer formation at SiO<sub>2</sub> surfaces. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 12, n. 2, p. 453-460, 2010.
163. CHIANTIA, S. et al. Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 12, p. 4500-4508, 2006.
164. CHIANTIA, S. et al. Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes. **Chemphyschem**, v. 7, n. 11, p. 2409-2418, 2006.
165. GIOCONDI, M.-C. et al. Phase Topology and Growth of Single Domains in Lipid Bilayers. **Langmuir**, v. 17, n. 5, 2001. 1653-1659.
166. JENSEN, M. H.; MORRIS, E. J.; SIMONSEN, A. C. Domain Shapes, Coarsening, and Random Patterns in Ternary Membranes. **Langmuir**, v. 23, n. 15, p. 8135-8141, 2007.
167. GOKSU, E. I. et al. AFM for structure and dynamics of biomembranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 1, p. 254-266, 2009. Lipid Interactions, Domain Formation, and Lateral Structure of Membranes.
168. MILHIET, P. E. et al. Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts. **Embo Reports**, v. 3, n. 5, p. 485-490, 2002.

169. ALMEIDA DE, R. F. M.; FEDOROV, A.; PRIETO, M.  
Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 4, 2003. 2406-2416.
170. LONDON, E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. **Biochimica Et Biophysica Acta-molecular Cell Research**, v. 1746, n. 3, p. 203-220, 2005.
171. D'ACUNTO, M. et al. Fast formation of ripples induced by AFM. A new method for patterning polymers on nanoscale. **Materials Letters**, v. 61, n. 14-15, p. 3305-3309, 2007.
172. VEATCH, S. L.; KELLER, S. L. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 5, p. 3074-3083, 2003.
173. VEATCH, S. L. Electro-formation and fluorescence microscopy of giant vesicles with coexisting liquid phases. **Methods Mol Biol**, v. 398, p. 59-72, 2007.
174. RICHTER, R. P.; BRISSON, A. R. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: A study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 5, p. 3422-3433, 2005.
175. FANG, Y. et al. The Heptameric Prepore of a Staphylococcal alpha-Hemolysin Mutant in Lipid Bilayers Imaged by Atomic Force Microscopy. **Biochemistry**, v. 36, n. 31, p. 9518-9522, 1997.
176. STEMMER, A.; ENGEL, A. Imaging Biological Macromolecules By Stm - Quantitative Interpretation of Topographs. **Ultramicroscopy**, v. 34, n. 3, p. 129-140, 1990.
177. PUNTHEERANURAK, T. et al. Structure and distribution of the Bacillus thuringiensis Cry4Ba toxin in lipid membranes. **Ultramicroscopy**, v. 105, n. 1-4, p. 115-124, 2005.
178. MEIRI, K. F. Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 360, n. 1461, 2005. 1663-1672.
179. BENES, M. et al. Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica, and glass. **Langmuir**, v. 20, n. 23, p. 10129-10137, 2004.
180. REIMHULT, E.; HOOK, F.; KASEMO, B. Vesicle adsorption on SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>: Dependence on vesicle size. **Journal of Chemical Physics**, v. 117, n. 16, p. 7401-7404, 2002.
181. VEATCH, S. L.; KELLER, S. L. Miscibility Phase Diagrams of Giant Vesicles Containing Sphingomyelin. **Phys. Rev. Lett.**, v. 94, n. 14, p. 148101--, 2005.
182. KELLER, C. A.; KASEMO, B. Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance. **Biophysical Journal**, v. 75, n. 3, 1998. 1397-1402.

183. RICHTER, R.; MUKHOPADHYAY, A.; BRISSON, A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 5, p. 3035-3047, 2003.
184. SCHÖNHERR, H. et al. Vesicle Adsorption and Lipid Bilayer Formation on Glass Studied by Atomic Force Microscopy. **Langmuir**, v. 20, n. 26, p. 11600-11606, 2004.
185. DIMITRIEVSKI, K. et al. Imaging and manipulation of adsorbed lipid vesicles by an AFM tip: Experiment and Monte Carlo simulations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 47, n. 2, p. 115-125, 2006.
186. EGAWA, H.; FURUSAWA, K. Liposome Adhesion on Mica Surface Studied by Atomic Force Microscopy. **Langmuir**, v. 15, n. 5, p. 1660-1666, 1999.
187. REVIKINE, I.; SIMON, A.; BRISSON, A. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the morphology of mixed DPPC-DOPS supported phospholipid bilayers. **Langmuir**, v. 16, n. 4, p. 1473-1477, 2000.
188. QUINN, P. J.; WOLF, C. Egg-Sphingomyelin and Cholesterol Form a Stoichiometric Molecular Complex in Bilayers of Egg-Phosphatidylcholine. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 47, p. 15536-15545, 2010.
189. QUINN, P. J.; WOLF, C. Hydrocarbon chains dominate coupling and phase coexistence in bilayers of natural phosphatidylcholines and sphingomyelins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 5, p. 1126-1137, 2009.
190. TOKUMASU, F.; JIN, A. J.; DVORAK, J. A. Lipid membrane phase behaviour elucidated in real time by controlled environment atomic force microscopy. **Journal of Electron Microscopy**, v. 51, n. 1, p. 1-9, 2002.
191. WOLF, C. et al. Cholesterol favors phase separation of sphingomyelin. **Biophysical Chemistry**, v. 89, n. 2-3, p. 163-172, 2001.
192. VAN DER GOOT, F. G.; HARDER, T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. **IMMUNOLOGY**, v. 113, n. 2, 2001. 89-97.
193. BERQUAND, A.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; DUFRÊNE, Y. F. Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1664, n. 2, p. 198-205, 2004.
194. BUNGE, A. et al. Characterization of the Ternary Mixture of Sphingomyelin, POPC, and Cholesterol: Support for an Inhomogeneous Lipid Distribution at High Temperatures. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 7, 2008. 2680-2690.
195. LEONENKO, Z. V.; CRAMB, D. T. Revisiting lipid  $\pi$ -general anesthetic interactions (I): Thinned domain formation in supported planar bilayers induced by halothane and ethanol. **Can. J. Chem.**, v. 82, n. 7, p. 1128-1138, 2004.

196. MEESTERS, C. **Die Verbindung von Kleinwinkelstreuung und in silico-Methodik zur Aufklärung von Konformationswechseln großer Proteinkomplexe**. Johannes Gutenberg Universität Mainz. [S.l.]. 2008.
197. RUIZ-AGUDO, E. et al. The role of background electrolytes on the kinetics and mechanism of calcite dissolution. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 74, n. 4, p. 1256-1267, 2010.
198. FUKUMA, T.; HIGGINS, M. J.; JARVIS, S. P. Direct Imaging of Lipid-Ion Network Formation under Physiological Conditions by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy. **PRL**, v. 98, n. 10, 2007. 106101 - -- 106101 - 4.
199. CHALMEAU, J. et al. alpha-Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, n. 1, 2011. 271-278.
200. BARLIC, A. et al. Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 279, n. 33, 2004. 34209-34216.
201. TERO, R. et al. Lipid membrane formation by vesicle fusion on silicon dioxide surfaces modified with alkyl self-assembled monolayer islands. **Langmuir**, v. 20, n. 18, p. 7526-7531, 2004.
202. CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, 2002.
203. ANDERSON, N. A. et al. Characterization and control of lipid layer fluidity in hybrid bilayer membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 7, p. 2094-2100, 2007.
204. BRIAND, E. et al. An OEGylated thiol monolayer for the tethering of liposomes and the study of liposome interactions. **Talanta**, v. 81, n. 4-5, p. 1153-1161, 2010.
205. KOEPER, I. et al. Membrane on a chip; Tethered bilayer membranes as a biosensor platform. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 229, p. U657--U657, 2005.
206. VOCKENROTH, I. K. et al. Incorporation of alpha-Hemolysin in Different Tethered Bilayer Lipid Membrane Architectures. **Langmuir**, v. 24, n. 2, p. 496-502, 2008.
207. JUNG, M.; VOGEL, N.; KOPER, I. Nanoscale Patterning of Solid-Supported Membranes by Integrated Diffusion Barriers. **Langmuir**, v. 27, n. 11, p. 7008-7015, 2011.
208. JUHASZ, J.; DAVIS, J. H.; SHAROM, F. J. Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of 'lipid raft' mixtures. **Biochemical Journal**, v. 430, p. 415-423, 2010.
209. MORIMOTO, K.; KEGELES, G. Subunit interactions of lobster hemocyanin : I. Ultracentrifuge studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 142, n. 1, p. 247-257, 1971.

210. PANZER, D. et al. Water Influences on the Copper Active Site in Hemocyanin. **J. Phys. Chem. Lett.**, v. 1, n. 10, 2010. 1642-1647.
211. CUFF, M. E. et al. Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. **Journal of Molecular Biology**, vol 278, Issue 4, 15 May 1998, Pages 855-870.
212. LI, Y. et al. Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 40, p. 17002-17006, 2009.
213. SENDOVSKI, M. et al. First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. **Journal of Molecular Biology**, v. 405, n. 1, p. 227-237, 2011.
214. GRIONI, M. et al. Studies of copper valence states with Cu L3 x-ray-absorption spectroscopy. **Phys. Rev. B**, v. 39, n. 3, p. 1541--, 1989.
215. GRIONI, M. et al. Unoccupied electronic structure and core-hole effects in the x-ray-absorption spectra of Cu<sub>2</sub>O. **Phys. Rev. B**, v. 45, n. 7, p. 3309--, 1992.
216. PATTRICK, D. . R. A. et al. Oxidation state and electronic configuration determination of copper in tetrahedrite group minerals by L-edge X-ray absorption spectroscopy. **Phys Chem Minerals**, vol. 20, n. 6, 1993. 395-401.
217. SOLOMON, E. I. et al. Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 2, p. 419-458, 2004.
218. YOON, J.; FUJII, S.; SOLOMON, E. I. Geometric and electronic structure differences between the type 3 copper sites of the multicopper oxidases and hemocyanin/tyrosinase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, n. 16, p. 6585-6590, 2009.
219. HATSUI, T.; KOSUGI, N. Metal-to-ligand charge transfer in polarized metal L-edge X-ray absorption of Ni and Cu complexes. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 136, n. 1-2, p. 67-75, 2004.
220. FELSENFELD, G.; PRINTZ, M. P. Specific Reactions of Hydrogen Peroxide With the Active Site of Hemocyanin - the Formation of Methemocyanin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, n. 23, p. 6259-6264, 1959.
221. SOLOMON, E. I. Binuclear Copper Active Site: Hemocyanin, Tyrosinase and Type 3 Copper, 1981. 43-108.
222. ZLATEVA, T. et al. Isolation of the met-derivative intermediate in the catalase-like activity of deoxygenated *Octopus vulgaris* hemocyanin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 72, n. 3-4, p. 211-215, 1998.

223. SULLIVAN, B. et al. Hemocyanin of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Structural differentiation of the isolated components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 23, p. 7644-7648, 1976.
224. LIJNEN, H. R.; WITTERS, R.; LONTIE, R. The regeneration of the methaemocyanin of *Limulus polyphemus* by hydrogen sulphide and hydrogen cyanide. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 35-38, 1979.
225. GHIRETTI, F. The decomposition of hydrogen peroxide by hemocyanin and by its dissociation products. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 63, n. 1, p. 165-176, 1956.
226. BELTRAMINI, M. et al. The Oxidation of Hemocyanin. **Eur. J. Biochem.**, v. 232, n. 1, p. 98-105, 1995.
227. LIJNEN, H. R.; WITTERS, R.; LONTIE, R. The reaction of azide with *Limulus polyphemus* methaemocyanin. **FEBS Letters**, v. 88, n. 2, p. 358-360, 1978.
228. BROWN, J. M. et al. Structural studies of the hemocyanin active site. 1. Extended x-ray absorption fine structure (EXAFS) analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 12, 1980. 4210-4216.
229. MATOBA, Y. et al. A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, Caddie, 2011. (**JBC Papers** in Press. Published on July 5, 2011 as Manuscript M111.256818)
230. NÄSLUND, L.-A. et al. Direct Evidence of Orbital Mixing between Water and Solvated Transition-Metal Ions: An Oxygen 1s XAS and DFT Study of Aqueous Systems. **J. Phys. Chem. A**, v. 107, n. 35, 2003. 6869-6876.
231. ZOLLA, L.; BRUNORI, M. A Spectrophotometric Method To Determine the Amount of Co Bound To Hemocyanin. **Analytical Biochemistry**, v. 133, n. 2, p. 465-469, 1983.
232. ZOLLA, L. et al. Heterogeneous Binding of Oxygen and Carbon-monoxide To Dissociated Molluscan Hemocyanin. **Biophysical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 271-280, 1985.
233. ZOLLA, L.; CALABRESE, L.; BRUNORI, M. Distribution of Copper Atoms and Binding of Carbon-monoxide In Partially Copper-depleted Hemocyanin. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 788, n. 2, p. 206-213, 1984.
234. RICHEY, B.; DECKER, H.; GILL, S. J. Binding of Oxygen and Carbon Monoxide to Arthropod Hemocyanin: An Allosteric Analysis. **Biochemistry**, v. 24, p. 109-117, 1985.
235. BRUNORI, M.; COLETTA, M.; CERA, E. D. A cooperative model for ligand binding to biological macromolecules as applied to oxygen carriers. **Biophysical Chemistry**, v. 23, n. 3-4, p. 215-222, 1986.

236. ZLATEVA, T. et al. The o-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. **FEBS Letters**, v. 384, n. 3, p. 251-254, 1996.
237. SUNDBERG, R. J.; MARTIN, R. B. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. **Chem. Rev.**, v. 74, n. 4, p. 471-517, 1974.
238. STROUMPOULIS, D.; PARRA, A.; TIRRELL, M. A kinetic study of vesicle fusion on silicon dioxide surfaces by ellipsometry. **AIChE J.**, v. 52, n. 8, p. 2931-2937, 2006.
239. REIMHULT, E. et al. Simultaneous surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring measurements of biomolecular adsorption events involving structural transformations and variations in coupled water. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 24, p. 7211-7220, 2004.
240. REIMHULT, E. et al. A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO<sub>2</sub>. **Langmuir**, v. 22, n. 7, p. 3313-3319, 2006.
241. LANGE, K. M. et al. High resolution X-ray emission spectroscopy of water and aqueous ions using the micro-jet technique. **Chemical Physics**, v. 377, n. 1-3, p. 1-5, 2010.
242. AZIZ, E. F. et al. Direct Contact versus Solvent-Shared Ion Pairs in NiCl<sub>2</sub> Electrolytes Monitored by Multiplet Effects at Ni(II) L Edge X-ray Absorption. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 17, p. 4440-4445, 2007.

## 12 Anhang

### Zusätzliche Informationen zur Beamline am Bessy II

#### **Beamline U41-PGM:**

Das namensgebende Insertion Device ist ein Undulator mit einer Periode von 41 mm (U41). Ein Toroidspiegel (M1) kollimiert das Licht in der Dispersionsebene und lenkt es auf einen planaren Gittermonochromator (PGM), gefolgt von einem planaren Spiegel (M2). Diese Kombination aus planarem Monochromator und planarem Spiegel ermöglicht die Variation des cff -Wertes<sup>1</sup> über einen weiten Bereich. Ein zylindrischer Spiegel (M3) fokussiert den nun monochromatischen Strahl auf einen Austrittsspalt, dessen Größe per Mikrometerschraube aus 7 vorgegebenen Spaltbreiten zwischen 20 und 3000 µm gewählt werden kann. Hinter dem Austrittsspalt

ermöglichen vier einzeln in den Stahl schiebbare Blenden (zwei horizontal, zwei vertikal) eine weitere Eingrenzung des am Ende belichteten Bereiches. Als letztes Element fokussiert ein Toroidspiegel (M4) den Strahl auf einen Punkt im Experimentierbereich (Panzer 2007).

***Technische Daten zur Beamline:***

Segment: 11

Lokation: 13.2

Quelle: [U41](#)

Monochromator: PGM

Energie Minimum: 170 eV

Energie Maximum: 1800 eV

Polarisation: horizontal

Flux: 1.00E+13

Energie Auflösung: 2000

Abweichung horizontal: 1.2 mrad

Abweichung vertikal: 0.5 mrad

Abstands Fokus/last valve: 510 mm

Abstands Fokus from floor level: 1376 mm

Betrieben durch HZB

Kontakt: [PhD K. Hodeck](#)

Experimentelle Stationen: [ROSA](#); [LIQUIDROME](#); [Liquid Jet](#); [XES](#); [CISSY](#); [FLUORO](#)

(Quelle: [http://www.bessy.de/bit/bit\\_show\\_object.html.php?i\\_bit\\_id\\_object=28](http://www.bessy.de/bit/bit_show_object.html.php?i_bit_id_object=28))

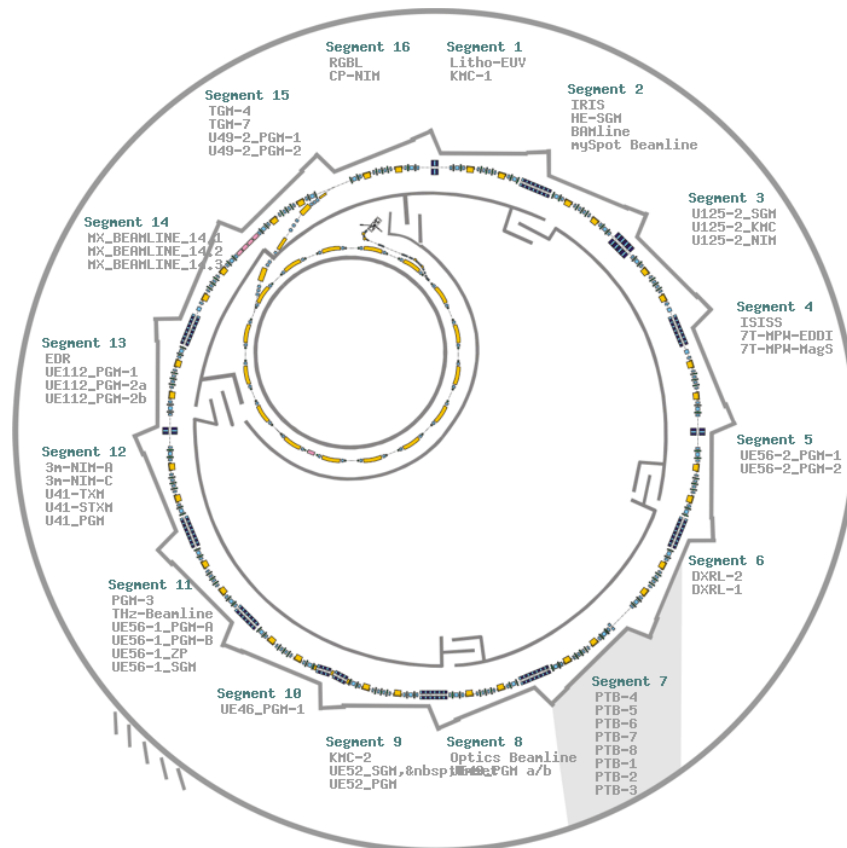


Abbildung 68: Schematische Darstellung des Elektronenspeicherrings Bessy II am Helmholtz-Zentrum Berlin Adlershof. Die Lage der Beamline U41-PGM im Segment 7 ist grau hinterlegt.

**Technische Daten des Liquidroms:**

Location variable: 13.2[U41\_PGM] 16.2[U49-2\_PGM-1] 16.2[U49-2\_PGM-2]

Beamlines: [U41-PGM](#) / [U49-2-PGM-1](#) / [U49-2-PGM-2](#)

Monochromatoren: PGM[U41\_PGM] / PGM-1[U49-2\_PGM-1] / PGM-2[U49-2\_PGM-2]

Experimente im Vakuum sind durchführbar.

Niedrigste Temperatur: 283K

Höchste Temperatur: 373 K

Methoden: XRF und NEXAFS (Operated by HZB)

(Quelle: [http://www.bessy.de/bit/bit\\_show\\_object.html.php?i\\_bit\\_id\\_object=179](http://www.bessy.de/bit/bit_show_object.html.php?i_bit_id_object=179)).

### **Berechnung der Kupferkonzentration der eingesetzten Hämocyaninlösung:**

(Hc = Hämocyanin)

M = Molmasse (g/mol) → Hc-Hexamere (6\*75kDa = 450kDa = 450000g/mol)

n = Stoffmenge (mol)

ρ = Massenkonzentration (g/l) → Hc-Hexamere 60g/l

m = Masse des Stoffes (g) → Hc-Hexamere 60g

c = Stoffmengenkonzentration (Molarität) (mol/l)

#### Molarität der Hc-Lösung:

$$c = \rho/M = \frac{60\text{g/l}}{450000\text{g/mol}} = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} = 0,00013\text{mol/l} = 0,13\text{mmol/l} = 130\mu\text{mol/l (Hc)}$$

Abkürzung:

$$c(\text{Cu}) = 12 * c(\text{Hc}) = 12 * 0,13 \text{ mmol} = 1,56 \text{ mmol}$$

#### Anzahl der Hc-Hexamere:

$$1\text{mol} = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ Teilchen}$$

$$0,00013 * (6,022 \cdot 10^{23}) = 78.286.000.000.000.000 \text{ Hc-Hexamere} = 78,3 \cdot 10^{18}$$

#### Anzahl Kupferatome:

$$78.286.000.000.000.000 \text{ Hc-Hexamere} * 12 \text{ Kupfer} =$$

$$939.432.000.000.000.000 = 939,4 \cdot 10^{18}$$

#### Molarität des Kupfers:

$$939,4 \cdot 10^{18} \text{ Kupferatome} / 6,022 \cdot 10^{23} \rightarrow \text{Anzahl Kupferatome} / \text{Anzahl der Teilchen pro Mol}$$

$$= 0,001559 \text{ mol Kupfer in der Lösung} \rightarrow 1,559 \text{ mmol}$$

### Komponenten für die Herstellung von SDS-Gelen:

Acrylamidlösung	Rotiphorese 30
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
SDS-Lösung	10 % SDS in Wasser
Temed	99 % Reinheit
APS	2 % in Wasser
Marker	Standart Precision Plus
SDS-Laufpuffer	0,1 M Tris; 0,75 M Glycin; 0,4 % SDS; (1:4 verdünnt)
Ethanol	99,9 % p.a. Qualität zum Überschichten des Trengels während der Polymerisierung

### Bandenmuster des SDS-Markers:

kDa	
200	—
150	—
100	—
75	—
50	—
37	—
25	—

**Teile dieser Arbeit wurden bereits in der Veröffentlichung von Panzer et al. 2010 publiziert:**

Water Influences on the Copper Active Site in Hemocyanin, The Journal of Physical Review Letters, 1(10), 2010. 1642-1647.

**Alle Darstellungen der Röntgenstrukturen von Proteinen und ihrer aktiven Zentren wurden mit dem Programm UCSF Chimera erstellt [35].**

## **13 Danksagung**

## 14 Lebenslauf