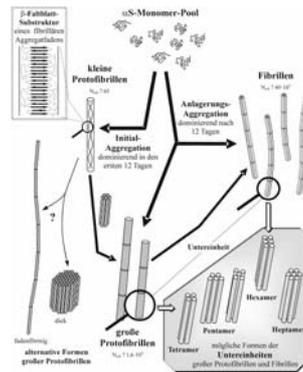


# PHYSIK-DEPARTMENT

## Untersuchungen zur Faltung und spontanen Aggregation des amyloidogenen Proteins $\alpha$ -Synuclein sowie zur Interaktion mit Sphingomyelin-Domänen



Dissertation

von

Thomas Mehnert

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



Technische Universität München  
Fakultät für Physik  
Lehrstuhl für Biophysik E22

**Untersuchungen zur Faltung und spontanen Aggregation  
des amyloidogenen Proteins  $\alpha$ -Synuclein  
sowie zur Interaktion mit Sphingomyelin-Domänen**

Thomas Mehnert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Vogl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Bausch
2. apl. Prof. Dr. K. Beyer  
Ludwig Maximilians Universität München

Die Dissertation wurde am 12.08.2004 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und am 19.08.2004 durch die Fakultät für Physik am angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	Intermolekulare Wechselwirkungen	1
1.1.1	van der Waals-Kräfte	1
1.1.2	Wasserstoffbrücken	2
1.2	Biologische Membranen	5
1.2.1	Lipidaufbau & -Verteilung	6
1.2.2	Proteine an und in Membranen	12
1.2.3	Domänenbildung	13
1.2.4	Phasenstrukturen von Lipiden in Wasser	15
1.2.5	Wechselwirkung zwischen Wasser und Lipid-Bilayern	16
1.2.6	Unterschiede zwischen H <sub>2</sub> O und D <sub>2</sub> O	19
1.2.7	Thermisches Membranverhalten	19
1.2.8	Modellmembranen	23
1.3	Zelluläre Signaltransduktion	24
1.3.1	Physiologie der präsynaptischen Endigung	24
1.3.2	Synaptischer Vesikel-Zyklus	26
1.4	Das Parkinson-relevante Protein <i>α-Synuclein</i>	28
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	33
2.1	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR)	33
2.1.1	Kernspin & Magnetisches Dipolmoment	33
2.1.2	Hamiltonian & Energieniveaus	36
2.1.3	Ordnungsparameter	40
2.1.4	Mittlere Längen, Flächen und Volumina	43
2.1.5	Spektralmomente	45
2.1.6	Bloch-Gleichungen & Relaxation	47

2.2	Spektroskopie molekularer optischer Aktivität .....	54
2.2.1	Circular Dichroismus – Optische Rotationsdispersion .....	54
2.2.2	Molekulare Ursachen des Circular Dichroismus .....	58
2.2.3	Circular Dichroismus bei Proteinen .....	63
2.2.4	Peptidspezifische CD-relevante Elektronenübergänge .....	63
2.2.5	Übergangsdipolmoment-Kopplungen von Amidchromophoren .....	64
2.2.6	Sekundärstruktur-Klassen von Proteinen .....	65
2.2.7	Berechnung der Sekundärstruktur-Anteile .....	69
2.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	77
2.3.1	Lichtstreuung durch Partikel in Lösung .....	77
2.3.2	Korrelationsfunktionen .....	80
2.3.3	Berechnung des hydrodynamischen Radius $R_H$ .....	83
2.3.4	Gewichtete / ungewichtete Partikelverteilungen .....	86
2.3.5	Vesikel-Verteilungen .....	88
2.3.6	Analyse von DLS-Korrelogrammen .....	89
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>91</b>
3.1	Materialien .....	91
3.1.1	Expression und Reinigung des Proteins $\alpha$ -Synuclein .....	91
3.1.2	Lipide und Sterole .....	92
3.2	Herstellung unilamellarer Schallvesikel .....	94
3.3	Präparation orientierter Lipid-Doppelschichten .....	95
3.4	Festkörper-NMR-Messungen .....	97
3.4.1	Das Kernspin-Spektrometer .....	97
3.4.2	Anregung & <i>On-Resonanz</i> -Pulse .....	98
3.4.3	Detektion .....	10
3.4.4	Verwendete Pulssequenzen .....	102
3.4.5	Bestimmung der Hydratation $n_w$ .....	103
3.4.6	NMR-Spektren-Präparation .....	105
3.5	Circular Dichroismus-Messungen .....	105
3.6	Das Programm <i>CD-Deconvolution</i> .....	106
3.6.1	Programmooptionen .....	106

3.6.2	Berechnung der theoretischen CD-Spektren .....	108
3.7	Experimente mittels dynamischer Lichtstreuung .....	112
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	115
4.1	Biophysikalische Eigenschaften von $\alpha$ -Synuclein .....	115
4.1.1	Wechselwirkung von $\alpha$ S mit kleinen unilamellaren Vesikeln ..	117
4.1.2	Diskussion .....	130
4.1.3	Protein-Lipid-Interdigitierung .....	136
4.1.4	Diskussion .....	144
4.1.5	Spontane Faltung .....	146
4.1.6	Diskussion .....	150
4.1.7	$\alpha$ S-Aggregation .....	151
4.1.8	Aggregations-Diskussion .....	172
4.2	Sphingomyelin – Eine NMR-Studie .....	183
4.2.1	Reines Sphingomyelin .....	184
4.2.2	Diskussion .....	189
4.2.3	SM/POPC-Membranen .....	192
4.2.4	Diskussion .....	205
4.2.5	Cholesterol-haltige binäre Systeme .....	209
4.2.6	Diskussion .....	219
<b>Anhang</b>	.....	222
Anhang I	– Formalismus der Momente & Kumulanten .....	222
Anhang II	– Auswertung von DLS-Experimenten .....	225
II.1	Prinzipien .....	226
II.2	Verschiebung des mittleren Radius bei Variation von $\Delta\tau$ .....	230
II.3	Einflussbereich eines Diffusions-Korrelationszerfalls in $g(t)$ ...	231
II.4	Rekonstruktion einer Korrelationsfunktion .....	232
II.5	Bestimmung der optimalen Fitparameterwerte .....	233
<b>Literaturverzeichnis</b>	.....	245

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Bezeichnung der an einer Wasserstoffbrücke partizipierenden Atome ....	2
1.2	Ladungsverschiebungen infolge einer Wasserstoffbrücken-Bildung .....	3
1.3	Illustrativer Aufbau einer Plasmamembran .....	6
1.4	Strukturformel von POPC und SM .....	7
1.5	Kopfgruppen von Lipiden .....	8
1.6	Struktur des Interface-Bereichs von Sphingomyelin .....	8
1.7	Struktur und Nomenklatur des Cholesterols .....	9
1.8	GPI-Ankerorientierungen des Prion Proteins PrP <sup>C</sup> .....	13
1.9	Phasenstrukturen von Lipiden in Wasser .....	16
1.10	Wasserorientierung an geladenen und neutralen glatten Oberflächen .....	18
1.11	Phasenverhalten von DMPC-Schallvesikeln .....	21
1.12	Isomorphes Phasendiagramm eines binären Lipidsystems .....	22
1.13	Schematische Strukturdarstellung der prä- & postsynaptischen Membran	25
1.14	Schritte des synaptischen Vesikel-Zyklus .....	26
1.15	Teilskizze des beim Priming entstehenden Proteinkomplexes .....	27
1.16	Coronarschnitt durch beide Großhirnhälften .....	29
1.17	Die wichtigsten anatomischen Verbindungen der Basalganglien .....	30
1.18	Wichtige Regionen des menschlichen Zentralnervensystems .....	31
2.1	Geometrische Form von Atomkernen unterschiedlichen Spins .....	37
2.2	Energieniveau-Schema eines Kern mit Spin 1 in einem externen B-Feld .	39
2.3	Illustrativer Schnitt durch einen Teil einer Lipid-Doppelschicht .....	41
2.4	Ordnungsparameterprofil von PSMd <sub>31</sub> .....	42
2.5	Austausch- bzw. Bewegungsverschmälerung als Funktion von $\tau_c$ .....	49
2.6	NMR-zugängliche Zeitbereiche von Lipidbewegungen in der L <sub><math>\alpha</math></sub> -Phase ..	50
2.7	$\tau_c$ -Abhängigkeit der Spektraldichte-Verteilung sowie von T <sub>1,z</sub> .....	52
2.8	Optische Rotation in der Nähe einer Absorptionsbande .....	55
2.9	Elektrischer Feldvektor einer elliptisch polarisierten em-Welle .....	56
2.10	Positiver Cotton-Effekt im CD- und im anomalen ORD-Spektrum .....	57
2.11	Illustration der Entstehung des Circular Dichroismus .....	59

2.12	Entstehung des Circular Dichroismus durch Chromophor-Kopplung .....	62
2.13	Davydov-Aufspaltung & Übergangsdipolmomente einer Peptidgruppe ...	65
2.14	Proteinstruktur-Klassifizierung mit den zugehörigen CD-Spektren .....	66
2.15	Theoretische CD-Spektren einer Helix- und einer $\beta$ -Faltblattstruktur .....	67
2.16	Theoretische CD-Spektren einer Turn- und einer <i>random coil</i> -Struktur ...	68
2.17	Vektormodell des Lichtstreuvektors .....	77
2.18	Temperatur-Abhängigkeit des zweiten Virialkoeffizienten $A_2$ .....	78
2.19	Radiuspektren verschieden gewichteter Partikelverteilungen .....	88
3.1	Partikelverteilung einer $\alpha$ S-Lösung vor und nach der FPLC-Reinigung ..	92
3.2	Deuterierungspositionen zweier Palmitoyl-SM-Lipide .....	93
3.3	Strukturformeln dreier Fettsäuren .....	94
3.4	Anzahl-gewichtete Radiusverteilung einer DPPC-SUV-Probe .....	95
3.5	Für die Festkörper-NMR-Messungen verwendeter Probenhalter .....	96
3.6	Links- & rechtsdrehende Komponente eines oszillierenden Magnetfelds .	99
3.7	Deklaration des Winkels zwischen der Magnetisierung und der z-Achse .	100
3.8	Lorentzkurven mit Halbwertsbreiten-Spezifizierung .....	101
3.9	Verwendete Pulssequenzen in der $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie .....	102
3.10	Hauptmenü des Programms <i>CD-Deconvolution</i> .....	107
3.11	Interface von <i>CD-Deconvolution</i> zur Spektrendarstellung .....	108
3.12	Theoretisch CD-Spektren der Helix- bzw. $\beta$ -Faltblatt-Strukturen .....	110
3.13	Typische Störbilder bei DLS-Messungen .....	114
4.1	DLS-Messung des isolierten $\alpha$ S direkt nach der FPLC-Säulenreinigung .	116
4.2	CD-Spektrum des frisch gereinigten $\alpha$ S .....	116
4.3	CD-Titrationen von POPC/POPG-Vesikeln zu einer $\alpha$ S-Lösung .....	118
4.4	CD-Titrationen von SM- bzw. PC-Vesikeln zu einer $\alpha$ S-Lösung .....	119
4.5	Temperaturabhängigkeit von $[\Theta_r]_{222}$ für $\alpha$ S mit DPPC-SUV .....	120
4.6	CD-Titrationen verschiedener SUV mit und ohne Cholesterol zu $\alpha$ S .....	123
4.7	CD-Titrationen von POPC/EYSM+Cholesterol-SUV zu $\alpha$ S .....	124
4.8	Weitere CD-Titrationen von POPC/EYSM+Cholesterol-SUV zu $\alpha$ S .....	125
4.9	Fusionskinetik von DPPC-SUV mit bzw. ohne adsorbiertem $\alpha$ S .....	126
4.10	CD-Titrationen von $\text{Ca}^{2+}$ zu BBSM-SUV mit & ohne Cholesterol & $\alpha$ S .	128
4.11	CD-Titrationen von $\text{Ca}^{2+}$ zu SM-POPS- bzw. POPC/POPS-SUV & $\alpha$ S ..	128

4.12	CD-Titrations von $\text{Ca}^{2+}$ zu verschiedenen POPC-SUV & $\alpha\text{S}$ .....	129
4.13	$[\Theta_r]_{222}$ -Werte von $\alpha\text{S}$ -Lösungen mit unterschiedlichen SUV .....	130
4.14	Modell eines SUV im $L_0$ -Zustand und der Wirkungsweise des $\alpha\text{S}$ .....	133
4.15	Aminosäurerest-Positionen des $\alpha\text{S}$ zu einer Phasenkoexistenzgrenzlinie .	134
4.16	Strukturdarstellung des $\alpha\text{S}$ bei Bindung an kleine Vesikel .....	135
4.17	T-abhängige Hysteresekurve von $[\Theta_r]_{222}$ für $\alpha\text{S}$ mit DMPC-SUV .....	136
4.18	CD-Spektren einer $\alpha\text{S}$ -Lösung mit DMPC-SUV .....	137
4.19	$[\Theta_r]_{222}$ -Hysterese von $\alpha\text{S}$ und DMPC-SUV bei verschiedenen $c_{\text{KCl}}$ .....	138
4.20	$[\Theta_r]_{222}$ der drei Temperatur-Plateaubereiche für $\alpha\text{S}$ + DMPC-SUV .....	139
4.21	$R_H$ -Verlauf von DMPC-SUV mit $\alpha\text{S}$ beim Erhitzen und Abkühlen .....	140
4.22	T-abhängige Hysteresekurve von $[\Theta_r]_{222}$ für $\alpha\text{S}$ mit DLPC-SUV .....	141
4.23	Zeitliche Entwicklung von $[\Theta_r]_{222}$ für $\alpha\text{S}$ mit DMPC-SUV .....	141
4.24	Helixanteil von $\alpha\text{S}$ mit DMPC-SUV bei verschiedenen Temperaturen ...	143
4.25	$X_{\text{hel}}$ -Werte in Abhängigkeit von $[\Theta_r]_{222}$ für $\alpha\text{S}$ mit DMPC-SUV .....	143
4.26	Repräsentative CD-Spektren reiner $\alpha\text{S}$ -Lösungen in Abhängigkeit von t .	147
4.27	Array theoretischer CD-Spektren mit wachsendem Helixanteil .....	149
4.28	Helixfaltung des reinen $\alpha\text{S}$ in Abhängigkeit von t und der Konzentration	150
4.29	Zeitliche Entwicklung der $\alpha\text{S}$ - sowie der Aggregat-Verteilungen .....	151
4.30	Zeitliche Änderungen der mittleren Radien des $\alpha\text{S}$ und der Aggregate ...	152
4.31	Zeitlicher Verlauf der Streuintensität $I(t)$ der $\alpha\text{S}$ -Lösung .....	153
4.32	Zeitliche Änderungen der vier Intensitäts-gewichteten $\alpha\text{S}$ -Verteilungen .	154
4.33	Intensitäts-gewichteten $\alpha\text{S}$ -Verteilungen innerhalb der ersten 16 Stunden	155
4.34	Elektronenmikroskopische Aufnahme der $\alpha\text{S}$ -Protofibrillen nach [347] ..	159
4.35	AFM- bzw. EM-Bild von $\alpha\text{S}$ -Maus-Fibrillen nach [348] .....	159
4.36	Gewichtete Radiusverteilungen für verschiedene Teilchengemetrien ....	161
4.37	Abhängigkeit der Länge und des Perrin Faktors einer Fibrille von $R_H$ ....	161
4.38	Berechnete Gesamtzahl $N_{\alpha\text{S}}(t)$ nach Konvergenz des SCF-Verfahrens ...	165
4.39	Zeitverlauf der molaren Konzentrationen der vier $\alpha\text{S}$ -Partikelspezies ....	167
4.40	CD-Spektrum der $\alpha\text{S}$ -Lösung direkt nach der DLS-Messserie .....	168
4.41	UV-Spektrum des FPLC-Ausflusses bei Trennung der 4 Partikelspezies .	169
4.42	CD-Spektren der 4 Partikelspezies direkt nach der FPLC-Trennung .....	170

4.43	CD-Spektren der 4 Partikelspezies 5 Tage nach der FPLC-Trennung .....	170
4.44	Schematische Darstellung der $\alpha$ -Synuclein-Aggregationskinetik .....	180
4.45	$^2\text{H}$ -NMR-Spektren-Array lamellarer $\text{PSMd}_{31}$ - & $\text{DPPCd}_{62}$ -Membranen ..	184
4.46	Spektralmomente des $\text{PSMd}_{31}$ und des $\text{DPPCd}_{62}$ .....	186
4.47	Phasendiagramm des DPPC .....	187
4.48	$^2\text{H}$ -NMR-Spektrenarray selektiv deuterierter PSM-Lipide .....	188
4.49	$^2\text{H}$ -NMR-Spektren von $\text{PSMd}_{31}$ /POPC-Membranen .....	193
4.50	Quadrupolaufspaltungen bei $\text{PSMd}_{31}$ /POPC-Mischungen .....	194
4.51	Quadrupolaufspaltungen bei PSM/POPC $_{31}$ -Mischungen .....	194
4.52	$^2\text{H}$ -NMR-Spektren von PSM/POPC $_{31}$ -Membranen .....	195
4.53	$^2\text{H}$ -NMR-Spektren von Membranen aus DPPC/POPC .....	196
4.54	Koexistenz fluider & geordneter Domänen bei $\text{PSMd}_{31}$ /POPC 2:1 .....	197
4.55	Koexistenz fluider & geordneter Domänen bei $\text{PSMd}_{31}$ /POPC 1:1 .....	198
4.56	$^2\text{H}$ -NMR-Spektrenarray lamellarer $\text{PSMd}_2(\text{C}_2)$ /POPC-1:2-Membranen ...	198
4.57	Ordnungsparameterprofile in Membranen mit $\text{PSMd}_{31}$ bzw. $\text{POPC}_{31}$ ...	200
4.58	Ordnungsparameterprofile in Membranen mit $\text{DPPCd}_{62}$ .....	201
4.59	Längen und Flächen von Acylketten in $\text{PSMd}_{31}$ /POPC-Membranen .....	202
4.60	Längen und Flächen von Acylketten in PSM/POPC $_{31}$ -Membranen .....	203
4.61	Längen und Flächen von Acylketten in DPPC/POPC-Membranen .....	204
4.62	$^2\text{H}$ -NMR-Spektrenarrays von $\text{PSMd}_{31}$ /Chol-Membranen .....	210
4.63	Methylgruppen- $^2\text{H}$ -Resonanzen der reinen PSM- & DPPC-Membranen ..	211
4.64	Spektralmomente lamellarer $\text{PSMd}_{31}$ /Chol-Membranen .....	213
4.65	Spektralmomente lamellarer $\text{DPPCd}_{62}$ /Chol-Membranen .....	214
4.66	Temperaturabhängigkeit von $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$ in PSM/Chol-Membranen .....	215
4.67	Ordnungsparameterprofile in $\text{PSMd}_{31}$ /Chol- & $\text{DPPCd}_{62}$ /Chol-Bilayern .	216
4.68	Längen und Flächen von Acylketten in $\text{PSMd}_{31}$ /Chol-Membranen .....	217
4.69	Längen und Flächen von Acylketten in $\text{DPPCd}_{62}$ /Chol-Membranen .....	218
II.1	Fiktive Korrelationsfunktion mit der dazugehörigen Radiusverteilung ...	226
II.2	Korrelationsfunktion einer stark verunreinigten Partikellösung .....	229
II.3	Anzahl- & ungewichtete $R_H$ -Spektren bei verschiedenen Auflösungen ...	231
II.4	Rekonstruierte Amplituden-Korrelationsfunktion .....	234
II.5	Ungewichtetes und Anzahl-gewichtetes Radiusspektrum .....	235
II.6	Illustration eines Problems beim Fitten einer Korrelationsfunktion .....	237

II.7	Radiusverteilungen bei Anwendung verschiedener Parameterwerte .....	238
II.8	Darstellung eines Zerfallszeitspektrums mit Verunreinigungsanteilen ....	239
II.9	Zerfallszeit-Spektrum einer Probe mit hohem Verunreinigungsgrad .....	240
II.10	Einfluss des Parameters LP auf die Anzahl-gewichtete $R_H$ -Verteilung ....	241

# Tabellenverzeichnis

1.1	Lipidzusammensetzung synaptosomaler Membranen .....	10
1.2	Acylketten-Verteilung der Phospholipide synaptosomaler Membranen ...	11
1.3	Lipidzusammensetzung der synaptischen Vesikel .....	11
1.4	Acylketten-Verteilung der Phospholipide synaptischer Vesikel .....	12
1.5	Korrelationszeiten verschiedener Bewegungsmoden von DPPC-Lipiden .	20
2.1	Übersicht über NMR-technisch wichtiger Isotope .....	34
2.2	Größenordnungen der Erwartungswerte eines Kern-Hamiltonian .....	36
2.3	Referenzproteine deren CD-Spektren die Basissätze von CDPro bilden ...	71
2.4	Zusammensetzung von 5 CDPro-Basissätzen .....	72
3.1	Fettsäureverteilung und Molmassenangabe von BBSM und EYSM .....	93
3.2	Amplitudenspezifikationen eines korrekt normierten CD-Spektrums .....	108
3.3	Verwendete Proteine zur Berechnung reiner Helix- & Faltblatt-Spektren	110
3.4	Verwendete Proteine zur Berechnung der Turn- & <i>random coil</i> -Spektren	111
4.1	Anzahl-gewichteter Radius verschiedener SUV mit und ohne $\alpha$ S .....	121
4.2	Anzahl-gewichteter Radius verschiedener SUV in Abhängigkeit von T ...	122
4.3	$R_H$ kleiner Vesikel in Lösung mit bzw. ohne $\alpha$ S in Gegenwart von $Ca^{2+}$ .	129
4.4	Verschiedene Verhältnisse der $[\Theta_r]_{222}$ -Werte für $\alpha$ S mit DMPC-SUV ....	139
4.5	Parameterwerte des linearen und des Polynomialfits von $X_{hel}([\Theta_r]_{222})$ ....	144
4.6	Berechnete Radien des $\alpha$ S-Monomers sowie der ersten neun Oligomere .	157
4.7	Mittlere Verteilungsbreiten für das $\alpha$ S-Monomer und die drei Aggregate	157
4.8	Größenspezifikation des $\alpha$ S-Monomers sowie der Aggregate .....	160
4.9	Mittlere $\alpha$ S-Monomerzahl pro Aggregat .....	162
4.10	Sekundärstruktur-Anteile der gesamten aggregierten $\alpha$ S-Lösung .....	168
4.11	Strukturanteile der 4 Partikelspezies direkt nach der FPLC-Trennung ....	171
4.12	Strukturanteile der 4 Partikelspezies 5 Tage nach der FPLC-Trennung ...	171
4.13	Ausdehnungskoeffizienten von PSM/POPC- & DPPC/POPC-Bilayern ...	204
4.14	Ausdehnungskoeffizienten von PSM/Chol- & DPPC/Chol-Membranen ..	219
II.1	Mittlere hydrodynamische Radien in Abhängigkeit von der Streuung $\sigma$ ..	230
II.2	Parametereinstellungen eines Rawfits .....	236

# Verwendete Abkürzungen

$\alpha$	isobarer thermischer Ausdehnungskoeffizient von Lipidmembranen
$\alpha_{\parallel}$	Ausdehnungskoeffizient parallel zur Membrannormalen $\vec{n}$
$\alpha_{\perp}$	lateraler Ausdehnungskoeffizient
$\alpha(\lambda)$	optische Rotationsdispersion bei der Wellenlänge $\lambda$
$A_C$	mittlere Querschnittsfläche einer Phospholipid-Acyllkette
AFM	<i>atomic force microscopy</i> (Kraftmikroskopie)
$\alpha S$	$\alpha$ -Synuclein
BBSM	<i>bovine brain</i> (Rinderhirn) Sphingomyelin
CD	Circular Dichroismus
Chol	Cholesterol
$c_I$	Intensitäts-gewichtete Radiusverteilung (s. Kap. 2.3.4)
$c_m$	Massen-gewichtete Radiusverteilung (s. Kap. 2.3.4)
$c_N$	Anzahl-gewichtete Radiusverteilung (s. Kap. 2.3.4)
$\Delta\epsilon_{\lambda}$	Differenz des Extinktionskoeffizienten zwischen links- & rechts-polarisiertem Licht
$\Delta\nu$	Frequenzaufspaltung von NMR-Signalen
D <sub>2</sub> O	deutertes (schweres) Wasser
DGL	Differentialgleichung
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
DLS	<i>dynamic light scattering</i> (dynamische Lichtstreuung)
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
DPPCd <sub>62</sub>	1,2-Dipalmitoyl-(d <sub>62</sub> )- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> (Differenzielle Rasterkalorimetrie)
EFG	<i>electric field gradient</i> (elektrischer Feldgradient)
em	elektromagnetisch
EM	<i>electron microscopy</i>
EYSM	<i>egg yolk</i> (Eigelb) Sphingomyelin
FID	<i>free induction decay</i> (freier Induktionszerfall)

FTIR	Fourier-transform Infrarot-Spektroskopie
GPI-Anker	Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker
HPPS	High Performance Particle Sizer
ITC	<i>isothermic titration calorimetry</i> (Isotherme Titrationskalorimetrie)
L <sub>α</sub> -Phase	flüssig-kristalline Lipidphase
L <sub>β</sub> -Phase	Gelphase
L <sub>c</sub> -Phase	lamellar-kristalline Lipidphase
L <sub>C</sub>	Länge einer Phospholipid-Acyllkette
L <sub>d</sub> -Phase	<i>liquid disordered phase</i> (ungeordnete Lipidphase)
L <sub>O</sub> -Phase	<i>liquid ordered phase</i> (geordnete Lipidphase)
MO	Molekülorbital
M <sub>n</sub>	n-tes Spektralmoment
$\bar{n}$	Direktorachse, d.h. die Flächennormale von Membranbilayern
n <sub>Ch-a</sub> /n <sub>Ch-r</sub>	molares Lipidverhältnis Chol-armer zu Chol-reichen Membrandomänen
n <sub>Lip/αS</sub>	molares Lipid/α-Synuclein-Verhältnis
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
o.B.d.A.	ohne Beschränkung der Allgemeinheit
ORD	optische Rotationsdispersion
P <sub>β</sub> -Phase	Ripple-Phase von Lipiden mit verkippter Lipidlängsachse bzgl. $\bar{n}$
PC	Phosphatidylcholin
PCS	<i>photon correlation spectroscopy</i> (Photonenkorrelations-Spektroskopie)
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
POPE	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidyl-Glycerol
POPS	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylserin
PSM	N-Palmitoyl-Sphingomyelin
PSMd <sub>31</sub>	N-Perdeutero-Palmitoyl-(d <sub>31</sub> )-Sphingomyelin
P(q, R <sub>H</sub> )	geometrischer Strukturfaktor
Ψ <sub>λ</sub>	Elliptizität einer Lösung bei der Wellenlänge λ
[Ψ] <sub>λ</sub>	spezifische Elliptizität einer Lösung bei der Wellenlänge λ
R <sub>G</sub>	Gyrationsradius
R <sub>H</sub>	hydrodynamischer Radius

$S_{CD}$	Deuterium-Ordnungsparameter einer C- <sup>2</sup> H-Bindung
$\sigma$	<i>self consistent field</i> (Selbstkonsistenz-Verfahren)
SM	Natriumdodecylsulfat (anionisches Detergenz)
SRCD	Standardabweichung
SUV	Sphingomyelin
SV	<i>synchrotron radiation circular dichroism</i>
$[\Theta_r]_\lambda$	<i>sonicated unilamellar vesicle</i> (durch Beschallung hergestelltes Vesikel)
sn-1, sn-2	<i>synaptic vesicle</i> (synaptisches Vesikel)
$T_m$	molare Elliptizität pro Aminosäurerest bei der Wellenlänge $\lambda$
$T_{pre}$	Bindungsplätze der Acylketten am Glycerol-Rückgrat von Phospholipiden
VBA	Phasenübergangstemperatur zur $L_\alpha$ -Phase
$X_{hel}$	Temperatur des Vorübergangs in Lipid-Bilayern
$\xi_{hel}$	Visual Basic for Applications
$\zeta_{hel}$	für eine Proteinlösung berechneter Helixanteil
$\zeta_{rc}$	helikaler Faltungsgrad eines an Vesikel gebundenen Proteins

# Zusammenfassung

Die laterale Organisation biologischer Membranen, die Ausbildung spezifisch zusammengesetzter Domänen sowie deren Interaktion mit Proteinen stehen gegenwärtig im Vordergrund des biophysikalischen Interesses. Grundlegende, in verschiedenen Bereichen sich wiederfindende Prinzipien, nach denen unterschiedlichste Lebensprozesse ablaufen, sind dabei ebenso Gegenstand der aktuellen Forschung wie die Aufklärung selektiver Funktionsmechanismen, etwa der Signaltransduktion.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage nach der Funktion des in den synaptosomalen Endigungen humaner Neuronen vorkommenden Proteins,  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ S). In Erfüllung seiner natürlichen Funktion liegt das  $\alpha$ S in den Synapsen als ungefaltetes Protein vor und bildet eine partiell helikale Struktur aus bei Bindung an synaptische Vesikel. Bei Parkinson-Patienten hingegen finden sich in der Substantia nigra, die den Basalganglien angehört, große Plaques, bestehend aus aggregierten  $\alpha$ S-Molekülen mit einer ausgeprägten  $\beta$ -Faltblattstruktur.

Die Wechselwirkung dieses Proteins mit kleinen unilamellaren Vesikeln, die vielfach als Modellsysteme für die synaptischen Vesikel dienen, wurde in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Liposomen, sowie von Temperatur und Ionenstärke des umgebenden Mediums untersucht. Es wurden Messungen des Circular Dichroismus von Proteinlösungen und Lichtstreu-Experimente (*dynamic light scattering* – DLS) zur Partikelgrößenbestimmung durchgeführt.

Entgegen der bisher beschriebenen ausschließlichen Bindung von  $\alpha$ S an negativ geladene Vesikel konnte auch eine starke Wechselwirkung des Proteins mit ungeladenen kleinen Liposomen gefunden werden. Voraussetzung hierfür ist, dass sich die Membranen in einem hoch geordneten Phasenzustand befinden. Die Anlagerung des  $\alpha$ S an die Vesikeloberfläche führt zu einer Ausheilung bzw. Stabilisierung von Defektlinien, die in den stark gekrümmten Flächen zwischen verschiedenen schollenartigen, vergleichsweise starren Membranregionen auftreten.

Die pathologisch interessante Aggregationskinetik des  $\alpha$ S wurde in einer einmonatigen Studie mittels DLS untersucht. Diese Methode ermöglicht die simultane Bestimmung der mittleren Partikelgrößen und relativen Streuintensitäten von in der Lösung befindlichen Teilchenspezies. Zunächst zeigte sich, dass im Lauf der über zwei distinkte Intermediärzustände erfolgenden Aggregation Fibrillen gebildet werden, die aus mehreren zehntausend  $\alpha$ S-Molekülen bestehen. Auf der Grundlage der bekannten Strukturcharakterisierung der fibrillären Aggregate konnte die während der Beobachtungsdauer stattfindende Entleerung des  $\alpha$ S-Monomerpools nebst der simul-

tan ansteigenden Zahl der Aggregate quantifiziert werden. Wie aus der Datenanalyse hervorgeht, dominiert innerhalb der ersten Tage die Bildung kleiner Intermediate, sog. Protofibrillen. In der Folgezeit lagern sich dagegen die  $\alpha$ S-Monomere überwiegend an bestehende Intermediäraggregate an und komplettieren diese zu Fibrillen.

Wie sich herausstellte, existiert ein Gleichgewicht zwischen Anlagerung und Ablösung einzelner Monomere von den fibrillären Aggregaten, so dass es in stark verdünnten Lösungen auch zu einem Zerfall der Aggregate kommt. Dieser Befund ist besonders vor dem Hintergrund einer möglichen Liquidierung der bei Parkinson Kranken auftretenden Plaques von Interesse.

Schließlich wurde ein Modell für die Aggregationskinetik des  $\alpha$ S aufgestellt, das die zeitliche Entwicklung der Monomer-Population, ebenso wie die der drei Aggregat-spezies erfasst, und mit dessen Hilfe eine Aggregations-Grenzkonzentration für das  $\alpha$ S berechnet werden konnte.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Untersuchung von Sphingomyelin (SM)-haltigen Modellmembranen. SM ist ein konstitutiver Bestandteil synaptischer Membranen. Bei physiologischen Temperaturen befinden sich diese Lipide nahe des Phasenübergangs und sind deshalb hinsichtlich der Bindung von  $\alpha$ S an Vesikel geordneter Phasenstruktur von besonderem Interesse. Erstmals konnten die Änderungen der Eigenschaften SM-haltiger lamellarer Bilayer bei Variation der Lipidzusammensetzung und der Temperatur unter Verwendung der  $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie unter Einsatz von Acylketten-deutertem SM behandelt werden.

An den reinen SM-Membranen, bei denen die Lipide selektiv an einzelnen Ketten-segmenten ihrer N-Acyllkette deutert waren, gelang folgende Beobachtung: bereits bei Temperaturen oberhalb des eigentlichen Phasenübergangs zur flüssig-kristallinen  $L_\alpha$ -Phase findet eine vorzeitig Verfestigung des Interface-Bereichs von SM statt. Die aus den  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren des Ketten-perdeutert SM erhaltenen Spektral-momente bestätigen mit ihrem temperaturabhängigen Verlauf diese Entdeckung.

Für binäre Mischungen aus SM und Cholesterol ließ sich aus den  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren eine Phasenkoexistenz Cholesterol-reicher und SM-reicher Domänen über einen weiten Temperaturbereich ableiten. Obwohl dieses Sterol den thermotropen Phasen-übergang stark verbreitert, konnte bei Variation der Temperatur exakt am Phasen-übergang eine Amplifizierung der lateralen Lipidentmischung mit einer signifikanten Zunahme der SM-reichen Membranregionen nachgewiesen werden. Die Stärke dieses lediglich innerhalb eines schmalen Temperaturbereichs auftretenden Effekts hängt stark vom Anteil an Cholesterol in den SM-Membranen ab.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass  $\alpha$ -Synuclein an stark gekrümmte Membranregionen bindet, die sich in einem hoch geordneten Zustand befinden und dadurch Defektzonen in den Bilayern ausheilt. Geordnete Membranregionen entstehen im physiologischen Temperaturbereich vorzugsweise bei einer lokalen Anreicherung von SM. Der Grad der für diese Phasenseparation notwendigen Lipidentmischung kann durch den Cholesterol-Gehalt in den Membranen reguliert werden.

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Intermolekulare Wechselwirkungen

Mitbestimmend für die Ausbildung und Organisation von Clustern, bestehend aus mehreren Molekülen, bis hin zu ganzen Membranen, sind verschiedene intermolekulare Kräfte, von denen zwei wesentliche im folgenden kurz dargestellt werden sollen.

#### 1.1.1 van der Waals-Kräfte

Da im Innern von Membranen hydrophobe Wechselwirkungen dominieren, werden Proteine in Lipidbilayern u.a. durch van der Waals-Kräfte verankert.<sup>[1,2]</sup> Diese lassen sich in drei Kräfte unterteilen:

1. **Orientierungskräfte**  
Darunter fallen alle Wechselwirkungen elektrostatischer Multipole (Monopole, Dipole, Quadrupole, ...), die sowohl attraktiv als auch repulsiv sein können.
2. **Polarisationskräfte**  
Diese entstehen dadurch, dass permanente Multipolmomente in der sie umgebenden Ladungswolke temporäre Multipole induzieren, die mit den permanenten stets attraktiv wechselwirken.
3. **London-Kräfte**  
Aufgrund der temporären Ladungsfluktuationen treten kurzzeitige Multipolmomente in sonst apolaren Molekülen auf, die, ebenso wie permanente Multipole, in ihrer Umgebung elektrische Multipolmomente induzieren. Ebenso wie die Polarisationskräfte, sind auch die London-Kräfte stets attraktiver Natur. Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Kräften lassen sie sich jedoch nur quantenmechanisch herleiten, was London 1930 gelang.<sup>[3,4]</sup> Da sie denselben Ausdruck für die Oszillatorstärke enthalten, wie er bei der Beschreibung der Dispersion des Lichts auftritt, spricht man auch von Dispersions-

Wechselwirkung. Das Potential  $V_{\text{disp}}$  zweier Ladungsdichten mit dem mittleren Abstand  $r$  kann durch eine Multipolentwicklung dargestellt werden

$$V_{\text{disp}} = -\frac{c_6}{r^6} - \frac{c_8}{r^8} - \frac{c_{10}}{r^{10}} - \dots, \quad \text{mit } c_i = \text{konst.}$$

### 1.1.2 Wasserstoffbrücken

#### Merkmale einer Wasserstoffbrücken-Bindung

- Das Grundgerüst einer Wasserstoffbrücke (H-Brücke) zeigt Abb. 1.1. An einem elektronegativen Atom D ( $D = \text{N, O, F, Cl, } \dots$ ) ist ein H-Atom kovalent gebunden. Das Atom A des Protonenakzeptor-Moleküls ist im Besitz eines nicht-bindenden, freien Elektronenpaares oder eines besetzten  $\pi$ -Orbitals einer ungesättigten Mehrfachbindung. Infolge der positiven Partialladung des Wasserstoffbrücken-Protons findet ein elektronischer Ladungsfluss  $\vec{j}_3$  vom Akzeptor-Rest Y hin zu A statt. Die verstärkte negative Partialladung von A nebst der Dehnung der D–H-Bindung sind mit verantwortlich für eine weitere Elektronenverarmung des H-Atoms – dargestellt in Abb. 1.1 durch  $\vec{j}_1$ . Neben den intramolekularen Elektronenflüssen tritt noch ein intermolekularer Ladungstransfer (*charge transfer*)  $\vec{j}_2$  auf. Sämtliche Flüsse bewegen sich in der Größenordnung einiger Hundertstel der Elementarladung  $e$ . Abb. 1.2 enthält beispielhaft die Ladungsänderungen bei Ausbildung eines Wasser-Dimers.
- Da ein Proton nur eine sehr geringe Ausdehnung hat, kann eine H-Brücken-Bindung jeweils nur zwischen zwei Atomen hergestellt werden. Dabei bilden sich delokalisierte Zustände aus,<sup>[5]</sup> deren mittlere Lebensdauer bei reinem Wasser einige ps beträgt.<sup>[6]</sup> Der Bindungswinkel  $\vartheta$  liegt normalerweise nahe  $180^\circ$ .

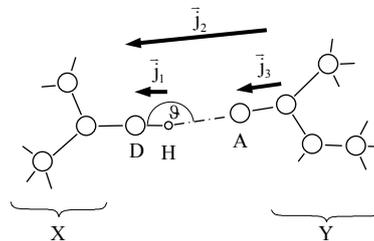


Abbildung 1.1: Bezeichnung der Atome bzw. Molekülbereiche eines H-Brücken-Clusters mit Angabe der intra- & intermolekularen Ladungsflüsse.

- Das Potential des H-Brücken-Prottons kann entweder durch ein breites Minimum etwa in der Mitte zwischen D und A gehen, oder es existieren zwei getrennte Minima. In Einzelfällen ist daher auch ein Protonentransfer vom Donor- zum Akzeptor-Molekül zu beobachten. Beispiele hierfür sind der Phenol-Ammoniak-Cluster,<sup>[7,8]</sup> oder der Trimethylamin–HI-Komplex<sup>[9]</sup>



Die Existenz zweier Minima spiegelt sich in der Tunnelaufspaltung von Schwingungsniveaus des H-Brücken-Prottons wider, wie dies beim Indol-Wasser-Cluster nachgewiesen wurde.<sup>[10]</sup>

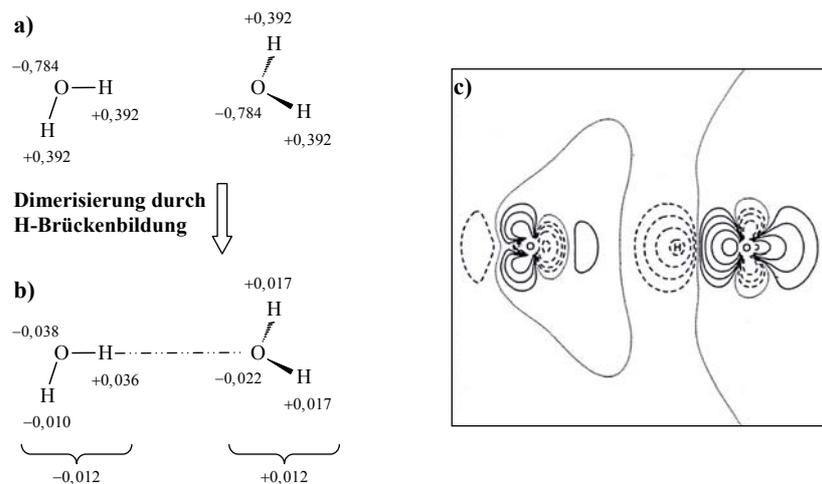


Abbildung 1.2: Ergebnisse einer Elektronendichte-Berechnung mittels einer Multiplen Populations-Analyse<sup>[11]</sup> unter Vernachlässigung der Reorganisation der Nuklidgerüste bei der Clusterbildung; nach [9].

- Partialladungen zweier isolierter H<sub>2</sub>O-Moleküle.
- Partialladungsänderungen bei Ausbildung einer H-Brücke mit Angabe des intermolekularen Ladungstransfers.
- Konturplot der Dichtedifferenz zwischen dem Wasser-Dimer und den isolierten H<sub>2</sub>O-Molekülen. Durchgezogene Linien markieren Gebiete der Ladungsanreicherung Als Folge der Clusterung, gestrichelte Linien kennzeichnen eine Elektronenverarmung, gepunktete Linien sind bei der Dimerisierung invariante Potentialkurven.

### Bindungsenergie einer Wasserstoffbrücke

H-Brücken besitzen bei neutralen Molekülen Bindungsenergien, die typischerweise im Bereich von 0,1–0,8eV ( $\approx 10\text{--}80\text{kJ/Mol}$ ) liegen.<sup>[12]</sup> Sie zählen somit zu den stärksten intermolekularen Wechselwirkungen und werden auch als Bindeglied zwischen van der Waals- und chemischen Bindungen angesehen. Die Bindungsstärke nimmt mit der Elektronegativität des Donoratoms D zu, das heißt in der Reihenfolge: P < S < N, Cl < O < F.

Das Potential  $V_H$  kann als Summe von insgesamt fünf Beiträgen geschrieben werden

$$V_H = V_{\text{stat}} + V_{\text{pol}} + V_{\text{CT}} + V_{\text{rep}} + V_{\text{mix}} \quad (1.1)$$

1. Den dominierenden Anteil an  $V_H$  bildet die elektrostatische Coulomb-Wechselwirkung  $V_{\text{stat}}$  der „eingefrorenen“ Ladungsdichten beider Moleküle, mit  $V_{\text{stat}} \approx 0,1\text{--}1,1\text{eV}$ . Hauptsächlich trägt die Anziehung der negativen Akzeptorladungsdichte und der positiven Partialladung des Protons zu  $V_{\text{stat}}$  bei.
2. Veränderungen der Elektronendichten durch Polarisierungseffekte, werden in  $V_{\text{pol}}$  berücksichtigt.  $V_{\text{pol}}$  ist ebenfalls attraktiv, bewegt sich jedoch im Bereich von 0,004–0,15eV. Im Orbitalbild entspricht eine Polarisierung der Mischung besetzter und unbesetzter Molekülorbitale (MOs) eines Moleküls im elektrischen Feld eines anderen.<sup>1)</sup>
3.  $V_{\text{CT}}$  in Gl. (1.1) ist der Ladungstransfer-Term, mit  $V_{\text{CT}} \approx 0,04\text{--}0,2\text{eV}$ . Quantenmechanisch besitzt  $V_{\text{CT}}$  seinen Ursprung in einer Linearkombination besetzter und unbesetzter MOs verschiedener Moleküle. Der bei einer intermolekularen Orbitalmischung höhere Raumgewinn für ein Elektron führt nach Darstellung von London<sup>1)</sup> zu einer stärkeren Energieabsenkung der elektronischen kinetischen Energie, weshalb gilt:  $|V_{\text{CT}}| \geq |V_{\text{pol}}|$ .
4. Bei stetiger Annäherung des H-Brücken-Donors und -Akzeptors beginnen die Ladungsdichten beider Moleküle unterhalb einer gewissen Distanz zu überlappen. Die Forderungen des Pauli-Prinzips bzw. die abstoßende Coulomb-Kraft zwischen den Elektronen beider Moleküle führen zu einem repulsiven Potentialterm  $V_{\text{rep}}$ , dessen Beitrag zu  $V_H$  sich zwischen 0,05eV und 0,8eV bewegt.

---

<sup>1)</sup> London stellte 1937 eine semiklassische Erklärung für die Energieerniedrigung eines quantenmechanischen Zustands bei Linearkombination zweier oder mehrerer Orbitale vor.<sup>[14]</sup>

Infolge der Orbitalmischung vergrößert sich der räumliche Bereich, in welchem sich die Besetzungselektronen aufhalten können – ihre Ortsunschärfe nimmt zu. Nach der Heisenbergschen Unschärferelation  $\Delta p_x \Delta x \geq \hbar$  ist damit eine Erhöhung der Impulsschärfe verbunden. Da innerhalb abgeschlossener Systeme der mittlere Impuls eines Teilchens gleich Null ist, werden somit kleinere Impulse wahrscheinlicher, was zu einer Senkung der elektronischen kinetischen Energie führt.

5. Das fünfte Glied,  $V_{\text{mix}}$ , in der Gesamtsumme von  $V_{\text{H}}$  enthält sowohl die Abhängigkeit des Gesamtpotentials  $V_{\text{H}}$  von den Änderungen der Kernkoordinaten der an der Bindung beteiligten Moleküle als auch Korrelationen zwischen den ersten vier Potentialtermen.<sup>[13]</sup>  $V_{\text{mix}}$  stellt den kleinsten Anteil an  $V_{\text{H}}$  mit 4,0–65meV dar.

#### *Ionische Wasserstoffbrücken*

Ionische – positive wie negative – Wasserstoffbrücken besitzen üblicherweise deutlich höhere Bindungsenergien als neutrale durch die stärkere Ausbildung der intramolekularen Partiaalladungen. In negativ geladenen H-Brücken-Donoren verteilt sich der zusätzliche Ladungsanteil hauptsächlich im Donorrest X, während die positive Partiaalladung des Cluster-bildenden H-Atoms weiter bestehen bleibt. Als Folge davon können die molekularen Dipolmomente bis auf das Zehnfache eines vergleichbaren neutralen Clusters ansteigen,<sup>[14 S.21]</sup> weshalb H-Brücken negativ geladener Cluster oft sogar noch stärker sind als diejenigen mit einer positiven Gesamtladung.

## 1.2 Biologische Membranen

Die Ausbildung von Lipid-Membranen war ein essentieller Schritt bei der Entstehung des Lebens. Membranen bestehen aus Lipid-Doppelschichten, in die vielfach Proteine eingelagert sind (Abb. 1.3). Sie erfüllen damit nicht nur die Funktion selektiver Barrieren sondern dienen auch der hormonellen Signaltransduktion und erlauben eine Regulierung der molekularen sowie ionischen Zusammensetzung des intrazellulären Mediums. Darüber hinaus stellen Membranstrukturen zweidimensionale Matrizen dar, an denen chemische Reaktionen wesentlich effizienter ablaufen können, als wenn sich die Reaktionspartner frei im dreidimensionalen Raum bewegen würden.<sup>[15,16]</sup> Das wird besonders deutlich an den ausgedehnten und vielfach verzweigten Membransystemen des Endoplasmatischen Reticulums und der Mitochondrien. Außerdem existiert in Zellen eine Vielzahl Membran-umhüllter Vesikel, die einen gerichteten Austausch verschiedenster Materialien zwischen den einzelnen Kompartimenten der Zelle gewährleisten.

Durch die Variationsbreite der chemischen Zusammensetzung von Membranen gelingt deren Anpassung und die Erhaltung ihrer Funktionsfähigkeit über einen weiten Bereich unterschiedlichster Umweltbedingungen (Temperatur, Wasseranteil, Ionenkonzentration, pH-Wert).

Die beiden Lipidschichten biologischer Membranen sind in ihrer Lipidkomposition stets asymmetrisch. Dieser Nicht-Gleichgewichtszustand muss aktiv aufrechterhalten werden. Beispielsweise kommen Glycolipide bzw. Glycoproteine, die kovalent verknüpfte Kohlenhydratseitenketten tragen, ausschließlich auf der extrazellulären

Membranseite vor, wie auf der in Abbildung 1.3 dargestellten oberen Seite der Plasmamembran. Möglicherweise dient dieses Netz der Zell-Zell-Adhäsion, sowie als Erkennungsanker für Signalmoleküle.

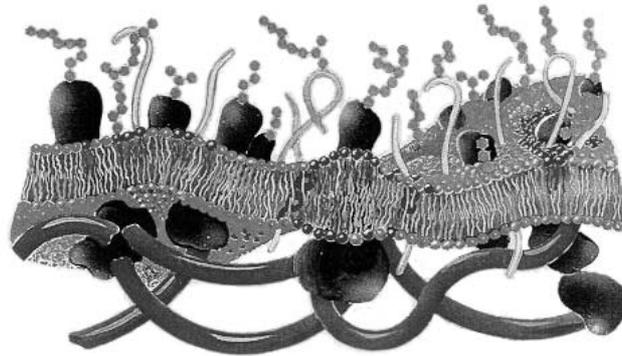


Abbildung 1.3: Ausschnitt aus einer realen Plasmamembran einer eukaryontischen Zelle nach [17]. Die obere, extrazelluläre Seite enthält eine Vielzahl von Glycolipiden und -Proteinen. Auf der unteren, der protoplasmatischen Seite ist das die Membran stabilisierende Cytoskelett erkennbar.

### 1.2.1 Lipidaufbau & -Verteilung

Das prinzipielle Konstrukt eines Lipidmoleküls besteht aus einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe und einem angrenzenden hydrophoben Fettsäurekettenbereich. Abbildung 1.4 enthält zwei Vertreter der über 100 bekannten, in natürlichen Membranen vorkommenden Lipide.

Die Acylketten in Phospho- und Glycolipiden enthalten zumeist eine gerade Anzahl an C-Atomen, die in der Regel zwischen 14 und 24 liegt. Ungesättigte Alkylketten liegen beinahe immer in der *cis*-Form vor. Die Anzahl der Doppelbindungen und die Länge der Fettsäureketten beeinflussen in entscheidender Weise die Fluidität von Membranen.

Im Gegensatz zu dem Fettsäurekettenabschnitt zeichnet sich der in Abb. 1.4 deklarierte Übergangsbereich (*Interface*) zwischen der Kopfgruppe und den Alkylketten durch stärkere intermolekulare Wechselwirkungen aus, die über Wasserstoffbrücken-Bindungen hergestellt werden. Besitzen die Lipide einer Membran im Interface selbst keine H-Brücken-Donoren, wie etwa das POPC (Abb. 1.4a)), dienen Wassermoleküle als vernetzende Mediate.

*Glycero-Phospholipide*

Den Kernbauteil der Glycero-Phospholipide (Abb. 1.4a)) bildet der dreiwertige Alkohol Glycerol, an welchem über Esterbindungen zwei Fettsäureketten und, mittels eines Phosphats, eine Kopfgruppe angehängt sind. Die wichtigsten am Aufbau von biologischen Membranen beteiligten Kopfgruppen zeigt Abb. 1.5.

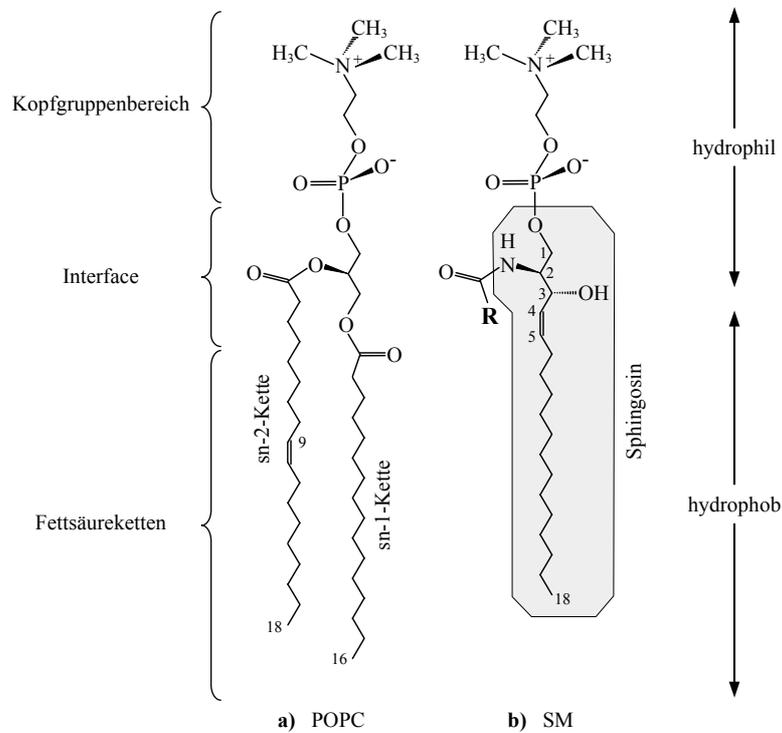


Abbildung 1.4: Zwei häufig in Membranen vorkommende Phospholipide:  
 a) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin,  
 b) Sphingomyelin mit variablem Fettsäurekettenrest **R**; die grau unterlegte Molekülstruktur wird als Sphingosin bezeichnet.

Die sn-1-Kette von Glycero-Phospholipiden ist zu 90-95% gesättigt, während die sn-2-Kette meist ungesättigt vorliegt.<sup>[18,19]</sup> Da das Glycerol-Gerüst nahezu senkrecht zur Membranoberfläche steht, weist die sn-2-Kette im Bereich der Esterbindung eine Biegung auf.

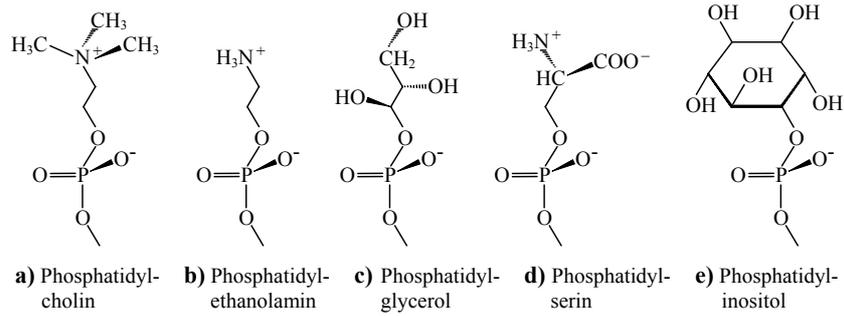


Abbildung 1.5: Kopfgruppen von Lipiden, die am Aufbau von Membranen beteiligt sind.

### Sphingolipide

Bei dieser Lipidklasse übernimmt der Aminodialkohol Sphingosin (Abb. 1.4b)) die Rolle des Bindeglieds zwischen Fettsäurerest und Kopfgruppe. Das in Membranen vielfach vorkommende Sphingomyelin (N-Acylsphingosin-1-Phosphatidylcholin, kurz: SM) besitzt die gleiche zwitterionische Kopfgruppe wie das Glycerophosphatidylcholin (PC) und ebenso einen ausgeprägten Interface-Bereich. Der entscheidende Unterschied besteht in der freien Hydroxylgruppe am C<sub>3</sub> des Sphingosins und in der Aminogruppe, an welche über eine Amidbindung eine Acylkette angehängt ist. Beide chemische Gruppen ermöglichen den Sphingolipiden, im Gegensatz zum PC, auch ohne die Gegenwart intermediären Wassers die Ausbildung von H-Brücken

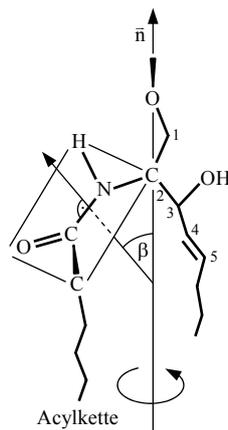


Abbildung 1.6: Struktur des Interface-Bereichs von Sphingomyelin nach [20].

zwischen benachbarten Lipidmolekülen im Interface, da sie sowohl als H-Brücken-Akzeptor als auch als Donor fungieren können. Aus diesem Grund und aus der höheren Fettsäureketten-Sättigung – verglichen mit PC – resultieren hohen Phasenübergangstemperaturen  $T_m$  (s. Kap. 1.2.7) im physiologisch relevanten Bereich zwischen 30°C und 45°C. Aus sterischen Gründen liegt die Atomgruppe  $C_2-N-C_{1'}-C_{2'}$  (Abb. 1.6) in einer *trans*-Konformation vor,<sup>[20]</sup> was in der projektiven Darstellung in Abbildung 1.6 allerdings nicht erkennbar ist.

### Cholesterol

Das ungeladene Cholesterol (Abb. 1.7) ist nach Molanteilen in eukaryontischen Membranen der am meisten vorkommende Membranbaustein, während es in Prokaryonten kaum zu finden ist. Dieses Sterol tritt in Plasmamembranen von Säugetieren mit mehr als 20Mol% und im Golgi-Apparat mit ungefähr 8Mol%, sowie im Endoplasmatischen Reticulum mit ca. 6Mol% auf.<sup>[21]</sup>

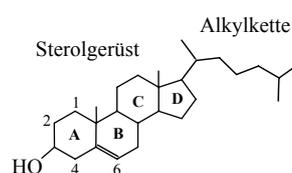


Abbildung 1.7: Struktur und Nomenklatur des Cholesterols.

In Membranen ist seine 3 $\beta$ -Hydroxylgruppe zur Außenseite gerichtet, und die starren Ringstrukturen liegen parallel zu den Acylketten der angrenzenden Lipide. Membranen, die Cholesterol enthalten, sind im Mittel dicker<sup>[22]</sup> und für kleine Moleküle undurchlässiger als vergleichbare ohne Cholesterol-Anteil. So ergaben Messungen der Wasserpermeabilität von Membranen eine Erniedrigung von 16–18 $\mu\text{m/s}$  für reine DPPC-Vesikel auf nurmehr 8 $\mu\text{m/s}$  für cholesterolhaltige.<sup>[23]</sup>

Der Grund dafür liegt in der bereits 1976 von Stockton und Smith<sup>[24,25]</sup> in  $^2\text{H-NMR}$ -Untersuchungen von PC-Membranen beobachteten Erhöhung der Ordnung der Fettsäureketten in Gegenwart von Cholesterol. Diese Beobachtung kann u.a. auf eine eingeschränkte *trans/gauche*-Isomerisierung mit Erhöhung der *trans*-Anteile zurückgeführt werden,<sup>[19]</sup> während die laterale Lipid-Beweglichkeit durch Cholesterol nicht eingeschränkt wird.<sup>[26]</sup>

Daher liegt die primäre Funktion von Cholesterol in der Regulierung der Membranfluidität, indem es die Gelphase (s. Kap. 1.2.7) flexibler, die  $L_\alpha$ -Phase dagegen steifer macht und so stark verbreiterte Phasenübergänge in den Lipidmembranen induziert.<sup>[27,28]</sup> Ein Grund für die gesteigerte Fluidität cholesterolhaltiger Gelphasen-Membranen liegt wahrscheinlich in der Erhöhung der Rotationsdiffusion

von Lipiden in Gegenwart dieses Sterols,<sup>[29]</sup> was möglicherweise auf eine Störung der Lipid-Gitterstruktur zurückzuführen ist. Dadurch können sich gerichtete attraktive van der Waals-Wechselwirkungen, wie etwa die London-Kräfte (Kap. 1.1.1), zwischen benachbarten Lipiden nur schwächer ausbilden.

Wie von Yeagle beschrieben,<sup>[30]</sup> erfüllt Cholesterol auch bezüglich verschiedener Membranproteine wichtige Funktionen, indem es durch Bindung an bestimmte Proteine sowohl aktivierend als auch hemmend wirken kann. Darüber hinaus ist es für die Befestigung der GPI-Anker bestimmter Membranproteine erforderlich.<sup>[31]</sup> Akute Cholesterol-Verarmung führt bei der Exocytose zur Störung der SNARE-Cluster,<sup>[32]</sup> den Rezeptoren der SNAPs (s. Kap. 1.3.2), und bei der Endocytose zu einer Blockierung der Bildung Clathrin-umhüllter Coated Vesicles.<sup>[33,34]</sup> Prinzipiell ruft eine Cholesterol-Verarmung in Membranen eine Hemmung der lateralen Membranprotein-Diffusion hervor.<sup>[35]</sup>

#### *Zusammensetzung synaptischer Membranen und Vesikel*

Ein Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit Protein-Membran-Wechselwirkungen, die im Zusammenhang mit der neuronalen Signaltransduktion an Synapsen stehen. Daher werden im folgenden die Ergebnisse gemessener Lipidzusammensetzungen sowie die Acylkettenverteilungen der Phospholipide von synaptosomalen Membranen bzw. synaptischen Vesikel tabellarisch angegeben (Tab. 1.1–1.4).

Lipidzusammensetzung [Mol%] <b>synaptosomaler Membranen</b>		
	Rattenhirn nach Breckenridge <sup>[36]</sup>	Rattenhirn nach Cotman <sup>[37]</sup>
Lyso-PC	0,7	1,3
PC	41,2	43,5
PE	34,4	36,2
PS	14,1	} 15,1
PI	3,8	
PA	0,5	–
SM	5,3	3,9
<u>Cholesterol</u> Lipid	0,445	0,460

Tabelle 1.1: Lipidzusammensetzung der synaptosomalen Membranen in Molprozent mit Angabe des molaren Cholesterol/Lipid-Verhältnisses.

Fettsäureketten-Verteilung [Mol%] synaptosomaler Membranen						
Fettsäuren	PC	PE	PS	PI	PA	SM
16:0	57,1	5,0	0,5	10,0	18,2	5,3
18:0	11,8	25,1	48,7	38,3	31,0	88,7
18:1	22,1	6,6	7,6	8,5	11,2	0,1
20:4	4,3	12,4	2,0	36,9	13,9	–
22:4	0,1	6,2	3,9	–	2,6	–
22:5	–	1,4	3,2	–	1,2	–
22:6	2,7	27,6	34,1	4,7	17,3	–

Tabelle 1.2: Fettsäureketten-Verteilung der Phospholipide in synaptosomalen Membranen im Rattenhirn nach Breckenridge.<sup>[36]</sup> Angegeben sind die Molprozent der am häufigsten auftretenden Fettsäuren.

Lipidzusammensetzung [Mol%] synaptischer Vesikel				
	a) Guinea Schwein	b) Torpedo marmorata	c) Ratte	d) Guinea Schwein
Lyso-PC	0,8	0,5	1,5	n. best.
PC	38,7	46,6	41,6	40,9
PE	30,1	29,5	35,8	29,5
PS	15,8	12,6	11,6	11,6
PI	5,3	5,1	2,9	5,0
PA	1,1	0,6	1,8	1,8
SM	8,2	5,1	4,8	11,2
<u>Cholesterol</u> Lipid	0,51	0,42	0,59	0,41

Tabelle 1.3: Lipidzusammensetzung synaptischer Vesikel in Molprozent aus  
a) dem cerebralen Cortex des Guinea pig nach Nagy,<sup>[38]</sup> Angabe der Mittelwerte von vier unabhängigen Bestimmungen;  
b) den elektromotorischen Synapsen des Torpedo marmorata,<sup>[38]</sup>  
c) dem Rattenhirn nach Breckenridge,<sup>[39]</sup>  
d) dem cerebralen Cortex des Guinea pig nach Eichberg.<sup>[40]</sup>

Fettsäureketten-Verteilung [Mol%] synaptischer Vesikel					
Fettsäuren	PC	PE	PS	PI	SM
16:0	43,4	7,4	0,6	8,0	5,7
18:0	13,9	26,3	44,1	40,4	87,5
18:1	25,5	8,6	7,5	5,6	–
20:4	6,0	16,7	2,8	33,0	–
22:4	2,0	8,8	4,9	–	–
22:5	0,2	1,2	1,2	–	–
22:6	6,9	30,6	37,0	2,6	–

Tabelle 1.4: Fettsäureketten-Verteilung der Phospholipide synaptischer Vesikel im Rattenhirn nach Breckenridge.<sup>[39]</sup> Angegeben sind die Molprozentage der am häufigsten auftretenden Fettsäuren.

In verschiedenen Arbeiten wurden die Lipidanteile in molaren Einheiten, in anderen Veröffentlichungen jedoch zum Teil in Massenprozenten angegeben. Für eine einheitliche Darstellung erfolgte die Umrechnung der Massenprozentage in molare Anteile. Die hierfür erforderliche Bestimmung der mittleren Lipid-Molmassen erfolgte unter Verwendung der von Breckenridge angegebenen Phospholipid-Fettsäureketten-Zusammensetzung.<sup>[36,39]</sup>

#### *Änderung der Lipidzusammensetzung während des Alterungsprozesses*

Für die Aufklärung der molekularen Entstehung verschiedener altersbedingter Krankheiten ist die Änderung des PC/SM-Verhältnisses mit fortschreitender Lebensdauer von Bedeutung. Im Lauf des Lebens steigt der SM-Gehalt auf Kosten von PC mehr und mehr.<sup>[41,42]</sup> Gleichzeitig verschiebt sich das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Acylketten zugunsten der gesättigten.<sup>[41]</sup> Damit sind deutliche Änderungen von Membraneigenschaften zu erwarten, wie etwa Viskosität oder Permeabilität.

### **1.2.2 Proteine an und in Membranen**

Das Protein/Lipid-Massenverhältnis in Membranen variiert von 1:4 bis 4:1.

Abhängig davon, ob ein Protein die ganze Membran durchspannt, oder nur auf einer Seite angelagert ist, spricht man von *integralen* bzw. *peripheren Membranproteinen*. Letztere können entweder durch Wechselwirkung mit den Lipidkopfgruppen oder

aber durch Lipidanker an die Membran gebunden sein, wie Abb. 1.8 am Beispiel des Prion Proteins PrP<sup>C</sup> mit seinem Glycosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Anker zeigt.<sup>[43]</sup>

Integrale Membranproteine, die einen spezifischen Substrattransport katalysieren, sowie kanalbildende Proteine besitzen oftmals amphipathischen Charakter, so dass sich lipophile Seitenketten in den Membran-angrenzenden Bereichen befinden und eine hydrophile Struktur das Kanalinnere ausleitet.

Membranen dienen Proteinen jedoch nicht nur als passiver Ankerpunkt, sie können durch ihre Lipidzusammensetzung, die Membrandicke ( $\approx 5\text{--}10\text{nm}$ ), oder den lokalen Krümmungsradius die Proteinaktivität maßgeblich beeinflussen bzw. steuern.<sup>[27,44]</sup>

Umgekehrt können Proteine auch die Eigenschaften von Membranen mit beeinflussen. Dieser Fall tritt z.B. beim *hydrophobic mismatch* auf. Ist der hydrophobe Bereich eines Proteins länger oder kürzer als derjenige der Membran, diffundieren solche Lipide in die Umgebung des Proteins, die am ehesten diese Lücke schließen können. Das heißt, die mittlere Membrandicke passt sich in Proteinnähe den lokalen Erfordernissen an.<sup>[45]</sup> Phasenseparationen treten somit u.a. als Folge des proteininduzierten *hydrophobic mismatches* in Lipidmembranen auf.

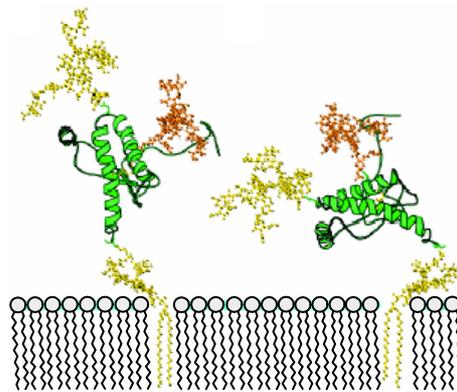


Abbildung 1.8: Prion Protein PrP<sup>C</sup> mit zwei verschiedenen Orientierungen des GPI-Ankers bzgl. des Proteins; nach [43].

### 1.2.3 Domänenbildung

Basierend auf den Untersuchungen von Lipideigenschaften liposomaler Membranen wurde der Aufbau von *in vitro*-Lipidbilayern aus mosaikartigen Bereichen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung postuliert.<sup>[46,47]</sup> Gerade bei der Signaltransduktion, sowie der Exo- und Endocytose spielen Plasmadomänen, die reich an Sphingolipiden und Cholesterol sind, eine wesentliche Rolle, da sich in ihnen die für die

Signalübertragung erforderlichen Proteine (VAMPs, SNAREs, ...) anreichern können.

Solche Domänen sind jedoch keineswegs als starre Gebilde zu verstehen, deren Größe und Zusammensetzung gegen Änderungen der Umgebungsbedingungen invariant sind. Gawrish et al.<sup>[48]</sup> zeigten beispielsweise 1995, dass eine Dehydratisierung Lipidentmischungen induzieren kann, die bei erneuter Rehydratisierung ebenso wieder verloren gehen können. Thermodynamisch kommt es zu Lipid-Entmischung und damit zur Domänenbildung, wenn trotz der auftretenden Entropie-Verringerung das Gibbs Potential – d. h. die freie Enthalpie – infolge eines erhöhten Gewinns an Enthalpie durch verstärkte Lipid-Lipid-Wechselwirkungen zunimmt.

In den letzten Jahren wurde ein Ausdruck für eine spezielle Art von Domänen geprägt, die sog. *lipid rafts*.<sup>[19]</sup> Darunter versteht man Membranbereiche, die vornehmlich SM und Cholesterol enthalten. Da die Stärke der Wechselwirkung von Cholesterol mit den verschiedenen Phospholipidklassen folgende Reihenfolge besitzt<sup>[49]</sup>



zeichnen sich *lipid rafts* als besonders stabile Domänen aus. Eine gängige Charakterisierung dieser Rafts besteht darin, dass sie sich bei  $T = 4^\circ\text{C}$  in Gegenwart des Detergenz Triton X-400 nicht auflösen. Allerdings räumt Heerklotz<sup>[50]</sup> die Möglichkeit ein, dass erst die Detergenz-Zugabe die Bildung der auf diese Weise gefundenen Rafts induziert. Mit dem als „kanonische *lipid raft*-Mischung“ bekannt gewordenen molaren Verhältnis 34:36:32 oder 1:1:1 für eine Glycerophospholipid/Sphingolipid/Cholesterol-Komposition<sup>[31]</sup> wurden vielfach Modellmembranstudien durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben in Temperaturbereichen unterhalb der Phasenübergangstemperaturen sämtlicher beteiligter Lipidkomponenten einen mittleren Raft-Durchmesser von einigen  $\mu\text{m}$ .<sup>[51-53]</sup>

Ob Cholesterol tatsächlich mit Sphingolipiden besonders stark wechselwirkt, wird in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert. Nach [18] existiert u.a. eine hohe Sphingolipid-Cholesterol-Adhäsion wegen der vorwiegend gesättigten Acylketten des SM, wodurch die van der Waals-Kräfte mit dem planaren Sterolgerüst des Cholesterols besonders hoch sind. Zudem besitzt SM die Fähigkeit mittels der im Interface-Bereich vorhandenen Amid- und Hydroxylgruppe nicht nur in der Rolle des Protonenakzeptors, sondern auch als Donor Wasserstoffbrücken zu der  $3\beta\text{-OH}$ -Gruppe des Cholesterols auszubilden.<sup>[54]</sup>

Demgegenüber weist eine jüngst erschienene Studie von Holopainen<sup>[55]</sup> darauf hin, dass die bisher postulierte starke Sphingolipid-Cholesterol-Wechselwirkung gar nicht existiert.

Eine eingehende Analyse der Konsequenzen, die sich aus der Existenz von Lipid-domänen ergeben, führt neben dem in Kap. 1.2.1 erwähnten direkten Einfluss des Cholesterols auf die Aktivität verschiedener Proteine noch auf eine indirekte Wirkung des Sterols. Da die Membranzonen, in denen Cholesterol reichhaltig auftritt,

durch eine höhere Alkylkettenordnung dicker sind als die benachbarten weniger geordneten Bereiche, kommt es in den Übergangsregionen zu Bilayerdefekten. Die Diffusion kleiner Substratmoleküle in und an der Membranoberfläche ist in solchen Defektlinien teilweise um Größenordnungen beschleunigt,<sup>[28]</sup> was sie für die Nutzung enzymatischer Prozesse besonders interessant macht. Tatsächlich wurden bereits Änderungen von Lipaseaktivitäten<sup>[56]</sup> und Rezeptoreigenschaften<sup>[57]</sup> bei rascher Variation des lokalen Cholesterolgehalts von Membranen beschrieben.

Allerdings haben Rafts nicht nur in gesunden Zellen funktionelle Bedeutung. Sie sollen auch an Pathomechanismen beteiligt sein. So findet beispielsweise die Umfaltung des Prion Proteins PrP<sup>C</sup> in seine pathogene Form PrP<sup>Sc</sup>, die bei Schafen die Scrapie-Krankheit hervorruft,<sup>2)</sup> vermutlich an *lipid rafts* in den sekundären Lysosomen statt.<sup>[58]</sup> Eine Erhöhung des SM-Gehalts führt in diesem Fall zu einer geringeren Bildung von PrP<sup>Sc</sup>.

#### 1.2.4 Phasenstrukturen von Lipiden in Wasser

Durch ihre amphiphilen Eigenschaften bilden Lipide spontan zwei- oder dreidimensionale Strukturen, die sich zu geschlossenen Flächen krümmen (vgl. Abb. 1.9). Zu welcher Phase bzw. geometrischen Form eine gegebene Lipidsorte aggregiert, kann mit Hilfe des von Israelachvili vorgestellten Konzepts der *optimalen geometrischen Packung* abgeschätzt werden.<sup>[12]</sup> Dabei wird das Volumen der Kohlenwasserstoffketten  $V_C$  als inkompressible Flüssigkeit angesehen und ein Packungsparameter  $P$  berechnet

$$P = \frac{V_C}{A' \cdot L_C} \quad (1.2)$$

In Gl. (1.2) wird die Kopfgruppenfläche  $A'$  eines Lipids mit dessen mittleren Kettenfläche  $A_C$ , die sich aus dem Quotienten des Kettenvolumens und der Kettenlänge  $L_C$  ergibt, verglichen.

Lipide, deren Kopfgruppe und Acylkettenfläche in etwa den gleichen Radius beanspruchen, bilden entweder planare ( $P \approx 1$ ) oder vesikuläre ( $\frac{1}{2} < P < 1$ ) lamellare Phasen aus. Ist die Kopfgruppe deutlich größer als der Querschnitt der Fettsäureketten, nehmen die Lipide vorzugsweise eine sphärisch-mizelläre ( $P < \frac{1}{3}$ ), oder hexagonale  $H_1$ -Phase ( $\frac{1}{3} < P < \frac{1}{2}$ ) ein (s. Abb. 1.9).<sup>[12]</sup> Dabei werden die hydrophoben Ketten nach innen gewandt und durch die hydrophilen Kopfgruppen vom Wasser abgeschirmt. Detergenzien in Wasser bilden beispielsweise kugelförmige Mizellen.<sup>[59]</sup> Dagegen ordnen sich amphiphile Moleküle in der  $H_1$ -Phase zu ausgedehnten Zylinderstrukturen an, in denen die Lipide sowohl um die lange Molekülachse als auch um die Zylinderachse rotieren.<sup>[60]</sup>

<sup>2)</sup> Das Analogon bei Rindern ist die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) und bei Menschen die Creutzfeld-Jakob-Krankheit.

Eine inverse Molekülanordnung findet man für Packungsparameter größer als Eins. Da die Alkylketten mehr Platz als die Kopfgruppe beanspruchen, bildet jetzt das Wasser den Kern der Zylinderstrukturen. Vertreter dieser invers hexagonalen  $H_{II}$ -Phase sind die Phosphatidylethanolamin-Lipide.<sup>[61,62]</sup> Der Name der  $H_I$ - und  $H_{II}$ -Phase rührt von der hexagonalen Anordnung der Zylinder her.

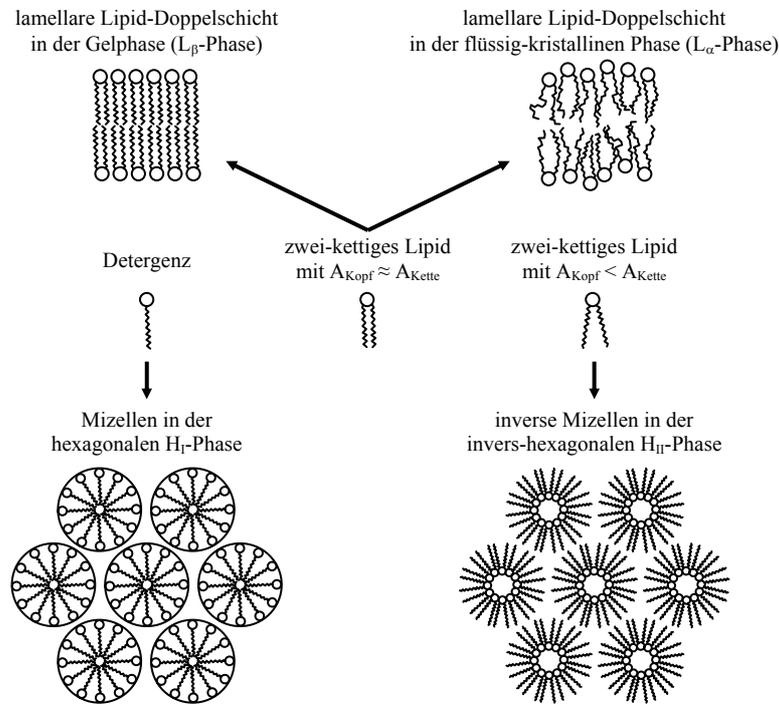


Abbildung 1.9: Phasenstrukturen von Lipiden in Wasser.

### 1.2.5 Wechselwirkung zwischen Wasser und Lipid-Bilayern

Wasser besitzt gegenüber ähnlich großen Molekülen einen ungewöhnlich hohen Schmelz- und Siedepunkt, sowie ein Dichtemaximum bei 4°C. Verantwortlich für die meisten anomalen Eigenschaften des Wassers sind die temperaturabhängigen intermolekular wirkenden Wasserstoffbrücken-Bindungen (H-Brücken) und sein großes Dipolmoment ( $\mu_{H_2O} = 1,84\text{Debye}^{[63]}$ ).

Die Interaktion des Wassers mit Lipid-Bilayern beschränkt sich hauptsächlich auf den Kopfgruppenbereich und den hydrophilen Teil des Interfaces. Die Stärke der Hydratisierung wird durch die Hydratationszahl  $n_w = n_{\text{Wasser}}/n_{\text{Lipid}}$  [Mol/Mol], d.h. durch die Zahl der Wassermoleküle pro Lipid, angegeben.

#### *Schalenmodell*

Aus Monte Carlo Simulationen von Frischleder und Peinel<sup>[64]</sup> ebenso wie aus <sup>2</sup>H-NMR-Messungen von Finer und Dark<sup>[65]</sup> zur Untersuchung des Wasserkontakts mit Phospholipid-Membranen wurde übereinstimmend die Existenz dreier Hydratationsschalen abgeleitet:

- ***Bound Water***  
Diese Wasserschale definiert sich durch direkte H-Brückenbindungen zwischen den Phospholipiden und dem H<sub>2</sub>O. Die damit einhergehende Rotation des Wassers mit den Phospholipiden um eine gemeinsame Achse<sup>[66]</sup> bewirkt, dass der Dipolvektor der Wassermoleküle im Mittel parallel zur Rotationsachse der Lipide steht. Das *Bound Water* steht in schnellem Austausch mit dem *Trapped Water*.<sup>[67, S.257]</sup>
- ***Trapped Water***  
Nicht-orientiertes Wasser, das durch die Membranoberfläche in seiner Bewegung beeinflusst wird, bezeichnet man als *Trapped Water*. Selbst wenn das *Trapped Water* keine H-Brücken zwischen H<sub>2</sub>O- und Lipid-Molekülen ausbildet, können *charge transfer* Prozesse auftreten, die einen attraktiven Beitrag zur gesamten Wasser-Lipid-Wechselwirkung liefern. Angaben über die Zahl der Wassermoleküle in den *Trapped* und *Bound Water* Schalen weichen allerdings teilweise deutlich voneinander ab und schwanken zwischen 4 und 12 pro Lipid.
- ***Bulk Water***  
Das sich wie freies Wasser verhaltende *Bulk Water* unterliegt keinen Wechselwirkungen mehr mit der Membran<sup>[65]</sup> und tauscht nur langsam mit den Molekülen der *Trapped Water* Schale aus. Durch die isotrope Bewegung mittelt sich die Quadrupolaufspaltung zu Null. Obgleich das freie Volumen (*Bulk Water*) in lebenden Organismen nicht wirklich frei sondern durch das Cytoskelett sowie durch Membranproteine eingeschränkt ist, besitzen diese Zellkomponenten nur einen geringen Einfluss auf die Beweglichkeit des Oberflächen-nahen *Bulk Waters*.<sup>[68]</sup>

Nach dem Schalenmodell werden die Hydratationsschalen mit steigendem  $n_w$  sukzessiv aufgefüllt.

In <sup>2</sup>H-NMR-Experimenten mit flüssigkristallinen Lipid-Bilayern findet man generell eine Zunahme der Quadrupolaufspaltung des D<sub>2</sub>O-Signals mit steigender Temperatur bzw. sinkender Hydratation.<sup>[66]</sup>

### Interlamellare Wasserorientierung

Die Orientierung von Wasser in unmittelbarer Nähe unterschiedlich geladener glatter Oberflächen wurde theoretisch in [69] untersucht. Die daraus hervorgehende mittlere Verteilung des Winkels zwischen H<sub>2</sub>O-Dipolvektor und der Flächennormalen ist in Abb. 1.10 dargestellt.

Die bei negativen Oberflächen auftretende scharfe Verteilung im Bereich von ca. 126° entspricht der Ausrichtung einer O–H-Bindung senkrecht zur Oberfläche. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 1.10 auf reale Membranen ist sicher nicht möglich aufgrund der stark ausgeprägten inhomogenen Oberflächenstruktur solcher Systeme. Vielmehr geht die Orientierung der Moleküle im *Bound Water* auf Interaktionen mit den hydrophilen chemischen Gruppen der am Membranaufbau beteiligten Lipide zurück – Trimethylammonium-, Phosphat-, Carbonyl- oder auch Hydroxylgruppen.

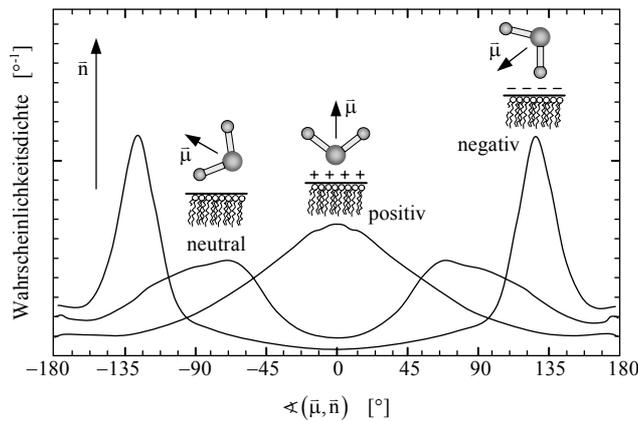


Abbildung 1.10: Wasserorientierung an geladenen und neutralen glatten Oberflächen nach [69]. Gezeigt ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Winkels zwischen der Flächennormalen  $\bar{n}$  und dem Dipolvektor  $\bar{\mu}$  des Wassers.

### Membrandehydratisierung

Untersuchungen, die sich mit den Änderungen der Membran-Eigenschaften in Abhängigkeit von der Hydratation befassen, besitzen auch physiologische Relevanz. Beispielsweise entstehen bei der Anlagerung oder Integration von Membranmolekülen an bzw. in Lipid-Bilayer lokal stark dehydratisierte Bereiche.<sup>[28]</sup> Ebenso haben zweiwertige Metallionen (z.B. Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) in Membrannähe durch ihre hohe H<sub>2</sub>O-

Adhäsion einen Einfluss auf die Bilayer-Eigenschaften, der einer Dehydratisierung gleichkommt.<sup>[70]</sup> Schließlich können viele einfache Organismen ihre Funktionen auch unter extremem Wassermangel aufrechterhalten oder nach erneuter Hydratisierung wieder aufnehmen. Dies gilt sowohl für die Austrocknung von Bakterien und Samen, wie auch für das Überleben von Frostperioden.<sup>[71]</sup>

### 1.2.6 Unterschiede zwischen H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O

D<sub>2</sub>O bildet infolge seiner höheren Masse stabilere H-Brücken aus als H<sub>2</sub>O.<sup>[5]</sup> Dennoch beeinflusst ein Austausch des Lösungsmittels von H<sub>2</sub>O gegen D<sub>2</sub>O nur in geringer Weise die Temperatur  $T_m$  des Hauptphasenübergangs von Lipidmembranen und etwas stärker die Vorübergangstemperatur  $T_{pre}$ .<sup>[72]</sup> Dagegen senkt z.B. die Perdeuterierung der beiden Acylketten des DPPC ( $\rightarrow$  DPPCd<sub>62</sub>)  $T_m$  wesentlich drastischer von 41,25°C auf 37,75°C.<sup>[73]</sup> Dielektrische Membraneigenschaften werden durch einen Austausch von H<sub>2</sub>O gegen D<sub>2</sub>O nicht verändert.<sup>[74]</sup>

### 1.2.7 Thermisches Membranverhalten

Biologische Membranen liegen im allgemeinen in der fluiden Phase mit schneller lateraler Diffusion vor,<sup>[75]</sup> wobei sich der Betrag der Diffusionskonstante  $D$  für die Lipide typischerweise in der Größenordnung von  $2-8 \cdot 10^{-12} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$  bewegt.<sup>[23,76-78]</sup> Zellmembranen können somit als zweidimensionale Flüssigkeiten orientierter Lipide und Proteine angesehen werden.

#### *Thermotrope Bilayer-Phasen*

Allgemein befinden sich Lipid-Doppelschichten bei sehr tiefen Temperaturen<sup>3)</sup> in einem lamellaren kristallinen Zustand  $L_c$  oder  $L_c'$ .<sup>4)</sup> Die Packung der Lipide entspricht hierbei der eines wasserfreien Lipidkristalls.<sup>[79-81]</sup> (Dieser Zustand ist allerdings nur für gesättigte Lipide erreichbar.)

Bei der Subübergangs-Temperatur  $T_s$  geht das System in eine Gelphase bzw. in einen geordneten Zustand  $L_\beta$  oder  $L_\beta'$  über, in dem die Lipide weniger dicht gepackt und stärker hydratisiert sind.<sup>[82]</sup> jedoch die laterale Diffusion immer noch stark eingeschränkt ist.<sup>[83]</sup> Dieser Übergang kann binnen einiger Millisekunden stattfinden,<sup>[84]</sup> wohingegen umgekehrt der Übergang in die  $L_c$ -Phase gewöhnlich deutlich längere Äquilibrierungszeiten benötigt. Die Korrelationszeiten für Kopfgruppen- bzw. Fettsäureketten-Rotationen verkürzen sich in der  $L_\beta$ -Phase um 3 bis 4 Größenordnungen (vgl. Tab. 1.5).

<sup>3)</sup> Die Definition für „sehr tiefe Temperaturen“ ist grundsätzlich Lipid-abhängig.

<sup>4)</sup> Das Apostroph kennzeichnet eine Verkippung der Längsachsen der Lipide gegenüber der Membrannormalen.

Temperatur T	Kettenrotation	Kopfgruppenrotation	Kettenreorientierung
$T < T_s$	$10^{-4}$ (I)	$10^{-3}$ (IV)	$10^{-4}$ (I)
$T_s < T < T_p$	$10^{-7}$ (II)	$10^{-8}$ (V)	$10^{-5}$ (II)
$T_p < T < T_m$	–	$10^{-9}$ (V)	$2 \cdot 10^{-6}$ (II)
$T_m < T$	$10^{-9}$ (III)	$10^{-9}$ (VI)	$10^{-7}$ (II)

Tabelle 1.5: Größenordnungen der Korrelationszeiten in sec. für verschiedene Bewegungsmoden von DPPC-Lipiden im Bilayer in den Phasen  $L_c$ ,  $L_{\beta}$ ,  $P_{\beta}$  und  $L_{\alpha}$ .

- (I): nach Marsh (1980);<sup>[85]</sup>  
 (II): nach Trahms et al. (1983);<sup>[86]</sup>  
 (III): nach van der Leeuw und Stulen (1981);<sup>[87]</sup>  
 (IV): nach Fuldner (1981);<sup>[88]</sup>  
 (V): nach Shepherd und Büldt (1979);<sup>[89]</sup>  
 (VI): nach Shepherd und Büldt (1978).<sup>[90]</sup>

Einige Lipide, darunter auch das DMPC oder das DPPC durchlaufen danach bei der Temperatur  $T_p$  einen Vorübergang und gehen in eine Ripple-Phase  $P_{\beta}$  über. Kennzeichnend für diesen Übergang ist eine plötzliche Erhöhung der Kopfgruppen-Rotationsfrequenz um die P–O-Bindung des Phosphoglycerol-Gerüsts.<sup>[89,90]</sup> Die Lipide ordnen sich jetzt in einem hexagonalen Gitter an und verhalten sich wie rotationssymmetrische Teilchen.<sup>[81,91,92]</sup> Um trotz der Ausdehnung im Interface den Acylkettenbereich weiterhin möglichst dicht gepackt und wohl-geordnet zu halten, lagern sich die Lipide verkippt gegen die Bilayernormale aneinander in einer sägezahn-<sup>[91]</sup> oder sinusförmigen<sup>[92,93]</sup> Membranflächenstruktur.

Bei weiterer Temperaturerhöhung geht der Bilayer schließlich am Hauptübergang bei  $T_m$  in die flüssig-kristalline  $L_{\alpha}$ -Phase über. Die Lipide sind jetzt nurmehr locker geordnet. Strehlow und Jähnig,<sup>[94]</sup> ebenso wie Tsong und Kanehisa<sup>[95,96]</sup> halten es für wahrscheinlich, dass das Aufschmelzen der Lipide zunächst in kleineren Membrandomänen stattfindet, die mit der Zeit wachsen, bis sich die gesamte Membran in der  $L_{\alpha}$ -Phase befindet. Abb. 1.11 stellt graphisch das thermotrope (temperaturabhängige) Phasenverhalten von DMPC-Schallvesikeln in wässriger Lösung dar.<sup>[97]</sup>

### Phasenübergänge

Bereits Systeme bestehend aus zwei Lipidkomponenten können eine Vielzahl von Phasenzuständen eingehen. Die Variationsbreite dieser Möglichkeiten soll im folgenden kurz angedeutet werden.

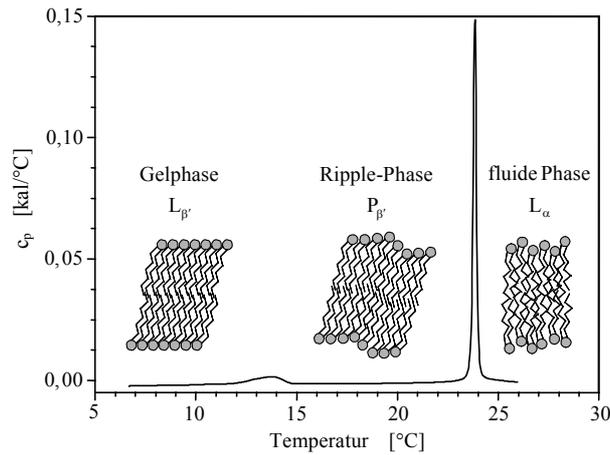


Abbildung 1.11: Phasenverhalten von DMPC-Schallvesikeln, nach [97].

Wie beispielsweise in [98] abgeleitet ist, muss in einem System im thermischen Gleichgewicht mit  $C$  verschiedenen Teilchensorten und  $P$  Phasen das chemische Potential  $\mu_i^j$  für jede Komponente  $i$  in sämtlichen Phasen  $j$  konstant sein. Nach der *Gibbs'schen Phasenregel* ergeben sich daraus  $F$  Freiheitsgrade<sup>[75]</sup>

$$F = C - P + 2 . \quad (1.3)$$

Systeme, bestehend aus mehr oder weniger stark hydratisierten Membranen, werden gewöhnlich unter isobaren Verhältnissen untersucht. Daher kann der Druck als konstanter Freiheitsgrad betrachtet werden, womit sich Gl. (1.3) auf

$$F = C - P + 1 . \quad (1.4)$$

reduziert. Für ein Zwei-Komponenten-System können so drei Fälle unterschieden werden:<sup>[75]</sup>

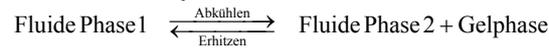
- **Ein-Phasenregion:**  $P = 1$   
Nach Gleichung (1.4) ergeben sich 2 Freiheitsgrade. Damit sind die Temperatur (1. Freiheitsgrad) und die Zusammensetzung der Phase (2. Freiheitsgrad), die sich durch das Konzentrationsverhältnis beider Komponenten bestimmt, frei wählbar. (→ *freie Mischbarkeit* der Komponenten)
- **Zwei-Phasenregion:**  $P = 2$   
Da hier nach (1.4) nurmehr 1 Freiheitsgrad existiert, ist das System bereits durch Wahl der Temperatur  $T$  vollständig festgelegt. Eine Variation des Konzentrationsverhältnisses beider Komponenten in der Probe äußert sich in

der Zwei-Phasenregion durch Änderung der Anteile beider Phasen am Gesamtsystem. Die Zusammensetzung der Phasen kann jedoch nur durch T variiert werden. (→ *Koexistenzbereich*)

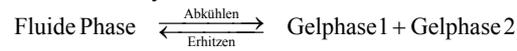
▪ **Drei-Phasenregion:**  $P = 3$

Das System ist bereits vollständig festgelegt, da  $F = 0$  ist. Durch diese Invarianz reduziert sich die Drei-Phasenregion auf einen Punkt im binären Phasendiagramm mit definierter Temperatur und eindeutiger Komponentenzusammensetzung. Je nachdem welche Region – freier Mischbarkeits- bzw. Koexistenzbereich – bei *Temperaturerniedrigung* die Ausgangs- und Endzustandsregion ist, unterscheidet man drei Fälle:

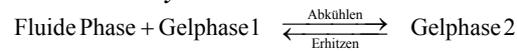
- **Monotektisches System**



- **Eutektisches System**



- **Peritektisches System**



Ein *isomorphes, binäres System* zeichnet sich durch vollständige Mischbarkeit beider Lipidsorten in der Gel- und in der flüssig-kristallinen Phase aus. Zwischen beiden Phasen existiert ein Intermediärbereich mit  $P = 2$ , eingeschlossen durch die

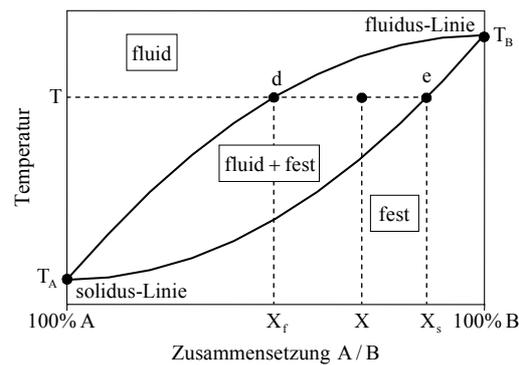


Abbildung 1.12: Isomorphes Phasendiagramm nach [75 Kap. 13] zweier Lipide A und B, die in der flüssig-kristallinen  $L_\alpha$ -Phase und in der Gelphase  $L_\beta$  vollständig mischbar sind. Die Übergangstemperaturen zwischen  $L_\alpha$  und  $L_\beta$  seien  $T_A$  und  $T_B$ . Die *fluidus*- und *solidus*-Linie schließen den Koexistenzbereich ein.

*fluidus*- und die *solidus*-Linie (vgl. Abb. 1.12). Im Koexistenzbereich legt, wie schon erwähnt, bereits die Wahl der Temperatur das Konzentrationsverhältnis beider Lipide in den zwei Phasen fest. Die fluide Phase besitzt dabei das Lipidverhältnis  $X_f$  und die geordnete Phase  $X_s$ .

Für das Konzentrationsverhältnis  $X$  der beiden Lipide A und B, bestimmt sich der Anteil  $f$  bzw.  $s$  der flüssigen bzw. festen Phase am Gesamtsystem durch die folgenden beiden Gleichungen

$$X = f \cdot X_f + s \cdot X_s, \quad (1.5)$$

und

$$f + s = 1. \quad (1.6)$$

Damit erhält man

$$f = \frac{X_s - X}{X_s - X_f}, \quad \text{bzw.} \quad s = \frac{X - X_f}{X_s - X_f}. \quad (1.7)$$

In vollständig hydratisierten Systemen wird Wasser als eigene Phase behandelt. Dagegen ist die Phasenabgrenzung bei weitgehend dehydratisierten Membranen nicht mehr eindeutig festzulegen, da die noch vorhandenen Wassermoleküle mit den Lipiden kurzzeitige starke H-Brückenbindungen eingehen. Von einer unabhängigen Wasserphase kann dann nicht mehr gesprochen werden kann.

### 1.2.8 Modellmembranen

Biologische Membranen entziehen sich durch ihre Komplexität weitgehend detaillierten Untersuchungen und sind zudem präparativ nur schwer zu gewinnen. Analysen von Membraneigenschaften müssen daher vielfach an Modellsystemen, zusammengesetzt aus einigen wenigen Komponenten, durchgeführt werden. Gängige Systeme sind:

- **Mizellen und vesikuläre Aggregate**

Mizellen bilden sich spontan in wässrigen Lösungen, wenn Detergenzien zugegeben werden.

Kleine unilamellare Vesikel (SUV – *small unilamellar vesicles*) mit einem Durchmesser von 20–30nm können durch Ultraschall-Behandlung hergestellt werden. Diese Liposomen dienen beispielsweise als Modellsysteme für synaptische Vesikel.

Für Untersuchungen mit großflächigen Membranen, wie sie etwa bei den synaptischen Endigungen vorkommen, können als Modell größerer Vesikel, die mittels Extrusion durch eine Polycarbonatfolie mit definierter Porengröße herstellbar sind, benutzt werden.

- **Bilayer und Multilayer**  
Ebene Membranstrukturen können durch Auftragen gelöster Lipide auf Substratträger und nachfolgendes Verdampfen des Lösungsmittels untersucht werden. Das Verhältnis von Substratträgerfläche zur Menge des verwendeten Lipids bestimmt hierbei, ob man Bilayer oder Multilayer, bestehend aus einigen 100 bis 1000 übereinander gestapelten Lipid-Doppelschichten, erhält.

### 1.3 Zelluläre Signaltransduktion

In den sechziger Jahren untersuchten Katz und Miledi<sup>[99]</sup> an der Riesensynapse des Tintenfisches die neuronale Signalübertragung mit Blick auf die Frage, welcher Ionenfluss die Transmitterfreisetzung herbeiführt. Wie sich aus Versuchen, bei denen wahlweise die Na<sup>+</sup>- bzw. K<sup>+</sup>-Kanäle durch Tetrodotoxin bzw. Tetraethylammonium blockiert wurden, herausstellte, sind für die Ausschüttung der neuronalen Botenstoffe weder Na<sup>+</sup>- noch K<sup>+</sup>-Ionen verantwortlich. Vielmehr bewirkt die durch ein Aktionspotential hervorgerufene Depolarisation an den synaptischen Endigungen eine Öffnung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Infolge des sehr starken, in die Zelle gerichteten elektrochemischen Ca<sup>2+</sup>-Gradienten kann der Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen binnen weniger hundert Mikrosekunden die Konzentration dieser Ionen im Bereich der aktiven Zone um das Tausendfache auf 10<sup>-4</sup>M ansteigen lassen.<sup>[100 S. 177 & S. 279]</sup>

Ferner entdeckten Fatt und Katz<sup>[101]</sup> eine Quantisierung der synaptischen Übertragung. Jedes Quant entspricht der Neurotransmitter-Ausschüttung eines synaptischen Vesikels in den synaptischen Spalt, bei dem das Vesikel mit der präsynaptischen Membran (vgl. Abb. 1.13) fusioniert und so seinen Inhalt entleeren kann. Die Wahrscheinlichkeit der Freisetzung eines Quants hängt dabei von der Stärke des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms ab.

#### 1.3.1 Physiologie der präsynaptischen Endigung

Abbildung 1.13 zeigt wesentliche Komponenten der präsynaptischen Endigung, die teilweise mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik lokalisiert und identifiziert wurden. Direkt über den synaptischen Einfaltungen befinden sich auf der protoplasmatischen Seite der präsynaptischen Membran Verdickungen, die aktiven Zonen, die auch als *dense bodies*, *dense bars* oder *dense projections* bezeichnet werden. Vesikel, die bei der Exocytose mit der präsynaptischen Membran fusionieren, lagern sich zuvor direkt an diese *dense bodies* an.

In unmittelbarer Nähe der aktiven Zonen findet man eine Vielzahl von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in der Membran – etwa 1500 pro μm<sup>2</sup>. Die postsynaptische Zelle empfängt das neuronale Signal durch Aufnahme der Transmitter an entsprechenden Rezeptoren, die an den Rändern der subsynaptischen Einfaltungen lokalisiert sind.

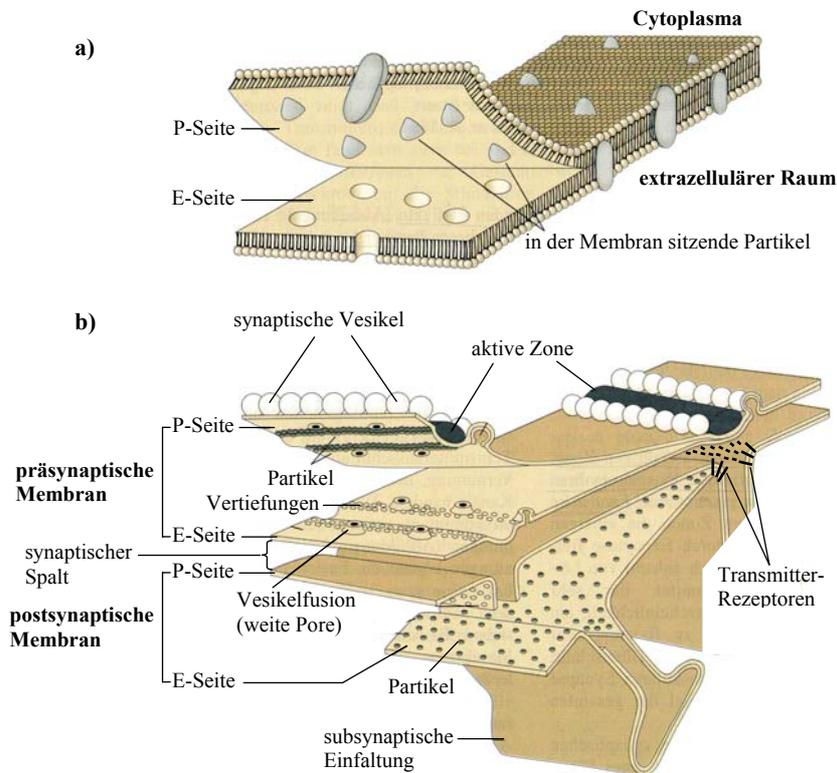


Abbildung 1.13: a) Aufgeklappte präsynaptische Membran mit Unterteilung in die dem Cytoplasma nähere protoplasmatische Seite (**P-Seite**) und in die an den synaptischen Spalt angrenzende externe Seite (**E-Seite**); nach [102].  
 b) 3D-Ansicht der prä- und postsynaptischen Membran mit den im Gefrierbruch erkennbaren Strukturen; nach [103]. Gezeigt sind die aktiven Zonen, in denen die Exocytose stattfindet, mit den angrenzenden Reihen synaptischer Vesikel. Bei den beiderseits der aktiven Zonen befindlichen Partikelreihen in der präsynaptischen Membran handelt es sich um Ca<sup>2+</sup>-Kanäle.

### 1.3.2 Synaptischer Vesikel-Zyklus

Der bei der zellulären Signalübertragung stattfindende synaptische Vesikel-Zyklus kann nach Südhof<sup>[104]</sup> in 9 Schritte unterteilt werden (Abb. 1.14):

1. **Andocken**  
In einem ersten Schritt docken die Vesikel an die aktive Zone an.
2. **Priming**  
Nach dem Kontaktieren der Membran werden die synaptischen Vesikel für die schnelle,  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerte Fusion mit der synaptischen Membran präpariert. Die Existenz des Priming-Prozesses wird u.a. dadurch gestützt, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte Vesikel-Exocytose zu schnell für eine komplexe Mehrschritt-Reaktion stattfindet.<sup>[105]</sup> Dieses Faktum wird zusätzlich durch die Beobachtung erhärtet, dass die meisten Vesikel nicht unmittelbar nach dem Andocken durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die aktive Zone zu einer Fusion mit der synaptischen Membran gebracht werden können.<sup>[106-108]</sup>

Die am Priming beteiligten Proteine können in drei Klassen unterteilt werden: die Vesikel-assoziierten Membranproteine (VAMP), die präsynaptischen Membranproteine und die cytoplasmatischen Proteine. Letztere enthalten u.a. das N-Ethylmaleimid-sensitive Fusionsprotein (NFS)<sup>[109]</sup> und die Gruppe der *soluble NFS attachment proteins* (SNAPs), welche die 4 Proteine  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -SNAP und SNAP-25 in sich vereint.<sup>[110]</sup>

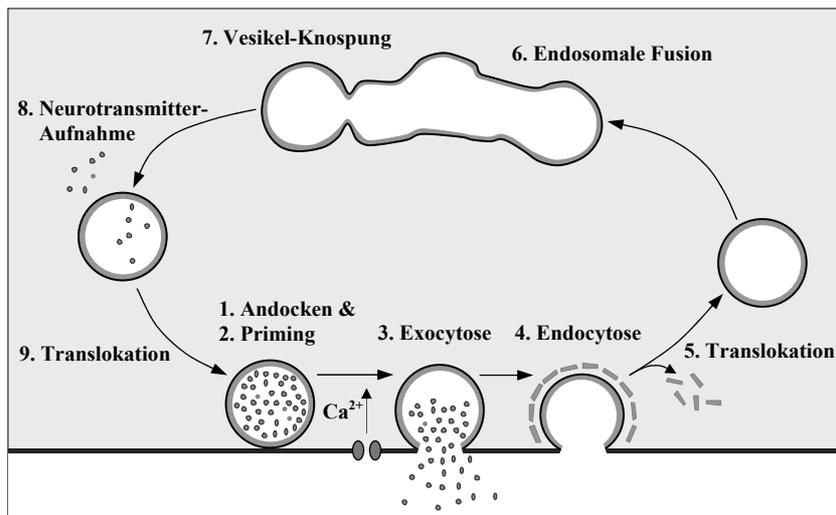


Abbildung 1.14: Schritte des synaptischen Vesikel-Zyklus nach [104].

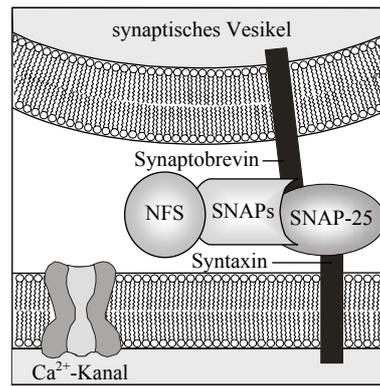


Abbildung 1.15: Schematische Skizze eines Teils des bei der Vesikelanlagerung sich aufbauenden Proteinkomplexes.

Als einer der ersten Schritte während des Priming-Prozesses bildet sich ein Kernkomplex aus den zwei Plasmamembran-Proteinen SNAP-25 und Syntaxin sowie aus dem VAMP Synaptobrevin (Abb. 1.15).<sup>[111]</sup> Die Assimilierung dieses Kernkomplexes bildet den Anker für eine ganze Kaskade von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die im Lauf des Primings, sowie der Exo- bzw. Endocytose stattfinden. So dient der Kernkomplex einer Reihe von SNAPs als Rezeptor (*SNAP receptor*, SNARE),<sup>[112,113]</sup> die ihrerseits die Anlagerung des für das Verschmelzen des Vesikels mit der Plasmamembran benötigten NFS ermöglichen.

### 3. *Exocytose*

Unmittelbar nachdem ein Aktionspotential die synaptische Endigung erreicht, öffnen sich Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, und es findet die Ca<sup>2+</sup>-gesteuerte Fusion zwischen synaptischen Vesikeln und Membran statt. Der Fusionsprozess dauert insgesamt weniger als 0,3ms.<sup>[105]</sup> Allerdings ist die Exocytose weitgehend ineffizient, da nur jedes dritte bis zehnte Aktionspotential zur Exocytose führt, und nur einige der gepumpten Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusionieren.<sup>[106-108]</sup> Die Fusionswahrscheinlichkeit kann jedoch durch einen stärkeren Ca<sup>2+</sup>-Einstrom erhöht werden. Die erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bewirkt gleichzeitig eine Loslösung der am Cytoskelett angelagerten Reserve-Vesikel.<sup>[114-116]</sup>

### 4. *Endocytose*

Um die nach der Exocytose vergrößerte präsynaptische Membran zu recyceln bilden sich zwischen den aktiven Zonen an der Membran mit Clathrin umhüllte Ausstülpungen, sog. *coated pits*.<sup>[117]</sup> Schließlich kommt es zur Abschnürung vollständig umhüllter kleiner Vesikel (*coated vesicles*).

5. **Translokation**  
Im Cytoplasma fallen die Clathrinbruchstücke von den *coated vesicles* ab.
6. **Endosomale Fusion**  
Als sechster Schritt werden die Vesikel wahrscheinlich durch Fusion mit Endosomen (große vesikuläre Membrangebilde) recycled.<sup>[117,118]</sup>
7. **Vesikel-Knospung**  
Die Regeneration synaptischer Vesikel erfolgt hauptsächlich durch Abschnürung von Endosomen.<sup>[104]</sup>
8. **Neurotransmitter-Aufnahme**  
Der für die Neubeladung der Vesikel mit Neurotransmittern erforderliche aktive Transportprozess wird durch einen von einer Protonenpumpe generierten elektrochemischen Gradienten getrieben.<sup>[104]</sup>
9. **Translokation**  
Die frisch gefüllten Vesikel diffundieren<sup>[119]</sup> sodann wieder in Richtung der aktiven Zone oder werden entlang des Cytoskeletts dorthin transportiert.<sup>[104]</sup> Ein Teil der Vesikel wird nahe der *dense bodies* als Reservepool am Cytoskelett immobilisiert.

Der gesamte synaptische Vesikel-Zyklus dauert vermutlich ca. 1min,<sup>[120,121]</sup> wobei die Exocytose weniger als 1ms beansprucht, die Endocytose im Bereich von 5s liegt, und die restlichen 55s für die übrigen Schritte benötigt werden.

## 1.4 Das Parkinson-relevante Protein $\alpha$ -Synuclein

Die Parkinson Krankheit ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, die im fortgeschrittenen menschlichen Alterungsprozess auftreten. Sie wurde erstmals von dem englischen Arzt James Parkinson 1817 beschrieben. Allen Patienten gemeinsam ist eine Verarmung des Gehirns an dem Neurotransmitter Dopamin als Folge der Degeneration dopaminergener Neuronen in der Substantia nigra (Abb. 1.16),<sup>[122]</sup> die den Basalganglien angehört. Die Basalganglien sind indirekt an der Steuerung motorischer Aktivitäten beteiligt, da sie keine direkten Verbindungen mit dem Rückenmark besitzen (Abb. 1.17). Ihre efferenten Verbindungen führen über den Thalamus u.a. zum primären motorischen Cortex (Großhirnrinde) (Abb. 1.18).

Mitte des 20. Jahrhunderts gelang ein wesentlicher Durchbruch bei der Behandlung der Parkinson Krankheit. Durch Verabreichung von L-DOPA, einem Vorläufer des Dopamins, wird die Dopamin-Synthese in den intakten Nervenzellen der Substantia nigra erhöht, was eine deutliche Linderung der Leiden von Parkinson Kranken bewirkt. Allerdings kann der Degenerationsprozess der zerebellaren dopaminergen Neuronen dadurch nicht aufgehalten werden. Aus diesem Grund ist die Suche nach den molekularen Ursachen der Parkinson Krankheit nach wie vor Gegenstand der aktuellen Forschung.

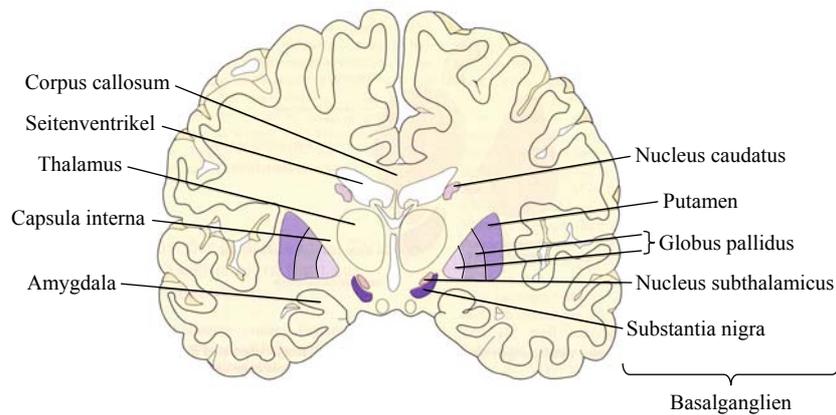


Abbildung 1.16: Coronarschnitt durch die beiden Großhirnhälften mit Angabe der Lage der Basalganglien, nach [123]. Der Globus pallidus unterteilt sich in ein inneres und ein äußeres Segment.

Pathologisch kennzeichnend für die Betroffenen ist ein massives Auftreten intrazellulärer fibrillärer Ablagerungen, sog. *Lewy bodies*, im Pars compacta,<sup>[122,124-126]</sup> welche die von der Großhirnrinde über die Putamen und den Nucleus caudatus kommenden afferenten Verbindungen der Substantia nigra enthält (Abb. 1.17). Die *Lewy bodies* bestehen zu einem großen Teil aus dem vornehmlich im Zentralnervensystem auftretenden präsynaptischen Protein  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ S)<sup>[127]</sup> mit der Sequenz:

```

N-Terminus 1           10           20           30           40
MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAAAGKTKEGVLYV
41           50           60           70           80
GSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQK
81           90           100          110          120
TVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDP
121          130          140 C-Terminus
DNEAYEMPSEEGYQDYPEA

```

Bisher wurde das  $\alpha$ S-Monomer in CD- und NMR-Messungen als in Lösung ungefalteter vorliegendes Protein beobachtet.<sup>[128,129]</sup> In Gegenwart stark gekrümmter negativ geladener Phospholipid-Vesikel in der flüssig-kristallinen Phase (oberhalb von  $T_m$  aller beteiligter Lipidkomponenten) bindet  $\alpha$ S an die Oberfläche dieser Liposomen mit einer partiellen Änderung seiner Konformation.<sup>[129-134]</sup> Der N-Terminus faltet sich hierbei unter Einschluß der NAC-Domäne, in insgesamt zwei  $3_{11}$ -Helices mit perfekt amphipathischer Struktur,<sup>[134]</sup> während der azide C-Terminus weiterhin ungefalteter bleibt. Bezüglich der Bindung von  $\alpha$ S an größere unilamellare Vesikel (LUV)

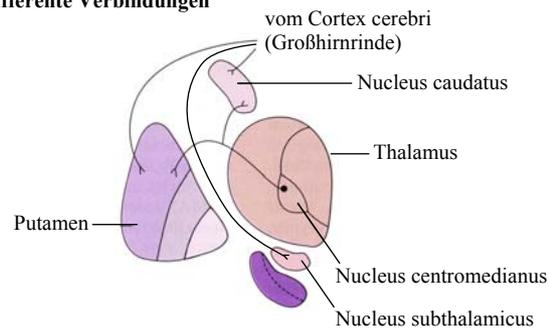
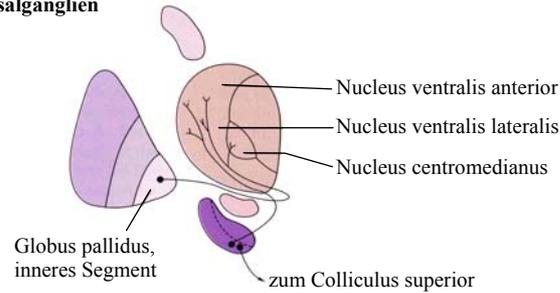
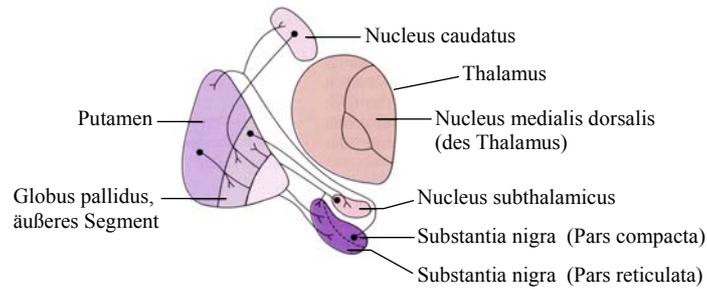
**a) Afferente Verbindungen****b) Verbindungen zwischen den Basalganglien****c) Efferente Verbindungen**

Abbildung 1.17: Die wichtigsten anatomischen Verbindungen der Basalganglien nach [100, S. 558].

- Nahezu alle Afferenzen in die Basalganglien werden vom Nucleus caudatus und dem Putamen empfangen.
- Alle Kerne der Basalganglien sind durch topographisch organisierte Projektionen untereinander verbunden.
- Hauptziel der efferenten Verbindungen der Basalganglien ist der Thalamus.

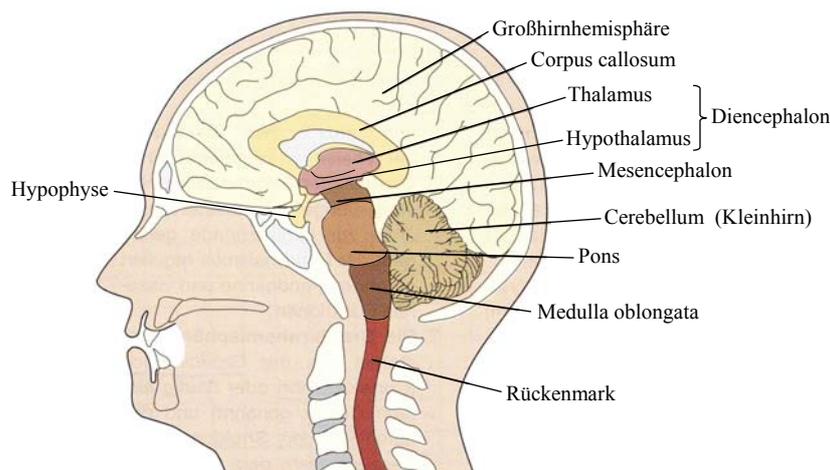


Abbildung 1.18: Wichtige Regionen des menschlichen Zentralnervensystems.

wurden zum Teil widersprüchliche Resultate konstatiert. Narayanan et al.<sup>[135]</sup> ebenso wie Fuller et al.<sup>[136]</sup> fanden eine gewisse Bindungsneigung an LUV während andere Gruppen nur bei Vesikeln mit hohem Krümmungsgrad eine Bindung nachweisen konnten.<sup>[130,137]</sup>

Oberhalb einer bestimmten Grenzkonzentration aggregiert  $\alpha$ S zu amyloid Fibrillen, wobei die zuvor ungeordnete Struktur<sup>[128,129,138,139]</sup> in ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt wechselt.<sup>[140-142]</sup> Aggregations-Experimente mit Peptidteilstücken aus der Sequenz von  $\alpha$ S ergaben eine besonders rasche Fibrillisierung bei Versuchen mit der hydrophoben NAC-Domäne,<sup>[143,144]</sup> die den Sequenzabschnitt 61 bis 95 beinhaltet.<sup>[145,146]</sup>

Das ebenfalls zur Synuclein-Familie gehörige  $\beta$ -Synuclein ( $\beta$ S), dem in der NAC-Domäne 11 Aminosäurereste fehlen, zeigt nicht nur eine wesentlich geringere Aggregationsneigung gegenüber  $\alpha$ S,<sup>[147,148]</sup> vielmehr kann  $\beta$ S sogar die Entstehung von  $\alpha$ S-Fibrillen unterbinden.<sup>[149-151]</sup> Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Initialschritt der  $\alpha$ S-Aggregation in einer Zusammenlagerung zweier oder mehrerer  $\alpha$ S-Proteine im Bereich der NAC-Domäne besteht.<sup>[152]</sup>

Offenbar ebenfalls hemmend auf die Ausbildung der fibrillären Aggregate wirkt die Gegenwart von gekrümmten Phospholipid-Membranen, an die das Protein bindet.<sup>[135,153]</sup>

Der-Sarkissian et al. weisen in einer ESR-Studie darauf hin, dass der C-Terminus von  $\alpha$ S selbst im fibrillären Zustand komplett entfaltet ist.<sup>[154]</sup> Im Zusammenhang damit ist es leicht verständlich, warum gekürzte  $\alpha$ S-Monomere, die nur bis zu Aminosäurerest 120 reichen, wesentlich schneller aggregieren, als das native Protein.<sup>[155]</sup>

Bis jetzt wurden drei  $\alpha$ S-Mutanten identifiziert, die im Vergleich zum Wild Typ einen früheren Ausbruch der Parkinson-Krankheit induzieren. Es handelt sich um die Mutanten A30P,<sup>[140-142,156-163]</sup> A53T<sup>[140-142,158-166]</sup> und E46K.<sup>[167]</sup> A30P bindet schwächer an Phospholipid-Vesikel als WT- $\alpha$ S aufgrund der Störung der dritten Helix im N-terminalen Bereich.<sup>[168]</sup> Wegen des sich daraus ergebenden reduzierten Transports von  $\alpha$ S aus dem Zellkörper in die axonalen Enden, kommt es im Zellkörper möglicherweise schneller zur Überschreitung der kritischen Aggregationskonzentration.<sup>[168]</sup>

Aggregations-Untersuchungen von  $\alpha$ S legen den Schluss nahe, dass nicht die fibrillären Lewy bodies sondern möglicherweise die Intermediate, sog. Protofibrillen, die für Neuronen toxische Spezies darstellen. Vermutlich permeabilisieren diese Protofibrillen synaptische Vesikel, so dass der Neurotransmitter Dopamin in die Zelle statt in den synaptischen Spalt freigesetzt wird,<sup>[169]</sup> oder aber ein Metallionen-Einstrom in die Vesikel stattfindet.<sup>[170]</sup> Gestärkt wird diese Annahme durch die bereits erwähnte Dopamin-Verarmung im Pars compacta bei Parkinson Kranken.

Besonders interessant im Zusammenhang mit der Dopaminfreisetzung aus SUV bei Zusetzung protofibrillärer Aggregate ist die Beobachtung, dass bereits geringe Mengen eines  $\alpha$ S-Dopamine-Komplexes diese Intermediate zu stabilisieren vermögen.<sup>[171]</sup> Derlei Cluster können unter Oxidationsbedingungen entstehen.<sup>[171]</sup>

## Kapitel 2

# Theorie

### 2.1 Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR)

Einen wesentlichen Bestandteil dieser Arbeit bilden Untersuchungen lamellarer Lipid-Doppelschichten mit Hilfe der Breitband-Deuterium-NMR-Spektroskopie. Im folgenden sollen die entsprechenden quantenmechanischen Grundlagen dargelegt und das physikalische Rüstzeug für eine effiziente Auswertung der erhaltenen Daten skizziert werden.

#### 2.1.1 Kernspin & Magnetisches Dipolmoment

Besitzt ein Atomkern einen von Null verschiedenen Spin  $\bar{I}$ , gilt für  $|\bar{I}|$  und für die Spinkomponente  $I_z$  längs einer Vorzugsrichtung (dies sei o.B.d.A. die z-Achse)

$$|\bar{I}| = \sqrt{I(I+1)}\hbar, \quad I_z = m_I \hbar, \quad \text{mit } m_I = I, I-1, \dots, -I. \quad (2.1)$$

$\hbar = 2\pi\hbar = 6,6262 \cdot 10^{-32}$  Js ist das Plancksche Wirkungsquantum;  $m_I$  bezeichnet man als magnetische Quantenzahl.

Insgesamt existieren  $2I + 1$  mögliche  $m_I$ -Werte für einen Spin  $\bar{I}$ . Mit einem endlichen Spin ist zugleich die Existenz eines magnetischen Dipolmoments  $\bar{\mu}$  verbunden. Dieses steht mit  $\bar{I}$  durch folgende Relation in Beziehung

$$\bar{\mu} = \gamma \bar{I}, \quad \mu_z = m_I \gamma \hbar. \quad (2.2)$$

Die Proportionalitätskonstante  $\gamma$  in Gleichung (2.2), das sog. *gyromagnetische Verhältnis*, definiert sich als

$$\gamma = \frac{g_I \mu_K}{\hbar}. \quad (2.3)$$

$g_I$  ist der nuklid-spezifische Kern-g-Faktor und  $\mu_K$  das *Kernmagneton*.<sup>5)</sup> In Gegenwart eines externen, in z-Richtung gerichteten Magnetfeldes  $\vec{B}_0$ , wechselwirkt  $\vec{\mu}$  mit  $\vec{B}_0$ , so dass der durch  $|I|$  definierte Spinzustand in  $2I+1$  sonst entartete magnetische Zustände aufspaltet. Die potentielle Energie dieser Wechselwirkung, der *Zeeman-Aufspaltung*, entspricht

$$\begin{aligned} V &= -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \\ &= -g_I \mu_K B_0 m_I \end{aligned} \quad (2.4)$$

Für Dipolübergänge ( $\Delta m_I = \pm 1$ ) beträgt der Abstand zwischen zwei Energieniveaus

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0. \quad (2.5)$$

Die zu  $\Delta E$  gehörige Winkelgeschwindigkeit  $\omega_0$  bezeichnet man als *Larmorfrequenz*. In Vektorschreibweise wird  $\omega_0$  dargestellt durch

$$\vec{\omega}_0 = -\gamma \vec{B}_0. \quad (2.6)$$

Kern	I	$g_I$	$\Delta E$ [meV] <sup>6)</sup>	$\nu_0(B_0 = 9,36T)$ [MHz]	nat. Häufigkeit
<sup>1</sup> H	½	5,586	$16,482 \cdot 10^{-4}$	398,5	99,984
<sup>2</sup> H	1	0,857	$2,530 \cdot 10^{-4}$	61,2	0,016
<sup>13</sup> C	½	1,405	$4,145 \cdot 10^{-4}$	100,2	1,100
<sup>14</sup> C	0	0	0	0	98,900
<sup>14</sup> N	1	0,404	$1,191 \cdot 10^{-4}$	28,8	99,635
<sup>15</sup> N	½	-0,564	$1,664 \cdot 10^{-4}$	40,2	0,365
<sup>31</sup> P	½	2,263	$6,678 \cdot 10^{-4}$	161,5	100,000

Tabelle 2.1: Übersicht über NMR-technisch wichtige Isotope nach [172].

<sup>5)</sup>  $\mu_K = \frac{e}{2m_p} \hbar = 5,050783 \cdot 10^{-27} \text{JT}^{-1} = 3,152451 \cdot 10^{-5} \text{meV}$ , wobei  $m_p$  die Masse eines Protons

ist. Ferner gilt:  $\mu_K = \frac{\mu_B}{1836}$ , mit  $\mu_B$  als dem Bohrschen Magneton. Das Kernmagneton ist

demnach um das Massenverhältnis von Proton und Elektron kleiner als  $\mu_B$ .

<sup>6)</sup> Umrechnungsfaktor von Joule in eV:  $1,602176 \cdot 10^{-19} \text{JeV}^{-1}$

Tabelle 2.1 enthält die in der Biophysik wichtigsten NMR-relevanten Nuklide nebst deren Kern-g-Faktoren, den natürlichen Häufigkeiten, sowie den Kernresonanz-spezifischen  $\Delta E$ - und  $\nu_0$ -Werten für ein  $\bar{B}_0$ -Feld der Stärke 9,36T.<sup>7)</sup>

Bei der *Kernspin-Resonanz* finden Übergängen zwischen verschiedenen magnetischen Spinzuständen durch Absorption von Photonen der Frequenz  $\nu = 2\pi \cdot \Delta E/\hbar = 2\pi\gamma B_0$  statt. Die Empfindlichkeit von NMR-Messungen ergibt sich aus der relativen Besetzungsdifferenz zwischen benachbarten Energiezuständen. Für Protonen beispielsweise beträgt die relative Besetzungsdifferenz  $\Delta n$ <sup>8)</sup> zwischen den beiden Zuständen  $m_\alpha$  und  $m_\beta$  mit  $E(m_\alpha) < E(m_\beta)$

$$\Delta n = \frac{N_\alpha - N_\beta}{N_\alpha + N_\beta} \cong \frac{\gamma\hbar B_0}{2k_B T}. \quad (2.7)$$

Für eine <sup>1</sup>H-NMR-Messung bei  $B_0 = 9,36\text{T}$  und  $T = 300\text{K}$  ist damit  $\Delta n = 3,2 \cdot 10^{-5}$ . Zusätzlich bestimmt sich die Güte einer NMR-Messung durch das Signal/Rausch-Verhältnis S/N. Dieses besitzt die Proportionalität<sup>[173]</sup>

$$S/N \sim \frac{B_0^{3/2} \cdot N_I \sqrt{N_s}}{T}, \quad (2.8)$$

wobei T die Temperatur,  $N_I$  die Zahl der in der Probe vorhandenen Kerne mit Spin  $\bar{I}$  und  $N_s$  die Scanzahl bedeuten. Für eine deutliche Verbesserung der Mess-Sensitivität bedarf es somit einer erheblichen Vergrößerung von  $N_s$ .

<sup>7)</sup> Oftmals wird die Magnetfeldstärke nicht in Tesla sondern durch die zugehörige Resonanzfrequenz  $\nu_0(^1\text{H})$  in MHz angegeben.

<sup>8)</sup> Die mittlere Besetzungs-Wahrscheinlichkeit für die beiden Zeeman-Zustände eines Fermions mit Spin  $\frac{1}{2}$  lautet:

$$\frac{e^{-\frac{x}{2}}}{e^{+\frac{x}{2}} + e^{-\frac{x}{2}}} = \frac{1}{1 + e^{+x}}, \quad \text{mit } x = \frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}.$$

Damit leitet sich die Besetzungsdifferenz wie folgt ab:

$$\begin{aligned} \Delta n &= \frac{N_\alpha - N_\beta}{N} = \frac{N \frac{1}{1 + e^{-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}}} - N \frac{1}{1 + e^{+\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}}}}{N}, \quad \text{mit } N = N_\alpha + N_\beta \\ &= \frac{1 + e^{+\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}} - \left(1 + e^{-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}}\right)}{\left(1 + e^{-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}}\right) \left(1 + e^{+\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}}\right)} = \frac{e^{+\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}} - e^{-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}}}{2 + e^{+\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}} + e^{-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}}} \\ &\cong \frac{\gamma\hbar B_0}{2k_B T}, \quad \text{mit } e^x \cong 1 + x \quad \forall |x| \ll 1. \end{aligned}$$

### 2.1.2 Hamiltonian & Energieniveaus

Der Gesamt-Hamiltonoperator eines Atomkerns in einem externen  $\vec{B}_0$ -Feld enthält zusätzlich zu Gleichung (2.3) noch weitere Terme:

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{CS} + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q. \quad (2.9)$$

mit den Bedeutungen:

- $\hat{H}_Z$  : Zeeman-Term (siehe Kap. 2.1.1);
- $\hat{H}_{CS}$  : Term der chemischen Verschiebung (*chemical shift*); Erfassung der lokalen diamagnetischen  $\vec{B}_0$ -Feld-Abschirmung durch Elektronen;
- $\hat{H}_J$  : indirekt durch Bindungselektronen vermittelte magnetische Spin-Spin-Kopplung;
- $\hat{H}_D$  : direkte magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Momenten zweier Kerne;
- $\hat{H}_Q$  : Kopplung der elektrischen Feldgradienten  $\vec{\nabla} \vec{E}_j$  ( $j = 1, \dots, N$ ) (*electric field gradient - EFG*) der N angrenzenden Molekülbindungen mit dem elektrischen Quadrupolmoment e-Q eines Kerns.

In Flüssigkeiten verschwinden die dipolaren und quadrupolaren Beiträge von  $\hat{H}$  aufgrund der schnellen isotropen molekularen Bewegung. Man spricht in diesem Zusammenhang von Bewegungs-Versmälnerung der Resonanzen. Dank dieses Effekts können NMR-Spektren in liquiden Medien mit einer Auflösung von bis zu 1Hz gemessen werden. In Festkörpern oder flüssig-kristallinen Phasen, wie sie bei lamellaren Lipid-Membranen auftreten, dominieren stattdessen  $\langle \hat{H}_D \rangle$  und  $\langle \hat{H}_Q \rangle$ . Tabelle 2.2 enthält die einzelnen  $\hat{H}$ -Terme aufgelistet nebst den Größenordnungen der Erwartungswerte in Flüssigkeiten bzw. Festkörpern.

	$\langle \hat{H}_Z \rangle$	$\langle \hat{H}_{CS} \rangle$	$\langle \hat{H}_J \rangle$	$\langle \hat{H}_D \rangle$	$\langle \hat{H}_Q \rangle$
Flüssigkeit	$10^6$	$10^3-10^4$	$1-10^2$	0	0
Festkörper	$10^6$	$10^3-10^4$	$1-10^2$	$10^4$	$10^5-10^6$

Tabelle 2.2: Größenordnungen der Erwartungswerte der in  $\hat{H}$  eingehenden Wechselwirkungen in Einheiten von Hz; nach [174].

Für die direkte Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Kernmomenten beträgt das durch das Dipolmoment des einen Kerns am Ort des zweiten Nuklids verursachte Magnetfeld

$$B_D = \frac{\mu_0}{4\pi} g_I \mu_K m_I \frac{3 \cos^2 \vartheta - 1}{r^3}. \quad (2.10)$$

$\mu_0$  ist die magnetische Feldkonstante,  $g_I$  der Kern-g-Faktor,  $\mu_K$  das Kernmagneton (siehe S. 34),  $m_I$  die magnetische Quantenzahl,  $r$  der Abstand der beiden Nuklide und  $\vartheta$  der von den Kernspins eingeschlossene Winkel.

Kerne mit  $I \geq 1$  besitzen wegen ihrer nicht-sphärischen Ladungsverteilung einen von Null verschiedenen elektrischen Kern-Quadrupoltensor  $\bar{Q}$ . Abb. 2.1 veranschaulicht die geometrische Gestalt von Nukliden in Abhängigkeit von  $I$  und dem Quadrupolmoment  $eQ$ .

Für den  $^2\text{H}$ -Kern (Deuteron) reduziert sich die Zahl der Molekülbindungen, an dem er beteiligt ist, auf die C-D-Bindung. Das Wechselwirkungspotential  $V_Q$  zwischen dem Quadrupoltensor  $\bar{Q}$  und  $\bar{\nabla E}$  am Ort des  $^2\text{H}$ -Nuklids lautet damit <sup>[22]</sup>

$$V_Q \propto \sum_{i,j} Q_{ij} \frac{\partial E_i}{\partial x_j}, \quad (i=1, 2, 3, \quad j=1, 2, 3) \quad (2.11)$$

$$\Rightarrow V_Q = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} [3m_I^2 - I(I+1)] \cdot \frac{1}{2} [(3 \cos^2 \beta - 1) + \eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha].$$

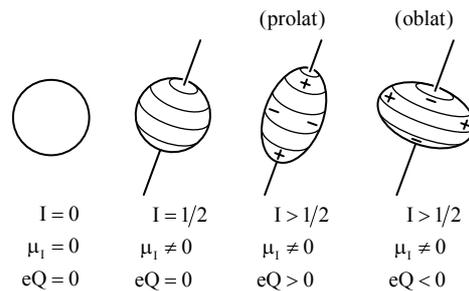


Abbildung 2.1: Geometrische Form von Atomkernen unterschiedlichen Spins nach [175]. Die rechts abgebildeten ellipsoidalen Nuklide unterscheiden sich in ihrer Ladungsverteilung bzgl der Rotationsachse ( $\Rightarrow \pm eQ$ ).

Der Quadrupoltensor  $\bar{Q}$  des Deuterons<sup>9)</sup> geht skalar mit  $eQ$  in Gl. (2.11) ein, da sich der Kern in einem Zustand mit definiertem Drehimpuls befindet und daher nur die Differenz der Ladungsverteilung parallel und senkrecht zur Symmetrieachse ( $z$ -Richtung), die durch  $\bar{B}_0$  definiert wird, berücksichtigt werden muss.<sup>[176, S.496]</sup>

Der EFG-Tensor wird in Gleichung (2.11) durch zwei Parameter repräsentiert, den Feldgradienten-Term  $eq = V_{zz}$ , mit  $q$  als der Ladung des Kerns, und den Asymmetrieparameter  $\eta = (V_{xx} - V_{yy})/V_{zz}$  mit  $V_{x_i x_i} = \partial E_i / \partial x_i$ . Die Koordinaten  $i$  bzw.  $x_i$  beziehen sich auf das Hauptachsensystem der C–D-Bindung. Die Transformation des EFG-Tensors ins Laborsystem, in dem die  $z$ -Achse in Richtung  $\bar{B}_0$  liegt, liefert die Winkelfunktionen in Gl. (2.11) mit den Euler-Winkeln  $\alpha$  und  $\beta$ . Diese Winkel geben die Orientierung des EFG-Tensors relativ zu  $\bar{B}_0$  an. Da die  $z$ -Achse des Hauptachsensystems der C–D-Bindung immer eine Symmetrieachse darstellt, treten nur 2 Euler-Winkel auf.

#### Quadrupol-Aufspaltungsfrequenz $\Delta\nu_Q$

Für einen  $^2\text{H}$ -Kern mit  $I = 1$  existieren in einem  $\bar{B}_0$ -Feld 3 Zeeman-Zustände mit der in Abb. 2.2 dargestellten energetischen Reihenfolge. Nach (2.4) und (2.11) ergibt sich für die Zustandsenergien<sup>[60]</sup>

$$E_{m_i} = -g_i \mu_K B_0 m_i + \frac{e^2 q Q}{8} [3m_i^2 - 2] [(3 \cos^2 \beta - 1) + \eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha]. \quad (2.12)$$

Die Zeeman-Aufspaltungsenergie  $E_Z$  liegt im MHz-Bereich (für  $B_0 = 9,36\text{T}$  beträgt  $E_Z(^2\text{H}) = 61,4\text{MHz}$ ), während sich die Quadrupol-Aufspaltung im kHz-Bereich befindet und damit sehr klein gegenüber  $E_Z$  ist.

Für ein System von  $^2\text{H}$ -Kernen mit gleicher Orientierung ( $\cong$  gleiche Euler-Winkel  $\alpha$  und  $\beta$  für die jeweiligen EFG-Tensoren) relativ zur Richtung des externen Magnetfelds erscheinen im NMR-Spektrum zwei Resonanzlinien im Abstand von

$$\begin{aligned} \Delta\nu_Q &= \frac{(E_{m=-1} - E_{m=0}) - (E_{m=0} - E_{m=+1})}{h} \\ &= \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} [(3 \cos^2 \beta - 1) + \eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha]. \end{aligned} \quad (2.13)$$

<sup>9)</sup> Für den  $^2\text{H}$ -Kern gilt:  $Q(^2\text{H}) = 0,2875 \cdot 10^{-30} \text{m}^2$ .

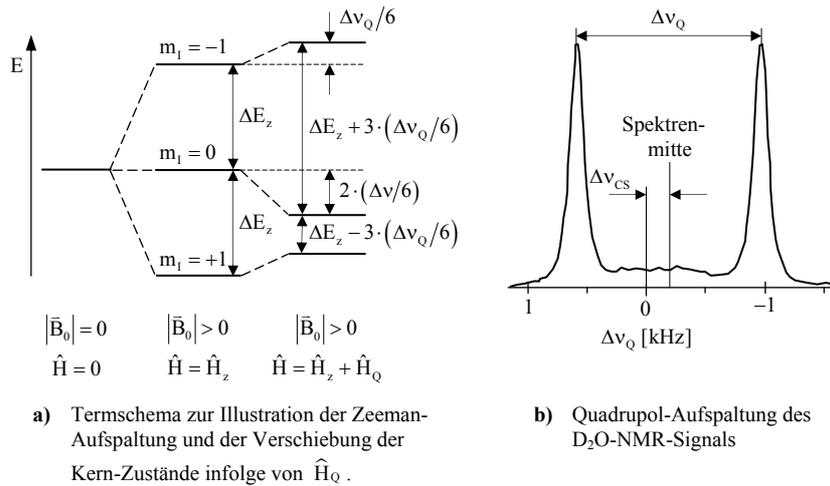


Abbildung 2.2: Energieniveau-Schema für einen Kern mit Spin  $I = 1$  in einem externen Magnetfeld. In **b)** gibt  $\Delta v_{CS}$  die chemische Verschiebung der Spektrenmitte bzgl. des Ursprungs  $\Delta v_Q = 0$  an.

Das entspricht der Auswahlregel für magnetische Dipolübergänge:  $\Delta m = \pm 1$ .<sup>10)</sup>

Treten molekulare Orientierungsänderungen auf, die schneller als  $\Delta v_Q^{-1}$  sind, können diese nur als zeitliches Mittel im Spektrum beobachtet werden (*motional averaging*). Dies wird durch Definition einer spektroskopischen Zeitskala  $\tau_s = \sqrt{5}/(2\pi\Delta v_Q)$

<sup>10)</sup> Photonen besitzen immer den Spin  $|\vec{s}| = 1\hbar$ . Aufgrund der Drehimpuls-Erhaltung muss sich bei einem Übergang mit Emission bzw. Absorption eines Photons stets mindestens eine Drehimpulsquantenzahl (Bahn oder Spin) um wenigstens ein Plancksches Wirkungsquant ändern. Bei einer Änderung um genau  $1\hbar$  spricht man von Dipolübergängen. Prinzipiell sind auch Übergänge höherer Multipolordnung möglich. In diesem Fall besitzt das Photon zu seinem Spin noch einen von Null verschiedenen Bahndrehimpuls  $\vec{l}$ .  $\vec{s}$  und  $\vec{l}$  addieren sich dann zum Gesamtdrehimpuls  $\vec{j}$  (mit der Quantenzahl  $j$ ). Da allerdings die Übergangswahrscheinlichkeit  $W$  proportional zu  $(\text{Kernradius}/\lambda)^{2j}$  skaliert,<sup>[177, S.95f]</sup> treten fast ausschließlich Übergänge mit dem niedrigst-möglichen  $j$  auf. Für einen Deuterium-Kern ist  $W$  für Quadrupolübergänge ungefähr  $10^{-30}$  mal kleiner als für Dipolstrahlung:

$$W \propto \left( \frac{r_{\text{Deuterium}}}{\lambda} \right)^{2j} \Rightarrow \frac{W_{\text{Quadrupol}}}{W_{\text{Dipol}}} \propto \left( \frac{4,3\text{fm}}{61,4\text{MHz}/c} \right)^4 \left/ \left( \frac{4,3\text{fm}}{61,4\text{MHz}/c} \right)^2 \right. \approx 1 \cdot 10^{-30}$$

zum Ausdruck gebracht.<sup>[17]</sup> Bewegungen mit großen Korrelationszeiten ( $\tau_c \gg \tau_s$ ) beeinflussen das Spektrum kaum. Für  $^2\text{H}$ -Spektren ist  $\tau_s \approx 4 \cdot 10^{-6}\text{s}$ .

Durch die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der verschiedenen Deuteronen ist es nicht möglich einen einheitlichen Spektrenmittelpunkt zu definieren. In Abbildung 2.2b) ist als Beispiel dafür das  $\text{D}_2\text{O}$ -Splitting eines Festkörper-NMR-Spektrums dargestellt, bei dem die Spektrenmitte durch das  $\Delta\nu_Q$  der  $\text{C}_3$ -Deuteronen des Ketten-perdeutერიerten Sphingomyelin- $\text{d}_{31}$  festgelegt wurde.

### 2.1.3 Ordnungsparameter

Sobald schnelle molekulare Bewegungen vorherrschen, wie es bei Lipidmembranen im flüssig-kristallinen Zustand der Fall ist, kann nur noch ein zeitliches Mittel für die Winkel  $\alpha$  und  $\beta$  und damit auch für  $\Delta\nu_Q$  beobachtet werden

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} \left( \overline{3\cos^2\beta - 1} + \eta \overline{\sin^2\beta \cos 2\alpha} \right). \quad (2.14)$$

Die mittlere Verweildauer der Acylketten in einer bestimmten Konformation liegt in der Größenordnung von  $10^{-10}\text{s}$ .<sup>[60]</sup> Die sterischen Fluktuationen besitzen somit eine wesentlich kürzere Zeitskala als die Deuterium-Resonanz-Frequenzen ( $\approx 10^7\text{Hz}$ ).

Als Maß für den Grad der Fluktuationen findet üblicherweise das Konzept der Ordnungsparameter Anwendung.<sup>[60]</sup> Die entsprechenden Größen definieren sich wie folgt

$$S_{ii} = \frac{1}{2} \left( \overline{3\cos^2\theta_i} - 1 \right), \quad (i = 1, 2, 3 = x', y', z'). \quad (2.15)$$

$\overline{\cos^2\theta_i}$  gibt den zeitlichen Mittelwert der Winkelfluktuationen der  $i$ -ten Koordinatenachse des EFG-Tensor-Hauptachsensystems hinsichtlich der Membran-Flächennormalen  $\bar{n}$  an, die auch als *Direktorachse* bezeichnet wird.

Ist der EFG-Tensor  $\bar{V}\bar{E}$  symmetrisch zur intramolekularen Bindungsachse ( $\eta \ll 1$ ), reduziert sich die Beschreibung der Fluktuationen auf einen Ordnungsparameter. Das trifft für C–D-Bindungen mit  $\eta \approx 0,05$  zu,<sup>[178 - 182]</sup> weshalb für den Ordnungsparameter  $S_{\text{CD}}$  gilt

$$S_{\text{CD}} = \frac{1}{2} \left( \overline{3\cos^2\beta'} - 1 \right). \quad (2.16)$$

In Gl. (2.16) ist  $\beta'$  der Winkel zwischen der C–D-Bindungsachse und der Bilayer-normalen. Gleichzeitig kann der Asymmetrieterm in Gl. (2.14) vernachlässigt werden. Gl. (2.14) schreibt sich somit für den Fall, dass  $\bar{n}$  parallel zu  $\bar{B}_0$  steht, als

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2qQ}{h} S_{CD}. \quad (2.17)$$

$S_{CD}$  ist charakteristisch für jedes Segment bzw. jede C–D-Bindung einer Alkylkette. Die möglichen Werte für  $S_{CD}$  bewegen sich zwischen 1 und  $-1/2$ , wobei der Wert 1 einer parallelen Orientierung der C–D-Bindung zu  $\bar{n}$  entspricht, und  $-1/2$  einer vertikalen Ausrichtung bzgl.  $\bar{n}$  entspricht.

Bildet  $\bar{n}$  mit  $\bar{B}_0$  den Winkel  $\vartheta$  (s. Abb. 2.3), ist unter der Voraussetzung von  $\eta \approx 0$  in Gleichung (2.17) ein zweites Legendre-Polynom hinzuzufügen

$$\begin{aligned} \Delta\nu_Q &= \frac{3}{4} \frac{e^2qQ}{h} S_{CD} (3\cos^2\vartheta - 1) \\ &= \frac{3}{4} \chi \cdot S_{CD} (3\cos^2\vartheta - 1). \end{aligned} \quad (2.18)$$

Der zusätzliche Term in (2.18) geht aus einer Transformation des EFG-Tensors vom molekülfesten Hauptachsensystem in das Koordinatensystem mit  $\bar{n}$  als der z-Achse hervor und nachfolgendem Übergang von diesem zum Laborsystem, in dem jetzt  $\bar{B}_0$  die Richtung der z-Achse festlegt.<sup>[60]</sup>

Aus den Spektren ist das Vorzeichen von  $S_{CD}$  nicht ersichtlich. Allerdings lässt sich für Lipid-Bilayer aus geometrischen Überlegungen folgern, dass  $S_{CD}$  negativ ist.<sup>[60]</sup>

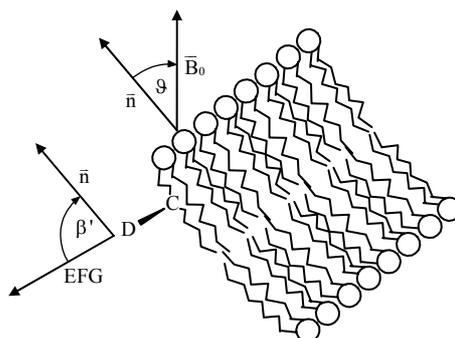


Abbildung 2.2: Schnitt durch einen Teil einer Lipid-Doppelschicht. Der EFG-Tensor schließt mit der Flächennormalen  $\bar{n}$  den Winkel  $\beta'$  ein.<sup>[11]</sup> Die Membranorientierung bzgl.  $\bar{B}_0$  definiert sich durch  $\vartheta$ .

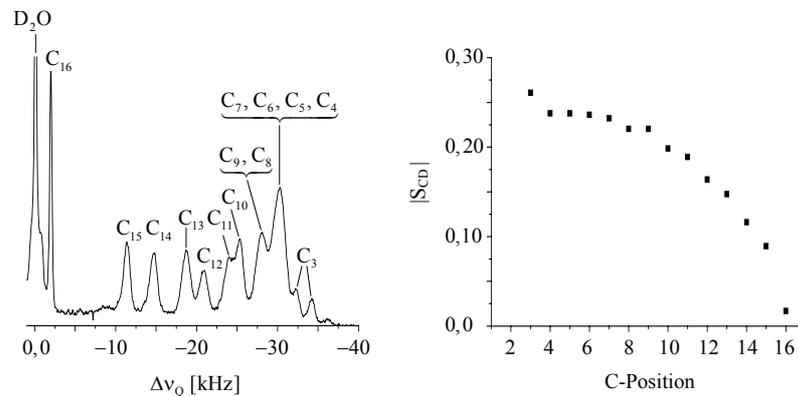
<sup>11</sup> Für die C–D-Bindung in einer Methylgruppe beträgt  $\beta'$  gewöhnlich  $109,5^\circ$ .<sup>[172]</sup>

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird daher immer der Absolutwert  $|S_{CD}|$  angegeben. Das Maximum liegt für Kohlenwasserstoffketten bei 0,5; das entspricht einer *all-trans*-Konformation. Mit zunehmender Beweglichkeit der Ketten nimmt  $|S_{CD}|$  ab.

Die anisotrope Reorientierung der Moleküle geschieht in orientierten Phospholipidmembranen durch laterale Diffusion und durch Rotations-Bewegungen auf einer Zeitskala, die deutlich kleiner ist als  $\Delta\nu_Q^{-1}$ .

#### Ordnungsparameterprofil

Aus den Quadrupolspaltungen deuterierter Lipidketten kann nach Gl. (2.17) ein Ordnungsparameterprofil, wie es in Abb. 2.4b) dargestellt ist, erstellt werden. Bei der Zuordnung der Quadrupolspaltungen  $\Delta\nu_Q$  zu den verschiedenen Kettenpositionen wird von der Annahme ausgegangen, dass der Ordnungsparameter entlang der Alkylkette kontinuierlich abnimmt.<sup>[183]</sup>



a) Rechte  $^2\text{H}$ -NMR-Spektrenhälfte mit Zuordnung der terminalen Methylgruppe sowie der übrigen Methylengruppen zu den Resonanzen.

b) Ordnungsparameterprofil

Abbildung 2.4: Resonanzzuordnung mit zugehörigem Ordnungsparameterprofil von N-Perdeutero-Palmitoyl-( $\text{d}_{31}$ )-Sphingomyelin ( $\text{PSMd}_{31}$ ) in voll hydratisierten Membranen ( $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O} = 1/20$ ;  $\vartheta = 0^\circ$ ,  $T = 60^\circ\text{C}$ ).

Für die Zuordnung der Lipid-Deuteronen zu den einzelnen Resonanzen werden üblicherweise die Resonanz-Integralverhältnisse mit herangezogen. Allerdings treten teilweise erhebliche Zuordnungs-Schwierigkeiten auf, die sich auf mehrere Ursachen zurückführen lassen:

- Mit zunehmendem Abstand der Signale von der Anregungsfrequenz  $\nu_0$  nehmen die Intensitäten wegen der endlichen Breite des Anregungssignals mehr und mehr ab, so dass die äußeren Resonanzen nur noch zu ca. 90% angeregt werden (siehe Kapitel 2.1.7).
- Bei Deuterierung der N-Acykette des Sphingomyelins bzw. der sn-2-Kette der Glycerophospholipide kommt es infolge der Biegung am Kettenanfang beim C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Atom zu einer sterisch bedingten Inäquivalenz der <sup>2</sup>H-Kerne und zu einer Verschiebung der <sup>2</sup>H(C<sub>2</sub>)-Signale mit  $\Delta\nu_Q \approx 35\text{--}54\text{kHz}$ . Dadurch treten Koaleszenzen zwischen den <sup>2</sup>H(C<sub>2</sub>)-Resonanzen und anderen Methylengruppen-Signalen auf.
- Bei sn-1-, sn-2-deuterten Proben (etwa dem DPPCd<sub>62</sub>) beobachtet man partielle Überlagerungen der (sn-1-C<sub>n</sub>)-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>- und (sn-2-C<sub>(n+1)</sub>)-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>-Signale die auch bereits in der Literatur beschrieben wurden.<sup>[184]</sup> Durch die Biegung der sn-2-Kette nahe der Bindung an das Glycerolgerüst sind die sn-2-C<sub>n</sub> gegenüber den sn-1-C<sub>n</sub> teilweise um bis zu eine C–C-Bindung hinsichtlich der Direktorachsen-Richtung versetzt.

Treten Zuordnungs-Schwierigkeiten auf, bietet die Beobachtung der Resonanz-Verschiebungen bei Variation der Temperatur einen möglichen Ausweg. Auf diese Weise gelang die Signalzuordnung für sämtliche Spektren.

Ordnungsparameterprofile bieten eine kompakte Möglichkeit Änderungen im Acylkettenbereich durch Variation der Membranzusammensetzung, der Hydratation oder Temperaturabhängigkeiten zu untersuchen.

## 2.1.4 Mittlere Längen, Flächen und Volumina

### *Mittlere Alkylkettenlänge*

Befindet sich eine Lipidkette in einem reinen *all-trans*-Zustand, besitzt  $|S_{CD}|$  einen Wert von 0,5 für sämtliche Kettenglieder. Die in diesem Fall auf die lange Molekülachse projizierte Länge eines Kettensegments beträgt  $l_0 = 1,25\text{Å}$ .<sup>[185]</sup> Jede Konformationsabweichung von diesem Zustand ist mit einer Verkleinerung der projizierten Kettenlänge verbunden und mit einer Abnahme von  $|S_{CD}|$ . Unter Berücksichtigung aller möglichen Orientierungen – exklusive Rückfaltungen – und der Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens kann eine Beziehung zwischen der mittleren Länge des *i*-ten Methylen-Kettensegments und dem zugehörigen Ordnungsparameter abgeleitet werden.<sup>[186,187]</sup>

$$\langle l_i \rangle = l_0 \left( \frac{1}{2} + |S_{CD}^{(i)}| \right). \quad (2.19)$$

Die Summation aller Kettensegmente einschließlich der Methylgruppe liefert die mittlere Acylkettenlänge.<sup>[183,187]</sup>

$$\langle L_C \rangle = l_0 \left[ \frac{n-m+1}{2} + \sum_{i=m}^{n-1} |S_{CD}^{(i)}| + 3 |S_{CD}^{(n)}| \right]. \quad (2.20)$$

Der Index  $i$  summiert über die einzelnen Kettensegmente.  $m$  berücksichtigt die unterschiedliche sterische Struktur der  $sn$ -1- und  $sn$ -2-Kette.<sup>[183,188]</sup> Für  $sn$ -1-Ketten wird  $m = 2$  gesetzt und für  $sn$ -2-Ketten, aufgrund ihrer Krümmung im Carbonylbe- reich,  $m = 3$ .  $n$  ist die Position des terminalen Methylkohlenstoffs  $C_n$  in der Kette.

Mittels des Diamand-Gitter-Modells,<sup>[183,187]</sup> welches den Gleichungen (2.19) und (2.20) zugrunde liegt, sollten, aufgrund der Vernachlässigung möglicher Rückfal- tungsgeometrien, (*back bending*), etwas zu lange  $\langle L_C \rangle$ -Werte erhalten werden. Ein von Petrache et al.<sup>[189]</sup> vorgeschlagenes verbessertes Modell, das zudem zwischen schnellen Bewegungsmoden, die einen starken Einfluss auf  $L_C$  ausüben, und lang- samen Bewegungen mit geringer Auswirkung auf  $L_C$  unterscheidet,<sup>[190]</sup> liefert

$$\langle l_i \rangle = l_0 \left( \frac{1}{2} + \sqrt{\frac{8 |S_{CD}^{(i)}| - 1}{12}} \right). \quad (2.21)$$

Dieses Modell ist jedoch oftmals nicht anwendbar, da der minimale Betrag eines Ordnungsparameters nicht unter 0,125 fallen darf ( $\rightarrow$  sonst werden imaginäre  $\langle l_i \rangle$ - Werte erhalten). Außerdem verringern sich die damit erhaltenen Längen  $L_C$  um ma- ximal 1,5%.<sup>[190]</sup>

#### *Kettenvolumen & mittlere Flächen*

Für eine unverzweigte Alkylkette definiert sich das Kettenvolumen als

$$V_{\text{Kette}} = n_{\text{CH}_2} V_{\text{CH}_2} + V_{\text{CH}_3}. \quad (2.22)$$

Mit  $n_{\text{CH}_2} = n - m$ ,  $V_{\text{CH}_3} \approx 2V_{\text{CH}_2}$  und  $V_{\text{CH}_2} = 28 \text{ \AA}^3$ <sup>[191]</sup> erhält man aus (2.22)

$$V_{\text{Kette}} = (n - m + 2) \cdot 28 \text{ \AA}^3. \quad (2.23)$$

Nähert man  $\langle 1/L_C \rangle$  durch  $1/\langle L_C \rangle$ , lautet die Gleichung für die mittlere Alkylket- tenfläche<sup>[185]</sup>

$$\langle A_C \rangle = \frac{V_{\text{Kette}}}{\langle L_C \rangle} = \frac{(n - m + 2) \cdot 28 \text{ \AA}^3}{\langle L_C \rangle}. \quad (2.24)$$

Im Interface-Bereich lässt sich die mittlere Fläche besser annähern, wenn man nur das  $m$ -te Kettensegment berücksichtigt:

$$\langle A' \rangle \cong \frac{V_{\text{CH}_2}}{\langle I_m \rangle} = \frac{V_{\text{CH}_2}}{I_0 \left( \frac{1}{2} + |S_{\text{CD}}^{(m)}| \right)}. \quad (2.25)$$

### Thermische Ausdehnungskoeffizienten

Der thermische Ausdehnungskoeffizient  $\alpha$  definiert sich unter isobaren Bedingungen durch

$$\alpha = \frac{1}{V} \cdot \frac{\partial V}{\partial T} \Big|_p = \alpha_{\parallel} + 2\alpha_{\perp}, \quad (2.26)$$

mit den beiden Komponenten  $\alpha_{\parallel}$  und  $\alpha_{\perp}$ , zur Erfassung der parallelen und senkrechten Membranexpansion bezogen auf die Bilayernormale  $\bar{n}$ . Diese Koeffizienten werden aus der Temperaturabhängigkeit von  $L_C$  und  $A_C$  abgeleitet<sup>[192,193]</sup>

$$\alpha_{\parallel} = \frac{1}{\langle L_C \rangle} \cdot \frac{\partial \langle L_C \rangle}{\partial T} \Big|_p = \frac{\partial \ln \langle L_C \rangle}{\partial T} \Big|_p, \quad (2.27)$$

$$\alpha_{\perp} = \frac{1}{2 \langle A_C \rangle} \cdot \frac{\partial \langle A_C \rangle}{\partial T} \Big|_p = \frac{1}{2} \frac{\partial \ln \langle A_C \rangle}{\partial T} \Big|_p. \quad (2.28)$$

Unter der Annahme der Inkompressibilität einer Membran erhält man für  $\alpha_{\parallel}$  und  $\alpha_{\perp}$  die Relation  $\alpha_{\parallel} = -2\alpha_{\perp}$ .

### 2.1.5 Spektralmomente

Die Resonanzen perdeuterierter Lipide in  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren sind normalerweise nicht vollständig aufgelöst. Das gilt insbesondere für Membranschichten, die sich in einer geordneten Phase befinden. In diesem Fall bieten die Momente eines Spektrums ein nützliches Analysewerkzeug, mittels dessen eine Ableitung der mittleren Ordnungsparameter möglich ist.

Eine allgemeine Darstellung des Zusammenhangs zwischen einer beliebigen Größe  $x$ , der zu der Verteilungsfunktion von  $x$  gehörigen charakteristischen Funktion  $f(\xi)$  und den Momenten der Verteilungsfunktion  $F(x)$ , findet sich in knapper Form in Anhang I.

Sei  $\omega_0$  die Larmorfrequenz, dann kann das  $n$ -te absolute Moment eines Spektrums  $F(\omega)$  definiert werden als<sup>[22,194]</sup>

$$M_n = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} |\omega - \omega_0|^n F(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) d\omega} . \quad (2.29)$$

In der Festkörper-NMR-Spektroskopie werden die  $M_n$  auch als Spektralmomente bezeichnet. Das 1. Moment,  $M_1$ , repräsentiert den Mittelwert  $\langle \Delta\omega \rangle = \langle |\omega - \omega_0| \rangle$  des zu  $\omega_0$  (nahezu) symmetrischen Spektrums. Prinzipiell ist die Kenntnis sämtlicher Momente identisch mit der Kenntnis des zu  $F(\omega)$  gehörigen FID  $f(t)$  (vgl. Anhang I, Gleichung (I.4))<sup>[195]</sup>

$$f(t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{(2n)!} M_{2n} t^{2n} . \quad (2.30)$$

Infolge der Spektrensymmetrie verschwinden in (2.30) die ungeraden Momente für das volle Spektrum! Üblicherweise werden die Momente von Membransystemen jedoch separat für die beiden Spektrenhälften berechnet und nicht für das gesamte Spektrum, womit man  $M_1$ -Werte größer als Null erhält. Aus  $M_1$  und  $M_2$  berechnet sich der mittlere Ordnungsparameter  $\langle |S_{CD}| \rangle$  sowie  $\langle |S_{CD}|^2 \rangle$  über<sup>[194]</sup>

$$M_1 = \frac{4\pi}{3\sqrt{3}} \langle \Delta\nu_Q \rangle = \frac{\pi}{\sqrt{3}} \chi \langle |S_{CD}| \rangle , \quad (2.31)$$

$$M_2 = \frac{4\pi^2}{5} \langle \Delta\nu_Q^2 \rangle = \frac{9\pi^2}{20} \chi^2 \langle |S_{CD}|^2 \rangle . \quad (2.32)$$

Als Maß für die Breite der Ordnungsparameter-Verteilung dient die mittlere quadratische Abweichung  $\Delta_2$

$$\Delta_2 = \frac{\langle |S_{CD}|^2 \rangle - \langle |S_{CD}| \rangle^2}{\langle |S_{CD}| \rangle^2} = \frac{M_2}{\frac{27}{20} M_1^2} - 1 . \quad (2.33)$$

Mittels der Spektralmomente können beispielsweise bei Temperaturscans oder Dehydratisierungsprozessen Übergänge von der  $L_\alpha$ - in die  $L_\beta$ -Phase und umgekehrt identifiziert werden.<sup>[196,197]</sup> Treten im Phasenübergangsbereich zudem partiell Domänen auf, so dass  $L_\alpha$ - und  $L_\beta$ -Phasen nebeneinander koexistieren, ist die Verteilung der  $|S_{CD}^{(i)}|$  (Kap. 2.1.4) besonders groß. Folglich sollte auch  $\Delta_2$  ein Maximum durchlaufen.

Zur Berechnung der Spektralmomente wurde eine VBA-Routine geschrieben (Excel XP). Da die einzelnen spektralen Komponenten leicht unterschiedliche chemische

Verschiebungen besitzen, lässt sich kein allgemein gültiger Spektrenursprung definieren. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen und evtl. leichte Phasenverschiebungen auszugleichen, werden dabei die Momente für die linke bzw. rechte Spektrenhälfte jeweils separat berechnet. Im Anschluss daran erfolgt eine Mittelwertbildung mit Kalkulation der zugehörigen Standardabweichungen  $\sigma$ .

### 2.1.6 Bloch-Gleichungen & Relaxation

#### *Relaxationszeiten*

Die Bestimmung der Ordnungsparameter dient der Charakterisierung statischer Eigenschaften von Membranen. Wegen der kurzen Lebensdauer einer Konformation ( $10^{-10}$ s; s. Abb. 2.6), verglichen mit  $\Delta\nu_Q (\leq 10^8 \text{Hz})$ , werden nur Informationen einer mittleren Kettengeometrie erhalten. Da man stets makroskopische Proben untersucht, erfolgt zusätzlich noch eine Ensemblemittelung.

Informationen über die Dynamik eines Systems können dagegen aus Messungen der Relaxationszeiten gewonnen werden. Die im thermischen Gleichgewicht vorliegende makroskopische Magnetisierung  $\bar{M}_0$  eines Ensembles von Kernspins, das sich in einem externen Magnetfeld  $\bar{B}_0$  (mit  $\bar{B}_0 = B_0 \bar{e}_z$ ) befindet, relaxiert nach einer Auslenkung aus dem Gleichgewichtszustand wieder in diesen zurück. Mathematisch lässt sich der Vorgang mittels einer Differentialgleichung beschreiben, die für gewöhnlich als *Blochsche Gleichung* bezeichnet wird <sup>[175]</sup>

$$\frac{d\bar{M}}{dt} = \gamma \bar{M} \times \bar{B}_0 - \begin{pmatrix} \frac{1}{T_2} M_x \\ \frac{1}{T_2} M_y \\ \frac{1}{T_1} (M_z - M_0) \end{pmatrix}. \quad (2.34)$$

Der erste Term in (2.34) beschreibt die *kohärente Spinbewegung*, falls  $\bar{M}$  nicht parallel zu  $\bar{B}_0$  steht. Der zweite Term erfasst den Kohärenzzerfall mit fortschreitender Zeit. Da bei einer Präzession von  $\bar{M}$  um  $\bar{B}_0$  die z-Achse immer eine Symmetrieachse darstellt, sind die Relaxationszeiten für  $M_x$  und  $M_y$  identisch.

Aufgrund der geringfügigen Differenzen der lokalen Magnetfelder an den einzelnen Kernorten besitzen die magnetischen Kerndipole nach Gl. (2.6) auch verschiedene Präzessionsfrequenzen, so dass  $M_x$  und  $M_y$  durch Verlust der Phasenkohärenz zerfallen. Beide Magnetisierungskomponenten stehen senkrecht zu  $\bar{M}_0$ , weshalb man diese *Spin-Spin-Relaxation* auch als *transversale Relaxation* bezeichnet. Da das Spin-

system dabei keine Wärme an seine Umgebung abgibt, d.h.  $dQ = 0$  ist, bezeichnet man die Spin-Spin-Relaxation auch als *adiabatischen* Prozess.

Kerne in einer makroskopischen Probe wechselwirken immer mit ihrer Umgebung, intra- und intermolekular. Unterscheidet sich die Besetzung der Freiheitsgrade in der Probe von derjenigen für das thermische Gleichgewicht, kommt es durch Austausch von Energiequanten zwischen dem aus dem Gleichgewicht gebrachten Kernspin-System und dem sie umgebenden atomaren Gitter zu einer *nicht-adiabatischen* Relaxation<sup>[198]</sup> zurück in den Gleichgewichtszustand, was gleichbedeutend ist mit einer parallelen Ausrichtung von  $\bar{M}$  zu  $\bar{B}_0$ . Daher spricht man bei der *Spin-Gitter-Relaxation* auch von *longitudinaler Relaxation*.

Die Zeitskalen, auf denen die adiabatische bzw. die nicht-adiabatische Relaxation stattfindet, werden durch  $T_1$  und  $T_2$  unterschieden. Diese Relaxationszeiten sind anschaulich gesprochen die „Halbwertszeiten“ für den „Zerfall“ der Magnetisierung zurück in den thermischen Gleichgewichtszustand. Da sich  $\bar{M}$  ohne Verlust der transversalen Magnetisierung  $M_{\perp}$  nicht parallel zu  $\bar{B}_0$  ausrichten kann, bildet  $T_2$  eine untere Grenze für  $T_1$  ( $T_2 \leq T_1$ ).

NMR-Messungen von Kernen mit endlichem Quadrupolmoment unterliegen zwei longitudinalen Relaxations-Mechanismen. Der erste beruht auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung eines Kerns mit seinen Nachbarkernen (*Zeeman-Relaxation*). Die dafür relevante Zeitskala definiert sich durch  $T_{1,Z}$ . Der zweite Mechanismus basiert auf der Quadrupol-Wechselwirkung des Quadrupolensors mit EFG-Tensoren benachbarter Kerne. Die Geschwindigkeit der *quadrupolaren Relaxation* wird durch  $T_{1,Q}$  bestimmt.

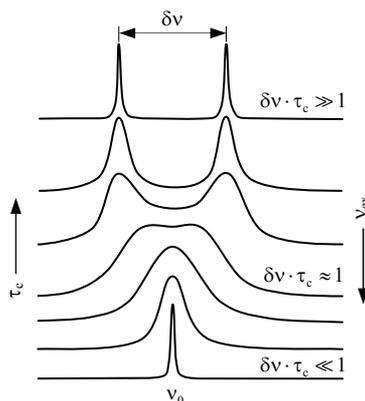
#### *NMR-Zeitskalen*

Als Maß für die mittlere Verweildauer eines Moleküls oder einer gesamten Membran in einer bestimmten Konformation, dient die Korrelationszeit  $\tau_c$ . Für ein System, das sich in zwei Zuständen unterschiedlicher Energie befinden kann und zwischen diesen mit der Austauschrate  $\nu_{ex} = \tau_c^{-1}$  wechselt, erhält man den in Abb. 2.5 dargestellten Spektrenverlauf in Abhängigkeit von der Lebensdauer der Zustände.

Ein anderer Punkt betrifft die klassische Zeit-Frequenz-Unschärfe. Sie besagt, dass zwei Zustände mit dem Frequenzabstand  $\delta\nu$  nur dann unterscheidbar sind, wenn für die Lebensdauer  $\tau_c$  eines Zustandes (ebenso wie für die Messzeit) gilt

$$\tau_c \geq \frac{1}{\delta\nu} = \tau_s . \quad (2.35)$$

In Gleichung (2.35) bezeichnet  $\tau_s$  wieder die spektroskopische Zeitskala (vgl. Kap. 2.1.2, S. 39),<sup>[199,200]</sup> die in der Festkörper-NMR-Spektroskopie häufig Anwendung

Abbildung 2.5: Austausch- bzw. Bewegungsverschmälerung als Funktion von  $\tau_c$ 

findet. Ist die Korrelationszeit kleiner als  $\tau_s$ , können die beiden Zustände nicht aufgelöst werden; es erscheint im Spektrum statt zweier scharfer Signale eine verbreiterte Resonanz. Kann ein System zwischen mehr als zwei Konformationen wechseln, definiert sich  $\tau_s$  durch den Winkelfrequenzbereich  $\Delta\omega$  innerhalb dessen die Spektrallinien einer Resonanz für verschiedene molekulare Zustände auftreten.  $\Delta\omega$  seinerseits kann durch das zweite Spektralmoment ausgedrückt werden. Es gilt<sup>[194]</sup>

$$\tau_s \approx \frac{1}{\Delta\omega} = \frac{1}{\sqrt{M_2}}. \quad (2.36)$$

In Lipidmembran-Systemen treten verschiedene Bewegungsmoden mit jeweils spezifischen Korrelationszeiten auf. Eine Zusammenfassung der respektiven Zeitskalen findet sich in Abb. 2.6. Es lassen sich mehrere Zeitfenster für die Messung von Zeeman-Resonanzen unterscheiden:

1.  $\tau_c \gg \tau_s$  – *langsame adiabatische Zustandsänderungen*  
Die mittlere Lebensdauer der Zustände ist deutlich größer als der reziproke Frequenzabstand der jeweiligen Resonanzen. Daher ist das Spektrum mit einer Breite von  $\Delta\omega$  eine gewichtete Superposition der Spektrallinien der einzelnen, dieses Korrelations-Zeitfenster bestimmenden intermolekularen Konformationen.
2.  $\tau_c \ll \tau_s$  ( $\omega_0\tau_c \gg 1$ ) – *schnelle adiabatische Zustandsänderungen*  
Es kommt zu Bewegungsmittelungen aufgrund von Lipidrotationen und inter- wie intramolekularen Konformationsänderungen.<sup>[202]</sup> Infolge dessen enthält das Spektrum bereits gemittelte Resonanzen mit Linienverschmälerung. Gleichzeitig geht mit kürzer werdendem  $\tau_c$  die Spin-Spin-Korrelation schnell-

ler verloren, was sich in einer Verringerung der Relaxationszeiten bemerkbar macht.

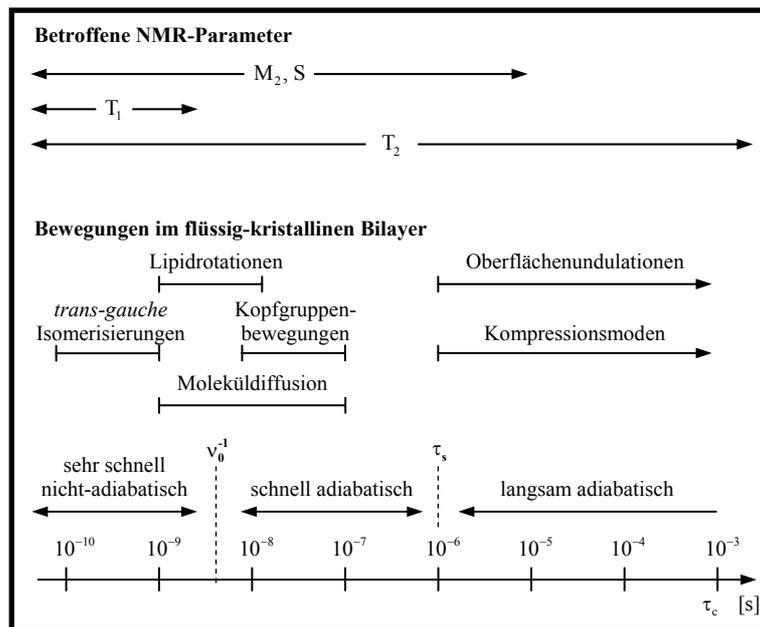


Abbildung 2.6: Zeitbereiche von Membranbewegungen in der  $L_\alpha$ -Phase, die mittels NMR zugänglich sind; nach [195]. Die genauen Grenzen der Bewegungsmoden hängen von der Magnetfeldstärke und von der Membranzusammensetzung, d.h. von  $\tau_s$  ab. Die spektroskopische Zeitskala  $\tau_s$  wurde hier mit  $10^{-6}$ s angenommen. Das Zeitfenster, innerhalb dessen  $T_1$ -Relaxationsprozesse stattfinden, bezeichnet man als nicht-adiabatisch (s. Text – *Relaxationszeiten*).  $\nu_0$  ist die  $^2\text{H}$ -Anregungsfrequenz für  $B_0 = 9,36\text{T}$ .

### 3. $\omega_0 \tau_c \approx 1$

Nähert sich  $\tau_c^{-1}$  der Frequenz  $\nu_0$ , verschmieren die Zeeman-Zustände mehr und mehr und die Relaxationszeiten erreichen ihren Minimalwert (vgl. Abb. 2.7b)). Lipidrotationen um die Direktorachse mit  $\tau_c \approx 10^{-9}$ – $10^{-8}\text{s}$ <sup>[202]</sup> ebenso

wie laterale molekulare Diffusionsprozesse<sup>12)</sup> fallen typischerweise in diesen Zeitbereich.

#### 4. $\omega_0\tau_c \ll 1$

Die  $\tau_c$ -Skala dieses nicht-adiabatischen Zeitbereichs<sup>[198]</sup> wird von *trans-gauche*-Isomerisierungen<sup>13)</sup> der Alkylkettensegmente bestimmt mit typischen Korrelationszeiten von  $10^{-10}$ – $10^{-9}$ s. Da mit kürzer werdendem  $\tau_c$  wieder schärfere Zeeman-Zustände auftreten, erscheinen im Spektrum verschmälerte Resonanzen. Gleichzeitig nehmen die Relaxationszeiten zu.

Die tatsächlich für Membranen zu beobachtenden Relaxationszeiten hängen davon ab, welche Bewegungsmoden in einer Probe dominieren.

#### Spektraldichten

Reale Proben weisen nicht nur eine einzige mittlere Korrelationszeit  $\tau_c$  auf. Vielmehr existiert innerhalb eines gewissen Zeitfensters ein Spektrum von Korrelationszeiten, das über eine Korrelationsfunktion  $K(\tau)$  beschrieben werden kann. Die Fouriertransformierte von  $K(\tau)$  ist die Spektraldichtefunktion  $J(\omega)$ <sup>[203]</sup>

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} K(\tau) \cdot e^{i\omega\tau} d\tau . \quad (2.37)$$

Es kann gezeigt werden, dass ein sinnvoller Ansatz für die Korrelationsfunktion durch  $K(\tau) = K(0) \cdot \exp(-\tau/\tau_c)$  gegeben ist.<sup>[204]</sup> Dann sind  $J(\omega)$  und die mittlere Korrelationszeit  $\tau_c$  durch folgende Relation miteinander verknüpft<sup>[203]</sup>

$$J(\omega) \propto \frac{\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} . \quad (2.38)$$

Beim Übergang vom flüssigkristallinen Zustand in die Gelphase nimmt  $\tau_c$  zu. Als Folge davon sinkt die Spektraldichte im hochfrequenten Bereich (siehe Abb. 2.7a). In Abb. 2.7b) ist der Zusammenhang zwischen  $\tau_c$  und der Relaxationszeit  $T_{1,z}$  gra-

<sup>12)</sup> Die Zeitskala, auf der Diffusionsprozesse einen Einfluss auf  $\tau_c$  besitzen, lässt sich unter Verwendung der Gleichung  $d_{\text{diff}} \approx \sqrt{6Dt_{\text{diff}}}$  berechnen, wobei die Diffusionskonstante  $D$  für Bewegungen parallel zur Membranoberfläche ungefähr  $4 \cdot 10^{-12} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$  beträgt.<sup>[195]</sup> Nimmt man ferner an, dass eine Molekül-Verschiebung  $d_{\text{diff}}$  um den lateralen Lipiddurchmesser, der ungefähr  $5\text{--}10 \text{\AA}$  beträgt, eine andere Konformation bedingt, kommt man auf eine Diffusions- und damit auch Korrelationszeit von  $\approx 1 \cdot 10^{-8}$ s.

<sup>13)</sup> Diese Konformationsübergänge beziehen sich auf Rotationen um die C–C-Bindungsachsen.

fisch dargestellt. Aufgrund von Gleichung (2.38) wandert das Minimum in Abb. 2.7b) mit zunehmender Feldstärke zu immer kleineren Korrelationszeiten.

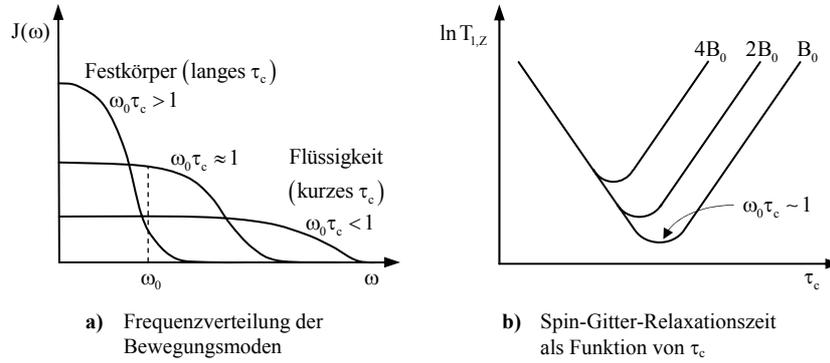


Abbildung 2.7: Spektraldichte-Verteilung und transversale Relaxationszeit  $T_{1,z}$  in Abhängigkeit von  $\tau_c$ .

Aus der Bestimmung von  $T_{1,z}$  sowie aus dem Abfall der quadrupolaren Ordnung  $T_{1,Q}$  und dem Zerfall der Spin-Spin-Kohärenz  $T_2$  können für Kerne mit einem endlichen Quadrupolmoment die spektralen Dichten  $J(\omega_0)$  über die folgenden Gleichungen bestimmt werden <sup>[196,205]</sup>

$$\frac{1}{T_{1,z}} = \frac{3}{4} \pi^2 \chi^2 (J_1(\omega_0) + 4J_2(2\omega_0)), \quad (2.39)$$

$$\frac{1}{T_{1,Q}} = \frac{9}{4} \pi^2 \chi^2 J_1(\omega_0), \quad (2.40)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{8} \pi^2 \chi^2 (3J_0(0) + 3J_1(\omega_0) + 2J_2(2\omega_0)). \quad (2.41)$$

Die Gleichungen wurden aus der isotropen Rotationsdiffusion um die lange Lipidachse abgeleitet mit der Bedingung  $\tau_c \ll T_1, T_2$ , was bei Membranen i.a. erfüllt ist. Die Gleichungen (2.39) bis (2.41) gießen den bereits weiter oben angedeuteten Zusammenhang zwischen  $T_1$  und  $T_2$  in eine mathematische Form. Die Zeeman- und quadrupolare Zerfallszeit werden von schnellen Bewegungen bestimmt (Beiträge von  $J_1(\omega_0)$  und  $J_2(2\omega_0)$ ), wohingegen die transversale Relaxation sowohl Anteile langsamer ( $J_0(0)$ ) als auch schneller Bewegungsmoden enthält  $\Rightarrow T_2 \leq T_1$ .

In Lipidmembranen oder allgemeiner in Festkörpern beobachtet man stets  $T_2 \ll T_1$ , was bedeutet, dass sehr langsame Bewegungen existieren müssen mit  $\omega_0 \tau_c \gg 1$ .<sup>[198]</sup> In Flüssigkeiten wird wegen der hohen Molekülbeweglichkeit und dem damit verknüpften kurzen  $\tau_c$  die statische Komponente ausgemittelt ( $J(0) \propto \tau_c$ , s. Gl. (2.38)). Daher gilt in liquiden Medien:  $T_2 \approx T_1$  (*extreme motional narrowing*).

## 2.2 Spektroskopie molekularer optischer Aktivität

Die Erforschung der Faltung von Proteinen ist eines der zentralen Themen der heutigen Biowissenschaft. Die dafür zu Verfügung stehenden Methoden reichen u.a. von hochauflösender mehrdimensionaler NMR, über Röntgenstreu-Experimente an kristallisierten Protein-Festkörpern bis hin zu Circular Dichroismus (CD) Messungen von Proteinen in Lösung.

CD-Spektren von Proteinen und Peptiden werden für gewöhnlich im nahen und fernem UV-Bereich gemessen (300–175nm). Der Wellenlängenbereich wird durch das von der verwendeten UV-Lampe erzeugte Frequenzspektrum limitiert. Zudem kann die Aufnahme von CD-Spektren im fernem UV-Bereich durch Absorption des Lösungsmittels zusätzlich eingeschränkt sein. Abhängig von der vorhandenen Salzkonzentration sind CD-Messungen teilweise nur bis 210nm möglich, wie es beispielsweise bei einer 20mM Phosphat-Lösung der Fall ist.

Seit einigen Jahren werden CD-Messungen auch mit Synchrotron-Strahlungsquellen (*synchrotron radiation circular dichroism* – *SRCD*) durchgeführt.<sup>[206]</sup> Damit können Spektren bis unterhalb von 160nm gemessen werden (die derzeitige absolute untere Schwelle liegt bei 120–130nm). Gerade im fernem und ultrafernen UV-Bereich unterscheiden sich Spektren verschiedener Sekundärstruktur-Klassen, wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, usw., sehr viel stärker als oberhalb von 200nm. Aus diesem Grund erlauben SRCD-Messungen eine wesentlich zuverlässigere Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen.

### 2.2.1 Circular Dichroismus – Optische Rotationsdispersion

Beim Einfall von Licht in eine mit Lösung gefüllte Zelle folgt die durch Absorption verursachte Abnahme der Intensität in Abhängigkeit von der Länge  $d$  des Lichtweges in der Lösung dem *Lambert-Beer*-Gesetz

$$I(\lambda, d) = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d}. \quad (2.42)$$

$I_0$  ist die Lichtintensität vor dem Eindringen in die Probe,  $c$  die Molekülkonzentration und  $\varepsilon(\lambda)$  der molare dekadische Absorptionskoeffizient, der auch als Extinktionskoeffizient bezeichnet wird, in Einheiten von  $\text{Liter} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Optisch aktive Medien zeichnen sich durch unterschiedliche Brechungsindizes für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht aus ( $n_L \neq n_R \Rightarrow v_L(\text{Licht}) \neq v_R(\text{Licht})$ ). Linear polarisiertes Licht erfährt dadurch während der Durchdringung der Probe eine Drehung seiner Polarisationssebene um den Winkel  $\alpha(\lambda)$  mit

$$\alpha(\lambda) = \frac{\pi d}{\lambda} (n_L - n_R), \quad [\text{Radiant}]. \quad (2.43)$$

$(n_L - n_R)$  wird als *zirkulare Doppelbrechung* bezeichnet und  $\alpha(\lambda)$  als *optische Rotationsdispersion* (ORD). Die in (2.43) enthaltene hyperbolische Wellenlängen-Abhängigkeit von  $\alpha(\lambda)$  (s. Abb. 2.8) nennt man den *normalen ORD*.

Für absorbierende, optisch aktive Medien folgt aus der verallgemeinerten Maxwell Relation

$$\bar{n} = \sqrt{\varepsilon_r \mu_r} = n + i\gamma, \quad (2.44)$$

dass bei  $n_L \neq n_R$  ebenso der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon = \gamma/\ln 10$  polarisationsabhängig ist, d.h.  $\varepsilon_L \neq \varepsilon_R$ . Unterschiedliche Brechung von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht impliziert somit auch eine unterschiedliche Absorption der beiden zirkularen Komponenten elektromagnetischer Wellen. In Gl. (2.44) ist  $\bar{n}$  der komplexe Brechungsindex und  $n$  der verallgemeinerte Brechungsindex (= Realteil von  $\bar{n}$ ). Die Differenz zwischen den Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_L$  und  $\varepsilon_R$  für links- bzw. rechts-zirkular polarisiertes Licht

$$\Delta\varepsilon(\lambda) = \varepsilon_L - \varepsilon_R, \quad \left[ \frac{\text{Liter}}{\text{Mol} \cdot \text{cm}} \right], \quad (2.45)$$

bezeichnet man als *Circular Dichroismus* (CD).  $\Delta\varepsilon$  ist nur in Gegenden von Absorptionsbanden ungleich Null und selbst dann immer noch um 3 bis 5 Größenordnungen kleiner als  $\varepsilon_L$  bzw.  $\varepsilon_R$ , deren Werte im Bereich von  $10^4$ – $10^5$  Liter·Mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> liegen.

Für  $\Delta\varepsilon_\lambda \neq 0$  wird der normale ORD von einem zusätzlichen, dem *anormalen ORD-Effekt* überlagert, wie in Abb. 2.8 dargestellt. Sowohl den CD-, als auch den ORD-Effekt bezeichnet man als *Cotton-Effekt*. Abhängig davon, ob  $\Delta\varepsilon(\lambda)$  größer oder kleiner Null ist, spricht man von *negativem* ( $\Delta\varepsilon < 0$ ) bzw. *positivem* ( $\Delta\varepsilon > 0$ ) *Cotton-Effekt*.

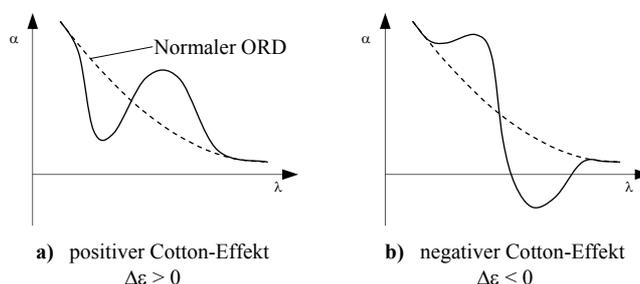


Abbildung 2.8: Optische Rotation in der Nähe einer Absorptionsbande. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Verlauf des normalen ORD; durchgezogen sind die anomalen ORD-Verläufe.

Aufgrund der unterschiedlich großen Absorption von links- bzw. rechts-zirkular polarisiertem Licht in optisch aktiven Medien, sind die Amplituden  $E_L$ ,  $E_R$ ,  $H_L$  und  $H_R$  des  $\vec{E}$ - bzw.  $\vec{H}$ -Feldes einer einfallenden elektromagnetischen Welle (em-Welle) nach Durchlaufen der Probe verschieden ( $E_L \neq E_R$ ,  $H_L \neq H_R$ ). Daher ist eine anfänglich linear polarisierte em-Welle beim Verlassen der Probe elliptisch polarisiert (s. Abb. 2.9a)). Da gleichzeitig die Ausbreitungsgeschwindigkeiten  $v_L$  und  $v_R$  der zirkularen Lichtkomponenten unterschiedlich sind, dreht sich zusätzlich die Polarisations-ebene um den Winkel  $\alpha$  (s. Abb. 2.9b)).

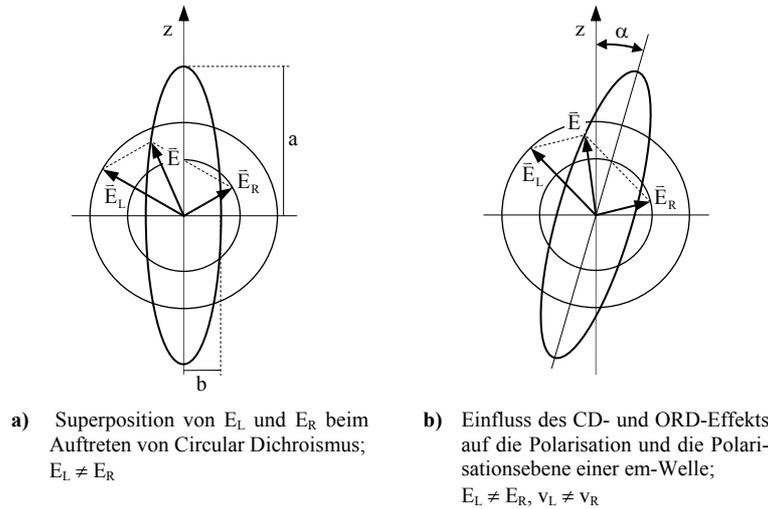


Abbildung 2.9:  $\vec{E}$ -Feld-Vektor einer elliptisch polarisierten em-Welle mit Darstellung der optischen Rotation  $\alpha$ .

Die durch  $E_L \neq E_R$  verursachte *Elliptizität*  $\Psi$  einer zuvor linear polarisierten em-Welle dient als Messgröße in der Circular Dichroismus Spektroskopie

$$\frac{|E_L - E_R|}{E_L + E_R} = \frac{b}{a} = \tan \Psi \cong \Psi, \quad \text{für } \Psi \ll 1, \quad [\text{mGrad}]. \quad (2.46)$$

$a$  und  $b$  sind die lange und die kurze Halbachse der von  $\vec{E}$  durchlaufenen Ellipse.

Zusammengefasst bewirkt die optische Rotationsdispersion eine Drehung der Polarisations-ebene ( $v_L \neq v_R$ ), wohingegen der Circular Dichroismus die Elliptizität von Lichtwellen ändert ( $\epsilon_L \neq \epsilon_R$ ).

Zu Vergleichszwecken wird gewöhnlich die von der Konzentration und der Proben-  
dicke unabhängige *spezifische Elliptizität*

$$[\Psi]_{\lambda} = \frac{\Psi}{d' \cdot c'}, \quad \left[ \frac{\text{Grad}}{\text{dm} \cdot \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}} \right] \quad (2.47)$$

mit  $[d'] = 1 \text{ dm}$ ,  $[c'] = 1 \text{ g/cm}^3$ , oder die *molare Elliptizität*

$$[\Theta]_{\lambda} = \frac{100 \cdot \Psi}{d \cdot c}, \quad \left[ \frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dMol}} \right] \quad (2.48)$$

mit  $[d] = 1 \text{ cm}$ ,  $[c] = 1 \text{ Mol/Liter}$ , herangezogen. Bei Gl. (2.47) und (2.48) ist zu be-  
achten, das  $\Psi$  in Einheiten von Grad (Nicht in mGrad!) einzusetzen ist.

Werden Proteine mittels der CD-Spektroskopie untersucht, hängt die Stärke des CD-  
Signals auch von der Zahl der Aminosäurereste  $N$  ab, die zwischen einigen Zehn und  
mehreren Tausend variieren kann.  $\Psi$  ist in erster Näherung proportional zu  $N$ . Daher  
verwendet man häufig die *residuale Elliptizität*, die sich aus (2.47) bzw. (2.48) durch  
Division von  $[\Psi]_{\lambda}$  bzw.  $[\Theta]_{\lambda}$  durch  $N$  ergibt.  $\Delta\epsilon$  ist mit der molaren Elliptizität  $[\Theta]_{\lambda}$   
durch folgende Relation verknüpft

$$[\Theta]_{\lambda} = \left( \frac{360}{2\pi} \cdot \frac{\ln 10}{4} \cdot 100 \right) \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R) \quad (2.49)$$

$$\cong 3298,21 \cdot \Delta\epsilon.$$

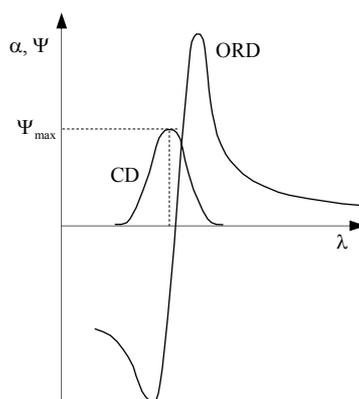


Abbildung 2.10: Positiver Cotton-Effekt im CD- und im anomalen ORD-Spektrum  
für einen isolierten elektronischen Übergang.

ORD- und CD-Kurven können mit Hilfe der *Kramers-Kronig-Relation* ineinander überführt werden

$$\alpha(\lambda_i) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \Psi(\lambda) \frac{\lambda}{\lambda_i^2 - \lambda^2} d\lambda. \quad (2.50)$$

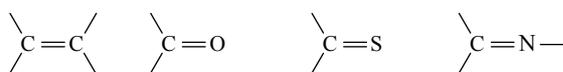
Abb. 2.10 zeigt das CD- und das anomale ORD-Spektrum im Bereich einer Absorptionsbande.

## 2.2.2 Molekulare Ursachen des Circular Dichroismus

*Voraussetzungen für das Messen von CD-Spektren*

Um CD bei einem Molekül beobachten zu können, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Das Molekül absorbiert Licht im UV-Bereich, was bei Vorhandensein eines oder mehrerer *Chromophore* (= Farbträger) gewährleistet ist. Einige häufig vorkommende Chromophore sind



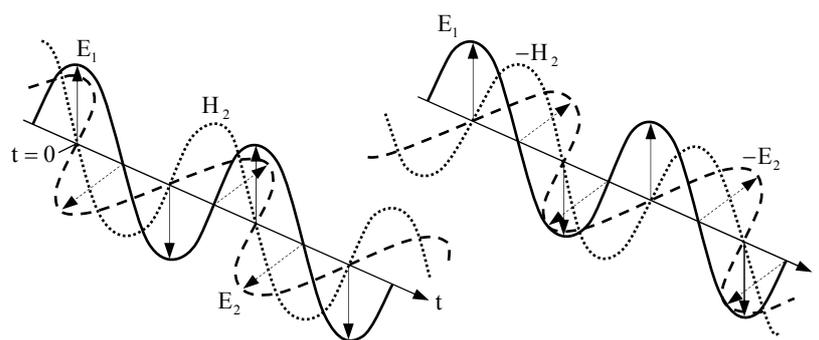
Carbonylgruppe      Thiogruppe      Carbamingruppe

2. Die Substanz ist *optisch aktiv*, d.h. sie wechselwirkt unterschiedlich mit links- bzw. rechtshändig zirkular polarisiertem Licht – in diesem Fall spricht man auch von *Chiralität*. Chirale Moleküle können nicht mit ihrem Spiegelbild in Übereinstimmung gebracht werden.

*Phänomenologische Deutung*

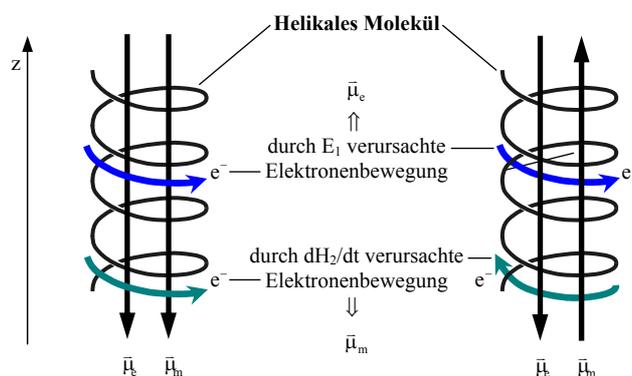
Um zu verstehen, wie es zu einer unterschiedlichen Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht kommen kann, wird eine linear polarisierte em-Welle betrachtet, die aus links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht superponiert ist. Das zirkular polarisierte Licht seinerseits, stellt eine Überlagerung zweier linear polarisierter elektromagnetischer Wellen mit einem Phasenversatz von  $\pi/2$  und einer Vertauschung der  $\vec{E}$ - und  $\vec{H}$ -Feld-Ebene dar (vgl. Abb. 2.11a) und 2.11b)).

Für das klassische Verständnis des Circular Dichroismus wird vereinfachend ein Molekül betrachtet, dass ein über einen helikalen Bereich sich erstreckendes konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem besitzt (Abb. 2.11c)) – analog einer Spulengeometrie. Die durch das oszillierende elektrische Feld  $\vec{E}$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  ( $E_1$  ist maximal) induzierte Netto-Elektronenbewegung in der Molekülhelix weist für das links- und für das rechts-zirkular polarisierte Licht in negative z-Richtung (Abb. 2.11c)).



a) rechts-zirkular polarisiertes Licht

b) links-zirkular polarisiertes Licht



c) resultierende Elektronenbewegung nebst den Richtungen der daraus entstehenden elektrischen und magnetischen Dipolmomente

Abbildung 2.11: Wirkung zweier zirkular polarisierter em-Wellen auf die Elektronenbewegung in einem ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystem eines helikalen Moleküls. In a) und b) sind die linear polarisierten Anteile der beiden em-Wellen gezeigt, sowie das zu  $E_2$  korrespondierende  $H_2$ -Feld ( $-E_2$  und  $-H_2$  sind die negativen Pendanten zu  $E_2$  bzw.  $H_2$ ). Für die in c) dargestellten Elektronen-Elongationen und die daraus resultierenden Dipolmomente zum Zeitpunkt  $t = 0$  wird  $\lambda$  sehr viel größer als die Moleküldimensionen angenommen.

Bei  $t = 0$  ist  $dH_2/dt$  und damit auch die Änderung des magnetischen Flusses durch die molekulare Helix-Querschnittsfläche für beide zirkularen Lichtkomponenten maximal. Das rechts-zirkular polarisierte Licht verursacht dadurch, nach dem Induktionsgesetz, eine in positive  $z$ -Richtung wirkende Kraft auf die Elektronen. Die durch  $E_1$  und  $dH_2/dt$  hervorgerufenen Ströme und folglich auch die oszillierenden Dipolmomente  $\bar{\mu}_e$  und  $\bar{\mu}_m$  sind so exakt in Phase. Für links-zirkular polarisiertes Licht ist der durch  $dH_2/dt$  induzierte Strom zu dem von  $E_1$  verursachten gegenphasig.

Die Absorption ist am stärksten, wenn  $\bar{E}_1$  und  $\bar{H}_2$  eine synchrone Elektronenbewegung hervorrufen; sie ist am schwächsten, im Fall einer destruktiven Interferenz der Ladungsflüsse. In dem hier betrachteten idealisierten Fall findet daher ausschließlich Absorption von rechts-zirkular polarisiertem Licht statt, was per Definition nach Gleichung (2.44) zu einer negativen CD-Amplitude führt ( $\epsilon_L = 0$ ;  $\epsilon_R > 0 \Rightarrow \Delta\epsilon < 0$ ).

### Quantitative Beschreibung

Wird Licht durch Elektronenanregung<sup>14)</sup> absorbiert, geschieht dies für gewöhnlich durch elektrische bzw. magnetische Dipolübergänge. Die potentielle Energie  $V$  der Wechselwirkung zwischen dem Lichtfeld und dem elektrischen bzw. magnetischen Übergangsdipolmoment  $\bar{\mu}_e$  und  $\bar{\mu}_m$  lautet

$$V = -\bar{\mu}_e \bar{E} - \bar{\mu}_m \bar{H}. \quad (2.51)$$

Die Wahrscheinlichkeit, mit der es in einem Strahlungsfeld zum Übergang von einem Zustand  $\Psi_i$  – i.a. der Grundzustand – zu einem anderen Zustand  $\Psi_j$  kommt, wird durch die Dipolstärke  $D_{ij}$  erfasst

$$\begin{aligned} D_{ij} &= \left| \langle \Psi_j | \hat{\mu}_e | \Psi_i \rangle \right|^2 + \left| \langle \Psi_j | \hat{\mu}_m | \Psi_i \rangle \right|^2 \\ &= |\bar{\mu}_e^{(ij)}|^2 + |\bar{\mu}_m^{(ij)}|^2 \sim \int \frac{\epsilon(\lambda)}{\lambda} d\lambda. \end{aligned} \quad (2.52)$$

$D_{ij}$  kann in eine elektrische und eine magnetische Dipolstärke untergliedert werden. Die zu  $D_{ij}$  adäquate Größe bei der Behandlung des Circular Dichroismus ist die Rotationsstärke  $R_{ij}$ :

$$\begin{aligned} R_{ij} &= \text{Im} \left( \langle \Psi_j | \hat{\mu}_e | \Psi_i \rangle \langle \Psi_i | \hat{\mu}_m | \Psi_j \rangle \right) \\ &= \text{Im} \left( \bar{\mu}_e^{(ij)} \cdot \bar{\mu}_m^{(ij)} \right) \sim \int \frac{\Delta\epsilon(\lambda)}{\lambda} d\lambda. \end{aligned} \quad (2.53)$$

<sup>14)</sup> Weitere Anregungsarten sind vibronische und rotatorische Anregungen des molekularen Kerngerüsts.

CD kann prinzipiell in 3 Fällen auftreten:

1. *Kopplung eines elektrischen Dipolmoments  $\bar{\mu}_e$  mit einem magnetischen  $\bar{\mu}_m$*   
Die Rotationsstärke lässt sich nach Gl. (2.53) berechnen.
2. *Kopplung zweier (nahezu) entarteter elektrischer Dipolübergänge  $\bar{\mu}_{e,a}$  und  $\bar{\mu}_{e,b}$  mit dem Abstandsvektor  $\bar{r}_{ab}$  und der Anregungsenergie  $E_a \cong E_b = E$ .*

Durch die Wechselwirkung von  $\bar{\mu}_{e,b}$  mit dem elektrischen Feld von  $\bar{\mu}_{e,a}$  erhält  $\bar{\mu}_{e,b}$  einen Drehimpuls, der wiederum mit einem magnetischen Moment verbunden ist. Aus diesem Grund können Kopplungen solcher Art ebenfalls eine Rotationsstärke besitzen. Nach Roger und Nordén<sup>[207]</sup> gilt für R im entarteten Fall mit E als Übergangsenergie

$$R^{\pm} = \pm \frac{E}{4\hbar} \bar{r}_{ab} \cdot (\bar{\mu}_{e,b} \times \bar{\mu}_{e,a}). \quad (2.54)$$

Im Orbitalmodell ist diese Situation in Abb. (2.12b) gezeigt, wo die beiden angeregten elektronischen Zustände  $\psi_{j,a}$  und  $\psi_{j,b}$  zu einem energetisch niedrigeren Zustand  $\psi_j^+$  und einem energetisch höheren Molekülorbital  $\psi_j^-$  linearkombinieren.<sup>15)</sup> Diese Wechselwirkung bezeichnet man als *Exciton-* oder *Davydov-Aufspaltung*.<sup>[208,209]</sup>

Die Energie  $E(\psi_j^{\pm}) = E(\psi_j) \pm V$  der Exciton-Zustände enthält die Dipol-Dipol-Wechselwirkungsenergie V, mit

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left( \frac{\bar{\mu}_{e,a} \cdot \bar{\mu}_{e,b}}{r_{ab}^3} - 3 \frac{(\bar{r}_{ab} \cdot \bar{\mu}_{e,a})(\bar{r}_{ab} \cdot \bar{\mu}_{e,b})}{r_{ab}^5} \right). \quad (2.55)$$

Eine wesentliche Schlussfolgerung aus (2.55) ist die mit zunehmender Entfernung der beiden Chromophore im Molekül immer kleiner werdende Energiedifferenz zwischen  $E(\psi_j^+)$  und  $E(\psi_j^-)$ . Da  $R^{\pm}$  mit wachsendem Abstand der Chromophore linear zunimmt, würde prinzipiell auch das CD-Signal stetig ansteigen. Aufgrund der jedoch gleichzeitigen Verringerung der energetischen Differenz zwischen den CD-Signalen für  $R^+$  und  $R^-$ , unterliegen beide Signale zunehmend einer destruktiven Interferenz (Abb. 2.12c)).

<sup>15)</sup> Die semiklassische, anschauliche Erklärung für die Erniedrigung eines Energiezustands, der aus einer Linearkombination zweier oder mehrerer Orbitale hervorgeht, ist in Kap. 1.2.1, S. 4 gegeben.

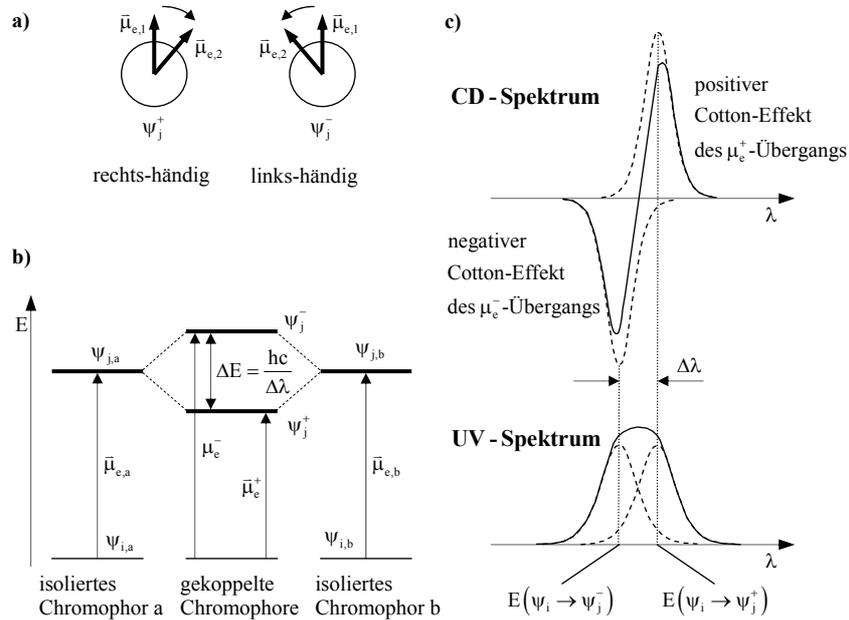


Abbildung 2.12: a) Orientierung eines links- und eines rechts-händigen Dipolmoment-Paares mit den dazugehörigen gekoppelten Elektronenzuständen. Die Dipole sind auf die Fläche projiziert, die senkrecht zum Abstandsvektor  $\vec{r}_{ab}$  steht.

b) Entartete (oder nahezu entartete) Zustände (Grundzustand  $\Psi_i$  und ein angeregter Zustand  $\Psi_j$ ) zweier Chromophore a und b, sowie die durch *Exciton-Kopplung* resultierenden Zustände  $\Psi_j^+$  und  $\Psi_j^-$  (in diesem Bild enthalten beide Grundzustände jeweils ein positiv geladenes Loch und die angeregten Zustände die dazugehörigen Elektronen).

c) UV- und CD-Spektrum mit den beiden Absorptionsbänden  $\Psi_i \rightarrow \Psi_j^+$  und  $\Psi_i \rightarrow \Psi_j^-$ . Abgebildet sind die Spektren der einzelnen Übergänge (----), sowie das Summenspektrum (—).

3. *Kopplung zweier nicht-entarteter elektrischer Dipolübergänge  $\bar{\mu}_{e,a}$  und  $\bar{\mu}_{e,b}$* 

Ähnlich wie im Fall zweier entarteter angeregter Chromophor-Zustände können auch bei nicht-entarteten Zuständen die Übergangsdipolmomente miteinander wechselwirken und zu einem CD-Signal führen. Die qualitative Erklärung ist mit der für den entarteten Fall identisch. Die Rotationsstärke beträgt für die Übergänge zu den Zuständen  $\psi_{j,a}$  und  $\psi_{j,b}$  mit den Energien  $E_a$  und  $E_b$ <sup>[210]</sup>

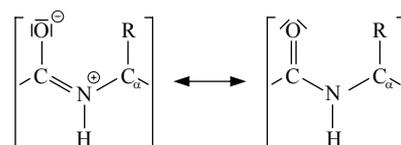
$$R(E_a) = \frac{-E_a E_b V}{\hbar(E_b^2 - E_a^2)} \bar{r}_{ab} \cdot (\bar{\mu}_{e,b} \times \bar{\mu}_{e,a}). \quad (2.56)$$

$V$  ist die in (2.55) angegebene Dipol-Dipol-Wechselwirkungsenergie. Die  $r^3$ -Abhängigkeit von  $V$  stellt sicher, dass mit wachsendem Abstand beider Chromophore das CD-Signal asymptotisch gegen Null geht.

Selbst wenn zwei Chromophore 40–50 Å voneinander entfernt sind, können ihre Momente noch miteinander koppeln und zu einem CD-Signal führen.<sup>[211]</sup> (im Vergleich dazu beträgt die mittlere Segmentlänge eines Peptidrückgrats nur 3,17 Å.<sup>16)</sup>

### 2.2.3 Circular Dichroismus bei Proteinen

Das kennzeichnende Strukturmerkmal von Proteinen ist ihr Peptidrückgrat, mit der folgenden mesomeren Grenzstruktur einer Amidgruppe



Peptide und Proteine bestehen aus einer Vielzahl von Amidgruppen; einige Duzend bis mehrere Tausend. Die Peptidgruppe (OC-NH) ist planar gebaut. Die Bindungswinkel am C- und N-Atom betragen jeweils 120°. Grund dafür sind das  $sp^2$ -hybridisierte Carbonyl-C-Atom und das ebenfalls  $sp^2$ -hybridisierte N-Atom. Das  $p_z$ -Atomorbital des C-Atoms überlappt unter- und oberhalb der C–O-Kernverbindungsachse mit dem  $p_z$ -Atomorbital des Sauerstoffs und dem  $p_z$ -Atomorbital des Stickstoffs (delokalisiertes  $\pi$ -Elektronensystem mit 3 Zentren und 4 Elektronen). Durch diesen partiellen Doppelbindungscharakter der C–O- und C–N-Bindung ist keine freie Drehbarkeit um die C–N-Achse möglich.

<sup>16</sup> Die Mittelung wird über folgende durchschnittliche Längen durchgeführt:

$$d(\text{C}_\alpha - \text{C}_\alpha) = 3,76 \text{ \AA}, \quad d(\text{OC} - \text{CO}) = 2,98 \text{ \AA}, \quad d(\text{C}_\alpha - \text{C}_\alpha) = 2,77 \text{ \AA}.$$

### 2.2.4 Peptidspezifische CD-relevante Elektronenübergänge

In einer Peptidgruppe existieren 2 Elektronenanregungen, die für den Circular Dichroismus von Bedeutung sind, der elektrisch erlaubte  $\pi\pi^*$ -Dipolübergang und der magnetisch erlaubte  $n\pi^*$ -Übergang. Da die Orbitale  $\Psi(n)$  und  $\Psi(\pi^*)$  im Raum senkrecht zueinander stehen, ist eine  $n\pi^*$ -Anregung mittels eines elektrischen Dipolübergangs zunächst nicht erlaubt.<sup>[212]</sup> Sie kann allerdings durch Störung der Peptidsymmetrie eine endliche elektrische Oszillatorstärke gewinnen mit  $\epsilon_{\max} < 100\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Die dafür notwendige Asymmetrie kann durch

- Aminosäurereste,
- eine asymmetrische Sekundärstruktur bzw.
- intra- und/oder intermolekulare H-Brücken<sup>[213]</sup>

vermittelt werden.

Die Energie des  $n\pi^*$ -Übergangs ist stark von eventuellen Wasserstoffbrücken der Art: C=O---H--X abhängig und variiert zwischen 210nm und 230nm.<sup>[213]</sup> Da ähnliche Geometrie-bezogene Überlegungen auch für die  $\pi\pi^*$ -Übergänge gelten, wird das CD-Spektrum wesentlich durch die Sekundärstruktur eines Proteins bestimmt.

Einen zum Teil oft störenden Einfluss auf CD-Spektren von Proteinen besitzen die Absorptionsbanden eventueller Chromophore in den Seitenketten, Protein-Glykosylierungen, aber auch die Wechselwirkungen eines Proteins mit dem umgebenden Medium.

### 2.2.5 Übergangsdipolmoment-Kopplungen von Amidchromophoren

Insgesamt tragen 3 Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zum CD von Proteinen bei:

1. *Exciton-Wechselwirkung* zwischen entarteten bzw. nahezu entarteten  $\pi\pi^*$ -Übergängen verschiedener Peptidgruppen.<sup>[208]</sup> Im Fall einer Kopplung von N entarteten oder nahezu entarteten Zuständen erhält man eine Aufspaltung in N nicht-entartete Zustände. Inhärente Molekülsymmetrien erniedrigen allerdings diese Zahl wiederum.
2. Kopplung des  $n\pi^*$ -Dipolmoments einer Peptidgruppe mit einem  $\pi\pi^*$ -Übergangsmoment einer anderen Peptidgruppe –  *$\mu$ -m-Kopplung*.<sup>[214]</sup>
3. Kopplung zwischen dem  $n\pi^*$ -Dipolmoment und einem  $\pi\pi^*$ -Dipolübergang innerhalb der gleichen Peptidgruppe – *Ein-Elektronen-Effekt*.<sup>[215]</sup>

Energetisch liegen die Übergänge  $n\pi^*$  und  $\pi\pi^*$  sehr nahe beieinander, was bei einer  *$\mu$ -m-Kopplung* bzw. einem *Ein-Elektronen-Effekt* zu einem starken Intensitätsgewinn des  $n\pi^*$ -Übergang führen kann.

In Abb. 2.13 ist illustrativ das Termschema für eine *Exciton-Kopplung* dargestellt, ebenso sind die Richtungen der möglichen Übergangsdipolmomente bzgl. der Peptidbindung eingezeichnet.

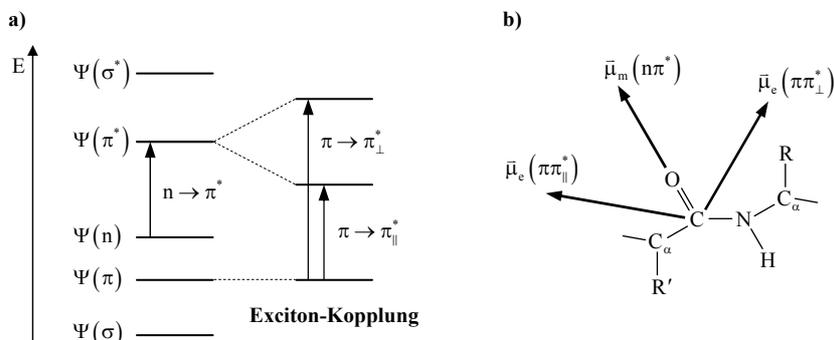


Abbildung 2.13: a) Links: Qualitative Reihenfolge einiger Orbitale einer Amidgruppe;  $\Psi(\sigma)$  steht für die Grundzustände sämtlicher  $\sigma$ -Bindungen,  $\Psi(\pi)$  für das Doppelbindungssystem einer Peptidgruppe und  $\Psi(n)$  ist die Wellenfunktion des nicht bindenden Sauerstoff-Elektronenpaares. Rechts: *Davydov-Aufspaltung* der  $\Psi(\pi^*)$ -Orbitale im Fall einer Kopplung der  $\pi\pi^*$ -Übergangsdipolmomente verschiedener Amidgruppen.

b) Übergangsdipolmomente einer Peptidgruppe. Die Richtung von  $\bar{\mu}_e(\pi\pi_{\parallel}^*)$  ist weitgehend parallel zur C–N-Bindungsachse, während  $\bar{\mu}_e(\pi\pi_{\perp}^*)$  fast senkrecht dazu steht.  $\bar{\mu}_m(n\pi^*)$  liegt nahezu parallel zur C=O-Bindungsachse.<sup>[216]</sup>

## 2.2.6 Sekundärstruktur-Klassen von Proteinen

Wie bereits erwähnt können, abhängig von der intra- und intermolekularen Umgebung einer Amidgruppe, die Intensitäten und Energien der Dipolübergänge stark variieren, was u.a. dazu führt, dass sich CD-Spektren verschiedener Proteine ähnlicher Struktur teilweise signifikant voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund ist eine Angabe von CD-Spektren der reinen Sekundärstruktur-Klassen mittels derer die Spektren für sämtliche Proteine superponiert werden können, nicht möglich. Abbildung 2.14 zeigt typische Spektren für  $\alpha$ -Helix-,  $\beta$ -Faltblatt-,  $\beta$ -Turn- und *random coil*-Strukturen.

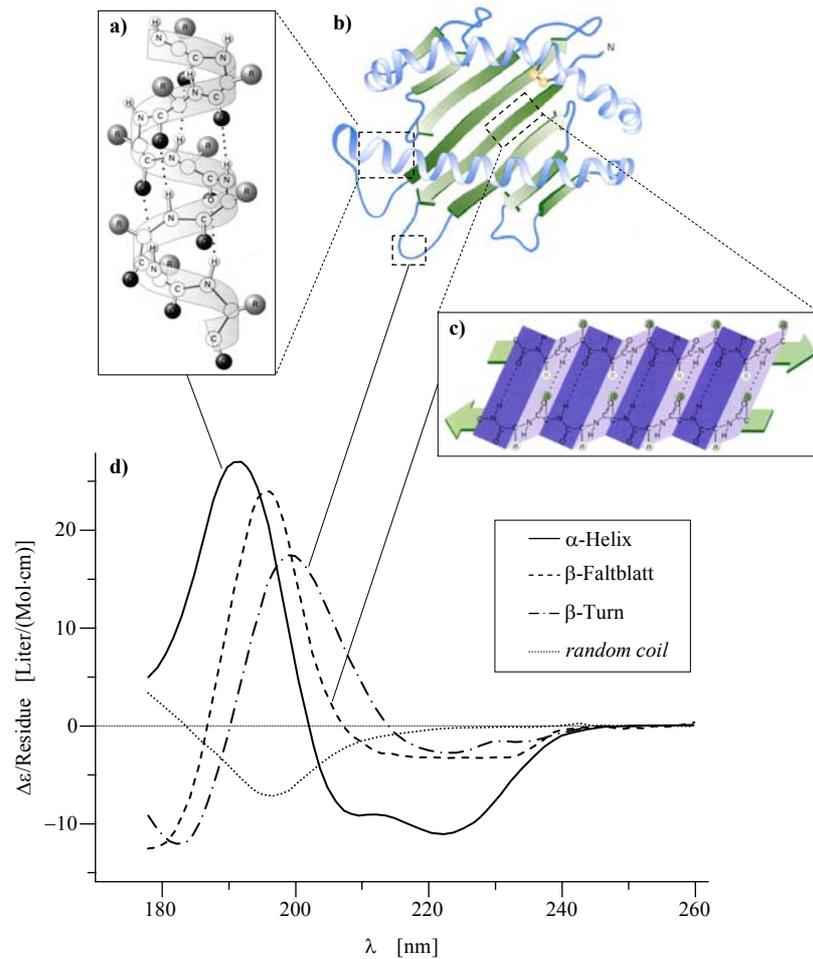


Abbildung 2.14: a) Beispiel einer  $\alpha$ -Helix;  
 b) Model eines MHC- (major histocompatibility complex) Moleküls mit verschiedenen Sekundärstruktur-Klassen;  
 c) Beispiel eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts;  
 d) CD-Spektren der reinen Sekundärstruktur-Klassen, wie sie aus einem Fit der linearen Gleichungssysteme entsprechend den Gleichungen (2.56) und (2.64) erhalten werden. Die dafür verwendeten CD-Spektren wurden aus einem Basissatz bestehend aus 35 Referenzprotein-Spektren nach Maßgabe ihrer Strukturanteile ausgewählt (siehe Kap. 3.6.2).

### Helix

Strukturen in Proteinen, bei denen die Sequenzkette sich in einer Spirale windet, bezeichnet man als Helix. Bei der am häufigsten vorkommenden, sog.  $\alpha$ -Helix beträgt die Zahl der Amidgruppen pro Windung  $n_\alpha = 3,6$ . Helices mit einem anderen  $n_\alpha$ , wie etwa die  $3_{10}$ -Helix, bei welcher 3 Umläufe aus 10 Peptidgruppen bestehen ( $n_\alpha = 3\frac{1}{3}$ ), kommen nur selten vor.

Ein Helix-CD-Spektrum ist gekennzeichnet durch ein starkes positives Signal im Bereich von 190nm und das Auftreten zweier negativer Cotton-Effekte bei 208nm und 222nm (s. Abb. 2.15a). Infolge der durch Proteinhelices erzeugten vergleichsweise großen Amplituden, werden CD-Spektren oft von den Helixanteilen dominiert. Die beiden  $\pi\pi^*$ -Banden bei 192nm und 208nm sind die Folge einer *Davydov-Aufspaltung* der mehr oder weniger entarteten  $\pi\pi^*$ -Übergangsdipolmomente verschiedener Amidgruppen.<sup>[217-219]</sup> Das negative CD-Signal bei 222nm rührt von dem  $n\pi^*$ -Übergang her.<sup>[220,221]</sup>

### $\beta$ -Faltblatt

Sowohl parallele als auch antiparallele Faltblätter sind in ihrer Struktur (Länge, Breite und Biegung) sehr viel flexibler als Helices.<sup>[222]</sup> Infolge dieser Variabilität treten auch in den einzelnen CD-Spektren stärkere Abweichungen zwischen verschiedenen Faltblättern auf. Das charakteristische Faltblatt-Spektrum zeigt bei 195nm einen po-

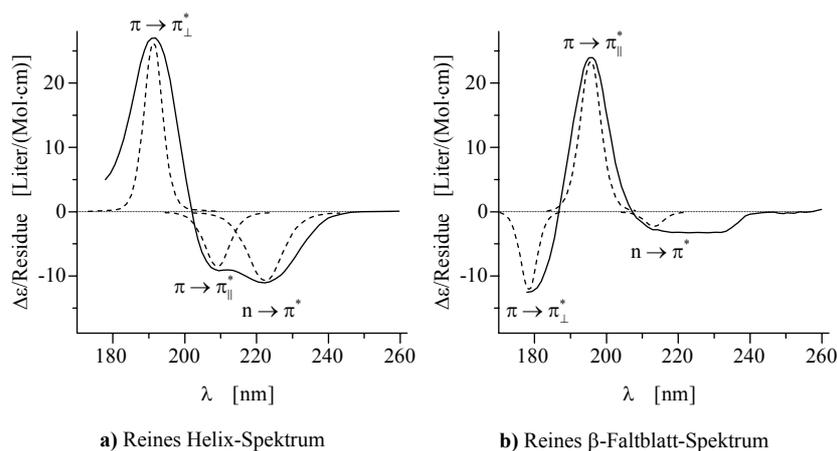


Abbildung 2.15: Berechnete CD-Spektren reiner Sekundärstruktur-Klassen mit Angabe der den Spektrenverlauf bestimmenden elektronischen Übergänge.

sitiven *Cotton-Effekt* und ein negatives Signal bei 216nm.<sup>[223–226]</sup> Letzteres ist dem  $n\pi^*$ -Übergang zuzuordnen. Eine weitere negative Bande kann bei 175nm beobachtet werden.<sup>[227]</sup>

Die Position des im Bereich von 185–190nm liegenden Schnittpunkts mit der x-Achse ist ein sensibles Kriterium für die Unterscheidung zwischen parallelem und antiparallelem Faltblatt.<sup>[228–230]</sup> Drehungen innerhalb von  $\beta$ -Faltblättern äußern sich durch Verkleinerung der CD-Amplituden und einer Rotverschiebung der  $\pi\pi^*$ -Übergänge.<sup>[231–234]</sup>

### $\beta$ -Turn

Bisher wurden insgesamt 8 verschiedene Typen von Turns charakterisiert,<sup>[235]</sup> deren CD-Spektren zum Teil stark voneinander abweichen.<sup>[236]</sup> Abhängig vom Typ variieren die Spektren der  $\beta$ -Turns zwischen Helix- und Faltblatt-ähnlichen Verläufen mit unterschiedlichen energetischen Shifts.<sup>[237]</sup>

In Abb. 2.16a) ist das aus 14 Referenzprotein-Spektren errechnete mittlere  $\beta$ -Turn-Spektrum gezeigt (s. Kap. 3.6.2), nebst den zugehörigen elektronischen Übergängen. Die beiden Absorptionsbanden  $\pi\pi_{\parallel}^*$  und  $\pi\pi_{\perp}^*$  interferieren zum Teil destruktiv im Bereich um 190nm herum (vgl. Abb. 2.16a)).

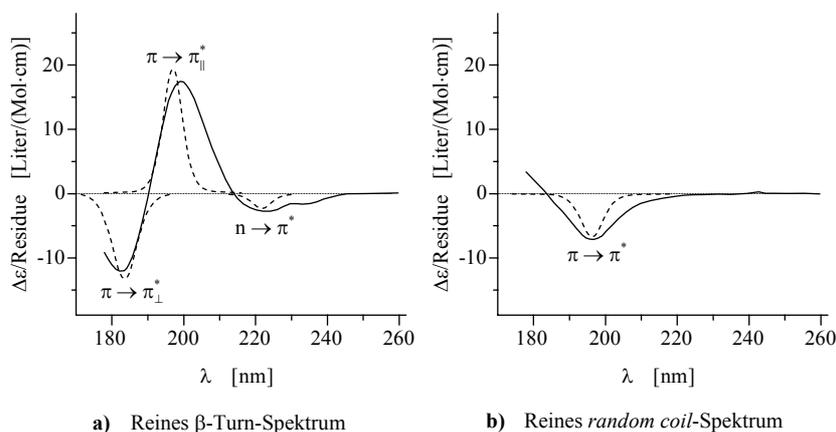


Abbildung 2.16: Berechnete CD-Spektren reiner Sekundärstruktur-Klassen mit Angabe der den Spektrenverlauf dominierenden elektronischen Banden. Die CD-Verläufe von Proteinen mit entsprechend großem Anteil an  $\beta$ -Turn oder *random coil*-Struktur können im einzelnen stark von den dargestellten Kurven abweichen (s. Text)!

*Ungeordnete Proteinstruktur*

Strukturen, die weder einer Helix, einem Faltblatt noch einem  $\beta$ -Turn zugewiesen werden können, bezeichnet man als ungeordnet oder *random coil*, wobei diese Namensgebung nicht zwingend eine strukturlose oder willkürliche Proteingeometrie involviert. Typisch für ein *random coil*-Spektrum ist die unterhalb von 200nm liegende negative  $n\pi^*$ -Bande.<sup>[238]</sup> Oberhalb von 200nm variieren die Spektren ungeordneter Proteine stark und zeigen teilweise einen positiven *Cotton-Effekt*, teilweise aber auch eine negative Schulter nahe 218nm.

**2.2.7 Berechnung der Sekundärstruktur-Anteile***Prinzip*

Das CD-Spektrum eines Proteins, mit den von der Wellenlänge  $\lambda$  abhängigen Amplituden  $y_\lambda^{\text{CD}}$ , kann durch eine Linearkombination von N Referenzspektren ausgedrückt werden

$$y_\lambda^{\text{CD}} = \sum_{n=1}^N c_n y_{n,\lambda}^{\text{ref}} \quad (2.57)$$

Voraussetzung dafür ist, dass für den Laufindex  $n \geq h$  gilt, mit  $h$  als der Zahl der verschiedenen möglichen Sekundärstruktur-Klassen, die bei einem Protein auftreten können. Einige Klassen liefern sehr ähnliche CD-Spektren oder kommen nur selten vor und besitzen einen geringen Anteil an der gesamten Proteinstruktur, wie etwa das parallele  $\beta$ -Faltblatt.<sup>[239]</sup> Aus diesem Grund wird die Zahl der zu berücksichtigenden Sekundärstruktur-Klassen gewöhnlich auf 4–6 beschränkt.

Stehen mindestens so viele Referenz-CD-Spektren von Proteinen bekannter Struktur zur Verfügung wie die Zahl der betrachteten Sekundärstruktur-Klassen, können auch die theoretischen Spektren für die reinen Sekundärstrukturen errechnet werden (s. Kap. 3.6.2).

Es ist darauf hinzuweisen, dass die aus CD-Spektren kalkulierten Sekundärstrukturanteile u.U. um bis zu 20% von den tatsächlichen Werten abweichen können. Daher besteht die Stärke der Circular Dichroismus Spektroskopie nicht in der Bestimmung absoluter Proteinstrukturen sondern vielmehr in der Möglichkeit strukturelle Änderungen bei Variation der Umgebungsbedingungen (wie Temperatur, Salzkonzentration, etc.) zu verfolgen!

*Das Programmpaket CDPro*

Für die Bestimmung der Sekundärstruktur aus gemessenen CD-Spektren stehen heute eine Reihe verschiedener Programme zur Verfügung. Die Auswertung der im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit durchgeführten CD-Messungen wurde mit

dem Programmpaket CDPro<sup>[240,241]</sup> vorgenommen. Dieses enthält 3 unterschiedliche Algorithmen zur Strukturberechnung: SELCON3,<sup>[239]</sup> CDSSTR<sup>[242,243]</sup> und CONTINLL.<sup>[244]</sup> Ein Vergleich der drei Methoden findet sich in [244]. Die simultane Auswertung mit allen drei Verfahren erlaubt die Einschätzung der Verlässlichkeit der errechneten Strukturanteile; liefern alle drei Programme in etwa die gleichen Werte, können die Ergebnisse innerhalb einer Fehlerbreite von 5-15% als zuverlässig eingestuft werden.

Zusätzlich zu den Sekundärstruktur-Anteilen schätzt CDPro noch die Zahl der Helices und Faltblätter sowie die mittlere Anzahl an Amidgruppen pro Helix bzw. Faltblatt ab und gibt für jede Berechnung eine unnormierte sowie die normierte Standardabweichung  $\sigma_{\text{RMSD}}$  bzw.  $\sigma_{\text{NRMSD}}$  zwischen dem kalkulierten und dem gemessenen Spektrum aus<sup>[245]</sup>

$$\sigma_{\text{RMSD}} = \sqrt{\sum_{\lambda=\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} (y_{\lambda}^{\text{CD}} - y_{\lambda}^{\text{calc}})^2}, \quad (2.58)$$

$$\sigma_{\text{NRMSD}} = \sqrt{\frac{\sum_{\lambda=\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} (y_{\lambda}^{\text{CD}} - y_{\lambda}^{\text{calc}})^2}{\sum_{\lambda=\lambda_{\min}}^{\lambda_{\max}} (y_{\lambda}^{\text{CD}})^2}}. \quad (2.59)$$

In den Gleichungen (2.58) und (2.59) wird über den gemessenen Wellenlängenbereich ( $\Delta\lambda = \lambda_{\min} - \lambda_{\max}$ ) summiert.  $y_{\lambda}^{\text{CD}}$  ist die bei  $\lambda$  gemessene CD-Amplitude und  $y_{\lambda}^{\text{calc}}$  die entsprechende berechnete, beide normiert auf Einheiten von  $\Delta\epsilon/\text{Residue}$ .

Es ist allerdings anzumerken, dass aus der Größe der Standardabweichungen nicht zwingend auf die Güte eines Fits geschlossen werden kann!

CDPro bietet 7 Basissätze an, mittels derer Spektren von löslichen Proteinen analysiert werden können (seit kurzem existieren 2 zusätzliche Basissätze speziell für Membranproteine). Die in den 7 Basissätzen insgesamt vorkommenden Proteine sind in Tab. 2.3 aufgelistet. Tabelle 2.4 enthält die individuelle Zusammensetzung derjenigen Basissätze, die in dieser Arbeit bei den Auswertungen der experimentellen Ergebnisse benutzt wurden.

### *Sekundärstruktur-Klassifizierung*

Die in CDPro integrierten Fitalgorithmen unterscheiden zwischen 6 verschiedenen Strukturklassen.<sup>[246]</sup>

In den Randbereichen zu anderen Strukturen weisen Helices bzw. Faltblätter gewisse Abweichungen von ihrer regulären Struktur auf. Um geometrische Verzerrungen

<b>Johnson et al.</b> <sup>[247,248]</sup> ( $\Sigma = 29$ )	<b>Keiderling &amp; co-workers</b> <sup>[249]</sup> ( $\Sigma = 5$ )
Myoglobin	a-Chymotrypsinogen
Hemoglobin	Alcohol Dehydrogenase
Hemerythrin	Carbonic Anhydrase
T4 Lysozym	Glutathione Reductase
Triose Phosphate Isomerase	Rhodanase
Lactate Dehydrogenase	
Lysozyme	
Thermolysin	
Cytochrome C	<b>Yang &amp; co-workers</b> <sup>[250]</sup> ( $\Sigma = 6$ )
Phosphoglycerate Kinase	Nuclease
EcoR1 Endonuclease	Insulin
Flavodoxin	Parvalbumin
Subtilisin BPN	Carboxypeptidase A
Glyceraldehyde 3-p Dehydrogenase	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
Papain	Adenylate Kinase
Subtilisin novo	
Ribonuclease A	
Pepsinogen	
Beta-Lactoglobulin	<b>Sreerama et al. – globuläre Proteine</b> <sup>[246]</sup>
a-Chymotrypsin	Colicin A
Azurin	Rat intestinal Fatty Acid binding Protein
Elastase	green fluorescence Protein
g-Crystallin	
Prealbumin	<b>Sreerama et al. – denaturierte Proteine</b> <sup>[240]</sup>
Concanavalin A	Apo-Cytochrome C (5°C)
Bence Jones Protein	Apo-Cytochrome C (90°C)
Tumor Necrosis Factor	Ribonuclease (20°C)
Superoxide Dismutase	Staphylococcal Nuclease (6°C)
a-Bungarotoxin	Staphylococcal Nuclease (70°C)

Tabelle 2.3: Sämtliche löslichen Proteine, deren CD-Spektren in die Basissätze von CDPro eingehen.

	Basissatz <sup>17)</sup>				
	1	3	4	6	7
Johnson et al.	×	×	×	×	×
Yang und co-workers			×		×
Keiderling und co-workers		×	×	×	×
Sreerama et al. – globuläre Proteine		×	×	×	×
Sreerama et al. – denaturierte Proteine				×	×
Zahl der enthaltenen Proteine	29	37	43	42	48
Wellenlängen-Beginn [nm]	178	185	185	185	190
Wellenlängen-Ende [nm]	260	240	240	240	240

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der 5 CDPro-Basissätze mit denen eine Sekundärstruktur-Klassifikation in reguläre bzw. gestörte Helices und Faltblätter, sowie in Turns und ungeordnete Strukturanteile möglich ist. Die Basissätze eignen sich für die Analyse von Spektren gelöster Proteine.

dieser Art berücksichtigen zu können, erfolgt eine Unterteilung in reguläre und gestörte Helices ( $\alpha_r$ ,  $\alpha_d$ ) bzw.  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta_r$ ,  $\beta_d$ ). Pro Helix werden 2 bis 6 Aminosäurereste zu  $\alpha_d$  gezählt, was 1 bis 3 Peptidgruppen an jedem Helix-Ende entspricht.

In  $\alpha_r$  sind die Kernbereiche der  $\alpha$ - und der  $3_{10}$ -Helices zusammengefasst. Bei  $\beta$ -Faltblättern variiert die Zahl der endständigen Peptidgruppen pro Faltblatt, die zu  $\beta_d$  gezählt werden, zwischen 1 und 4.  $\beta_r$  enthält die Zentralbereiche eines Faltblatts, ohne Unterscheidung zwischen paralleler und antiparalleler  $\beta$ -Faltblattstruktur.

Die beiden übrigen Sekundärstruktur-Klassen sind  $\beta$ -Turn und *random coil*.  $\beta$ -Turn umfasst sämtliche Turnstrukturen, und zu *random coil* werden alle Amidgruppen gezählt, die nicht einer der 5 anderen Strukturen zuzuordnen sind.

Nachfolgend sind die drei in CDPro implementierten Methoden dargelegt.

### SELCON3

Dieses Verfahren benutzt einen selbstkonsistenten (*self-consistent field* – SCF) Algorithmus, der auf Gleichung (2.57) aufbaut, und dessen Kern das Lösen folgender Matrixgleichung bildet<sup>[239]</sup>

$$\mathbf{F} = \mathbf{XC} . \quad (2.60)$$

<sup>17)</sup> Der Konsistenz halber wird die Original-Nummerierung von CDPro beibehalten.

In (2.60) ist  $\mathbf{F}$  die  $H \times K$ -Sekundärstruktur-Matrix,  $\mathbf{C}$  die  $J \times K$ -Spektralen-Matrix und  $\mathbf{X}$  eine Verknüpfungsmatrix der Dimension  $H \times J$ ; ihr kommt keine physikalische Interpretation zu.  $H$  ist die Zahl der angenommenen Sekundärstruktur-Klassen, aus denen Proteinstrukturen zusammengesetzt sein können,  $J$  die Anzahl der Wellenlängen in einem CD-Spektrum<sup>18)</sup> und  $K$  die Zahl der zur Auswertung von (2.60) verwendeten CD-Spektren. Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile eines gemessenen Proteins ist  $K = N_p + 1$ . Das heißt,  $\mathbf{C}$  setzt sich aus  $N_p$  Referenzspektren von Proteinen bekannter Struktur zusammen plus dem zu analysierenden CD-Spektrum, das durch den Vektor  $\mathbf{c}^{\text{CD}}$  in  $\mathbf{C}$  repräsentiert wird. Die CD-Amplituden eines Spektrums bilden einen Spaltenvektor von  $\mathbf{C}$ . Die Matrix  $\mathbf{F}$  ihrerseits ist ebenfalls eine Komposition von  $K$  Spaltenvektoren, welche die Sekundärstrukturanteile der einzelnen Proteine enthalten. Die Einbindung des gemessenen CD-Spektrums in die Matrix  $\mathbf{C}$  bzw. in das Gleichungssystem (2.60) verbessert wesentlich die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile.<sup>[243,244]</sup>

Zur Lösung von (2.60) werden als erstes die noch unbekanntenen Sekundärstrukturwerte des gemessenen Proteins – dargestellt durch den Spaltenvektor  $\mathbf{f}_1^{\text{CD}}$  mit den Komponenten  $f_{0,h}^{\text{CD}}$  ( $h = 1, 2, \dots, H$ ) – geschätzt und in  $\mathbf{F}$  ergänzt. Sodann wird mittels des *singular value decomposition (SVD)* Algorithmus<sup>[251]</sup> die Verknüpfungsmatrix  $\mathbf{X}$  bestimmt. Daraus ergibt sich der erste berechnete Sekundärstrukturvektor  $\mathbf{f}_1^{\text{CD}}$  zu

$$\mathbf{f}_1^{\text{CD}} = \mathbf{X} \mathbf{c}^{\text{CD}}. \quad (2.61)$$

Wie in Kap. 2.2.6 bereits erwähnt, können selbst Spektren von Proteinen ähnlicher Strukturanteile merklich voneinander abweichen. Es tragen daher nicht alle Referenzspektren eines umfangreichen Basissatzes zur Lösung von (2.60) wesentlich bei. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, führt SELCON3 mehrere Berechnungen von  $\mathbf{f}_1^{\text{CD}}$  mit kleineren Subbasissätzen der Dimension  $N_p$  durch, die sich in ihrer Zusammensetzung aus den Referenzspektren des großen Basissatzes unterscheiden. Die Komposition der Subbasissätze wird mittels des in [252] beschriebenen Selektionsverfahrens (*variables selection*) determiniert. Der nächste Schritt besteht in einer ersten Auswahl der erhaltenen Lösungen, wobei folgende zwei Randbedingungen herangezogen werden:

1. Fraktionsregel:  $f_{1,h}^{\text{CD}} > -0,025, \quad \forall h = 1, 2, \dots, H,$
2. Summenregel:  $\left| \sum_{h=1}^H f_{1,h}^{\text{CD}} - 1,0 \right| \leq 0,05.$

Lösungen, welche beiden Kriterien genügen, werden dem SCF-Verfahren durch iteratives Einsetzen der  $\mathbf{f}_i^{\text{CD}}$  ( $i = 1, 2, 3, \dots$ ) in  $\mathbf{F}$  solange unterworfen, bis die Konver-

<sup>18)</sup> CD-Spektren liegen stets als eine Serie von diskreten Messpunkten und nicht als kontinuierlicher Verlauf vor

genzkriterien erfüllt sind. Diese verwenden die 6 Differenzen  $\Delta\sigma_h$  der mittleren quadratischen Abweichungen  $\sigma_{i,h}$  der einzelnen Sekundärstruktur-Klassen  $h$ , wobei  $h = \alpha_r, \alpha_d, \beta_r, \dots$  bzw. 1, 2, ..., H ist, zwischen der  $i$ -ten und der  $(i+1)$ -ten Iteration

$$\Delta\sigma_h = |\sigma_{i+1,h} - \sigma_{i,h}|, \quad (2.62)$$

mit

$$\sigma_{i,h} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N_p} (f_{i,h}^{CD} - f_h^{\text{ref}}(n))^2}{N_p}}. \quad (2.63)$$

Die  $f_{i,h}^{CD}$  beziehen sich auf das gemessene Protein, und die Sekundärstruktur-Anteile  $f_h^{\text{ref}}(n)$  gehören zu dem  $n$ -ten Referenzprotein aus dem Protein-Subbasissatz der Dimension  $N_p$ . Die Selbstkonsistenz wird als erreicht angesehen, wenn für alle Strukturklassen gilt

$$\Delta\sigma_h < 0,0025 \quad (\text{Kovergenzkriterium}).^{19)}$$

Eine letzte Selektion der so erhaltenen Lösungen wird durch Anwendung zweier weiterer Auswahlregeln getroffen.

$$3. \quad \text{Spektralregel: } \sigma_{\text{spec}} \leq 0,25 \quad \text{mit } \sigma_{\text{spec}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J (y_j^{CD} - y_j^{\text{calc}})^2}{J}}. \quad [253]$$

$y_j^{CD}$  und  $y_j^{\text{calc}}$  sind die CD-Amplituden des gemessenen CD-Spektrums und des rekonstruierten. Letzteres wird durch Superposition der in dem jeweiligen Subbasissatz enthaltenen Proteinspektren unter Berücksichtigung der relevanten Matrixelemente von  $\mathbf{X}$  nach Gl. (2.57) berechnet.  $J$  ist gleich der Zahl der Spektren-Wellenlängen.

4. Helixregel: Dieses Kriterium nutzt die Beobachtung aus, dass sich der Helixanteil eines Proteinspektrums unter Einbeziehung einer großen Anzahl von Proteinen sehr genau berechnen lässt. Gleichung (2.60) wird daher einmal unter Einbeziehung aller Referenzspektren eines kompletten Basissatzes iterativ gelöst ( $N_p = N$ ), was den Helixanteil  $f_{\alpha, \text{HJ}}^{CD}$  liefert.

Damit eine mit einem Subbasissatz der Dimension  $N_p$  berechnete Lösung von (2.60) auch der 4. Auswahlregel genügt, muss ihr  $f_{\alpha}^{CD}$ -Wert folgende Bedingung erfüllen<sup>[242]</sup>

<sup>19</sup> Niedrigere Grenzwerte haben oftmals ein Oszillieren von  $\mathbf{f}^{CD}$  zur Folge und liefern keine besseren Lösungen.

- $f_{\alpha}^{\text{CD}} > 0,65$ , falls  $0,65 < f_{\alpha, \text{HJ}}^{\text{CD}}$ ;
- $f_{\alpha}^{\text{CD}} = \frac{f_{\alpha, \text{HJ}}^{\text{CD}} + f_{\alpha, \text{max}}^{\text{CD}}}{2} \pm 0,03$ , falls  $0,25 < f_{\alpha, \text{HJ}}^{\text{CD}} < 0,65$ ;
- $f_{\alpha}^{\text{CD}} = \frac{f_{\alpha, \text{HJ}}^{\text{CD}} + f_{\alpha, \text{ave}}^{\text{CD}}}{2} \pm 0,03$ , falls  $0,15 < f_{\alpha, \text{HJ}}^{\text{CD}} < 0,25$ ;
- $f_{\alpha}^{\text{CD}} = \frac{f_{\alpha, \text{HJ}}^{\text{CD}} + f_{\alpha, \text{min}}^{\text{CD}}}{2} \pm 0,03$ , falls  $f_{\alpha, \text{HJ}}^{\text{CD}} < 0,15$ .

Die Werte  $f_{\alpha, \text{max}}^{\text{CD}}$ ,  $f_{\alpha, \text{ave}}^{\text{CD}}$  und  $f_{\alpha, \text{min}}^{\text{CD}}$  sind der maximale, der mittlere und der minimale  $f_{\alpha}$ -Wert aller Lösungen, welche die ersten 3 Auswahlkriterien erfüllt haben.

Genügt keine Lösung allen 4 Konvergenzkriterien, werden die Grenzwerte relaxiert. Ansonsten ist die endgültig-bestimmte Sekundärstruktur der Mittelwert sämtlicher nach Erfüllung der 4 Auswahlregeln noch verbleibender Lösungen.

### *CDSSTR*

Der Kern dieser Methode beruht auf der Erfahrung, dass die Summe der berechneten Sekundärstruktur-Anteile  $f_h$  (mit  $h = \alpha_r, \alpha_d, \beta_r, \dots$ ) häufig stark von 1,0 abweicht, falls man das bei SELCON3 beschriebene SCF-Verfahren mit einem vergleichsweise großen Basissatz (bestehend aus beispielsweise 20 Spektren oder mehr) anwendet.<sup>[242]</sup> Deutlich bessere Ergebnisse werden dagegen erzielt, wenn der Basissatz klein gehalten wird.

CDSSTR folgt im wesentlichen der Vorgehensweise, die auch SELCON3 nutzt. Der Hauptunterschied besteht in der Auswahl der Subbasissätze und ihrer Dimension. Es werden ausschließlich Subbasissätze bestehend aus 8 Proteinspektren verwendet. Bei einem Basissatz bestehend aus insgesamt 20 Spektren existieren somit bereits 125970 mögliche Subbasissätze der Dimension  $N_p = 8$ , und für einen Basissatz mit  $N = 30$  wächst diese Zahl auf ca.  $5,8 \cdot 10^6$ . Deshalb wird, den Ausführungen von Dalmas und Bannister folgend,<sup>[254]</sup> nach dem Monte Carlo Verfahren eine limitierte Anzahl von Subbasissätzen, die in der Größenordnung von 10000 liegt, ausgewählt. Der weitere Verlauf der Auswertung ist identisch mit dem von SELCON3.

Während jedoch SELCON3 für das Fitten eines gemessenen Spektrums nur ca. 10sec benötigt, variiert diese Zeitspanne bei CDSSTR zwischen 30sec und 10min.

### *CONTINLL*

Der Algorithmus basiert auf dem von Provencher und Glöckner entwickelten Programm namens CONTIN.<sup>[255]</sup> Ausgangspunkt dieses Verfahrens ist Gleichung

(2.57). A priori ist es nicht möglich für ein beliebiges CD-Spektrum eine Vorhersage zu treffen, welche Referenzspektren eines Basissatzes für eine gute Adaption in (2.57) einzubeziehen sind. Eine denkbare Lösung wäre deshalb, möglichst viele Spektren in das Lineargleichungssystem mit hinein zu nehmen. Allerdings involviert dies eine gewisse Überbestimmtheit und damit nicht mehr eindeutige Lösbarkeit von (2.57). Will man dennoch diesen Weg einschlagen, bietet sich die Verwendung einer Singulärwertzerlegung nach dem Regularisierungs-Verfahren an. Die Anwendung dieser Methode auf (2.57) führt zu der Kern-Gleichung von CONTIN

$$\sum_{j=1}^J \left( y_j^{\text{CD}} - \underbrace{\sum_{n=1}^N c_n y_{n,j}^{\text{ref}}}_{=y_j^{\text{calc}}} \right)^2 + \alpha^2 \underbrace{\sum_{n=1}^N \left( c_n - \frac{1}{N} \right)^2}_{\text{Regularisierungsterm}} = \text{minimal} . \quad (2.64)$$

In (2.64) ist der sog. Regularisierungsfaktor  $\alpha$  stets größer Null und liegt typischerweise im Bereich von 0,1–0,9. Die Funktion des Regularisierungsterms in (2.64) besteht darin, die Koeffizienten  $c_n$  in der Größenordnung von  $N^{-1}$ , also klein und die Lösung von (2.64) damit stabil zu halten. Diese Restriktion gilt nicht, wenn eines der Referenzspektren dem gemessenen CD-Spektrum – zumindest in einem weiten Wellenlängenbereich – ähnlich ist. Denn in diesem Fall überkompensiert die Erniedrigung des ersten Terms in (2.64) die simultan auftretende Vergrößerung des zweiten.

Bei Kenntnis sämtlicher Linearkombinations-Koeffizienten  $c_n$  aus (2.57) können unmittelbar die Sekundärstruktur-Anteile  $f_h^{\text{CD}}$  eines Proteins ermittelt werden gemäß

$$f_h^{\text{CD}} = \sum_{n=1}^N c_n f_h^{\text{ref}}(n), \quad h = 1, 2, \dots, H, \quad (2.65)$$

mit  $H$  als der Gesamtzahl der Strukturklassen.

Trotz dieser Vorgehensweise kann die Anwendung größerer Basissätze auch bei CONTIN mitunter zu Instabilitäten<sup>20)</sup> führen.<sup>[256,257]</sup> Einen Ausweg bietet wieder die Wahl mehrerer kleinerer Basissätze. Die Lösungen von (2.64) und (2.65) werden sodann mittels der von Lawson und Hanson<sup>[258]</sup> bzw. von Provencher<sup>[259,260]</sup> zur Verfügung gestellten Least-Square-Programmprozedur berechnet. Die erhaltenen Lösungen werden dem gleichen Auswahlverfahren wie bei SELCON3 und CDSSTR unterworfen, allerdings unter Verwendung einer verschärften Summen- sowie Fraktionsregel

$$\sum_{h=1}^H f_h = 1 \quad \text{bzw.} \quad f_h \geq 0, \quad \forall h = 1, 2, \dots, H.$$

<sup>20)</sup> Bei instabilen Algorithmen, kann im Lauf der Iterationen die dem Konvergenzkriterium zugrunde liegende Größe (z.B. eine quadratische Abweichung) nach Durchlaufen eines lokalen oder des absoluten Minimums wieder anwachsen. Dadurch liefert der Algorithmus u.U. schlechtere Ergebnisse als prinzipiell möglich wäre.

## 2.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

### 2.3.1 Lichtstreuung durch Partikel in Lösung

Partikeleigenschaften, wie Molekülgewicht, Größe, Form, aber auch Aussagen über die Aggregationsneigung von Teilchen (intermolekulare Wechselwirkung – Attraktivität/Repulsion) werden heutzutage vielfach mittels Lichtstreutechniken untersucht.<sup>[261]</sup> Dabei unterscheidet man zwischen inelastischer und elastischer Streuung, wobei letztere wiederum in statische und dynamische Lichtstreuung (*dynamic light scattering* – DLS) untergliedert ist.

In DLS-Experimenten wird Licht mit einer konstanten Wellenlänge  $\lambda$ , bei der die Lösung möglichst nicht absorbiert, eingestrahlt. Aus dem Wellenvektor  $\vec{k}_i$  des auf ein gelöstes Teilchen einfallenden Laserlichts, mit  $k_i = 2\pi/\lambda_{\text{Lsg}} = 2\pi n_{\text{Lsg}}/\lambda_{\text{Vak}}$ , und dem am Detektor ankommenden Wellenvektor  $\vec{k}_r$  des gestreuten Lichts ergibt sich unter der Voraussetzung  $k_i = k_r$  der Streuvektor  $\vec{q} = \vec{k}_r - \vec{k}_i$  mit  $\theta$  als Streuwinkel zu

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi n_{\text{Lsg}}}{\lambda_{\text{Vak}}} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (2.66)$$

$n_{\text{Lsg}}$  ist der Brechungsindex der Lösung (inklusive der gelösten Teilchen) und  $\lambda_{\text{Vak}}$  die Laserwellenlänge im Vakuum. Der Brechungsindex  $n_{\text{Lsg}} = n_{\text{Lsgm}} + C \cdot (dn/dC)$  setzt sich aus dem Brechungsindex des Lösungsmittels  $n_{\text{Lsgm}}$  und der Änderung von  $n_{\text{Lsg}}$  durch Zugabe der zu lösenden Moleküle in der Massenkonzentration  $C$  [mg/ml] zusammen.  $dn/dC$  ist das Brechungsinkrement der Lösung. Da allerdings  $dn/dC$  vielfach nicht bekannt ist, wird normalerweise  $n_{\text{Lsg}} = n_{\text{Lsgm}}$  gesetzt. Der dadurch bedingte Fehler liegt kaum über 1%.<sup>21)</sup>

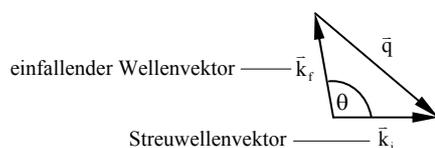


Abbildung 2.17: Streuvektor  $\vec{q}$ .

<sup>21)</sup> Zur Abschätzung dieses Fehlers wird ein  $dn/dC$  von 0,2ml/mg, und eine Konzentration von  $C = 50\text{mg/ml}$  in wässrigem Medium –  $n(\text{H}_2\text{O}) = 1,334$  – angenommen. Sowohl der Wert für  $dn/dC$ , als auch derjenige für  $C$  liegen im oberen Grenzbereich. Bei höheren Konzentrationen würden mit Sicherheit Partikel-Partikel-Interaktionen auftreten, was eine Verfälschung der Ergebnisse mit sich brächte (s. Kap. 3.7 – *Partikel-Partikel-Interaktionen*). Unter den genannten Bedingungen würde sich  $n$  auf 1,344 ändern, also exakt um 1%.

Nach Zimm<sup>[262,263]</sup> kann die Streuintensität  $I_{sc}(q, C)$  eines Einheitsvolumens in einer Lösung durch eine Virialentwicklung beschrieben werden

$$I_{sc}(q, C) = K \left[ MP(q, R_H)C - 2A_2 M^2 P^2(q, R_H)C^2 + \dots \right]. \quad (2.67)$$

$M$  ist die Molmasse,  $A_2$  der zweite Virialkoeffizient [ml/Mol] und  $P(q, R_H)$  der sog. Form- oder Strukturfaktor mit  $R_H$  als dem hydrodynamischen Radius der zu untersuchenden Teilchen. Der Proportionalitätsfaktor  $K$  in Gleichung (2.67) beträgt

$$K = \frac{\left( 2\pi \frac{dn_{Lsg}}{dC} n_{Lsgm} \right)^2}{\lambda^4 N_A}, \quad (2.68)$$

wobei  $N_A$  die Avogadro-Konstante bezeichnet.

Der zweite Virialkoeffizient  $A_2$  berücksichtigt Partikel-Partikel-Interaktionen.<sup>[264]</sup> Ist  $A_2$  negativ, dominieren attraktive Kräfte zwischen den Molekülen, und umgekehrt für  $A_2 > 0$  existiert eine effektive Abstoßung zwischen den Teilchen. Die Temperaturabhängigkeit von  $A_2$  ist qualitativ in Abb. 3.18 dargestellt. Im Falle von Flüssigkeiten ist bei der Siedetemperatur (*boiling temperature*)  $T_b$  der zweite Virialkoeffizient gerade gleich Null.

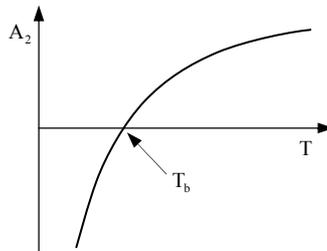


Abbildung 2.18: Qualitativer Verlauf des zweiten Virialkoeffizienten  $A_2$  einer beliebigen Teilchenspezies in Abhängigkeit von der Temperatur.

Der sog. geometrische Form- oder Strukturfaktor  $P(q, R_H)$  in Gl. (2.67) definiert sich über<sup>[265]</sup>

$$P(q, R_H) = \frac{I_{sc}(q, R_H)}{I_{sc}(q=0, R_H)}, \quad 0 < P(q, R_H) \leq 1. \quad (2.69)$$

Er berücksichtigt Interferenzen des Streulichts  $I_{sc}$  von verschiedenen Punkten eines Teilchens in Abhängigkeit vom Streuwinkel  $\theta$  und damit auch von  $q$ . Strukturfaktoren

ren wurden für verschiedene Geometrien berechnet.<sup>[266]</sup> Im Fall von Sphären erhält man

$$P(q, R_H) = \left[ \frac{3}{(qR_H)^3} (\sin(qR_H) - qR_H \cos(qR_H)) \right]^2. \quad (2.70)$$

Für  $R_H \ll \lambda$  gilt für den Strukturfaktor einer Kugel nach Gl. (2.70)  $P(q, R_H) = 1$ .<sup>22)</sup>

Stäbchenförmige Moleküle der Länge  $L$  (im Grenzfall unendlich dünnen Durchmessers) liefern<sup>[262,265]</sup>

$$P(q, L) = \frac{2}{qL} \int_0^{qL} \frac{\sin x}{x} dx - \left( \frac{2}{qL} \sin\left(\frac{qL}{2}\right) \right)^2; \quad (2.71)$$

und Moleküle mit ungeordneter Struktur, wie etwa entfaltete Proteine besitzen einen Strukturfaktor von

$$P(q, R_G) = \frac{2}{(qR_G)^4} \left[ \exp(-q^2 R_G^2) + (qR_G)^2 - 1 \right]. \quad (2.72)$$

Der Gyrationradius  $R_G$  – auch effektiver Radius genannt – eines Moleküls mit dem Schwerpunkt  $\bar{R}$  ist definiert als

$$R_G^2 = \frac{\int \rho(\bar{r}) (\bar{r} - \bar{R})^2 d^3r}{\int \rho(\bar{r}) d^3r}. \quad (2.73)$$

Sind die Moleküldimensionen verglichen mit der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts ( $\Rightarrow qR_G \ll 1$ ) klein, lässt sich (2.72) durch eine Taylor-Entwicklung nach  $qR_G$  näherungsweise schreiben als  $P(q, R_G) \cong 1 - \frac{1}{3} q^2 R_G^2$ .

Ein einfacher Zusammenhang zwischen  $R_H$  und  $R_G$  kann nicht angegeben werden. Abhängig von der Partikelstruktur kann  $R_G$  kleiner oder größer als  $R_H$  sein. Ersteres ist etwa bei einer homogenen Kugel der Fall, wo  $R_G = \sqrt{3/5} \cdot R_H$  gilt. Dagegen ist z.B. für Ellipsoide bei entsprechender Massenverteilung auch  $R_G > R_H$  möglich.

<sup>22)</sup> Durch die Reihendarstellung von  $\sin(x)$  und  $\cos(x)$ :

$$\sin x = x - \frac{x^3}{3!} + \frac{x^5}{5!} \mp \dots, \quad \text{bzw.} \quad \cos x = 1 - \frac{x^2}{2!} + \frac{x^4}{4!} \mp \dots$$

lässt sich mittels Gl. (2.69) sofort zeigen, dass  $P(q, R_H)$  eines sphärischen Teilchens für  $\lim_{q \rightarrow 0}$  tatsächlich gegen Eins geht.

### 2.3.2 Korrelationsfunktionen

Das Grundprinzip der Messung von Partikelgrößen in Lösung – charakterisiert durch deren hydrodynamischen Radius  $R_H$  – mittels DLS besteht darin, die Streuintensität in Abhängigkeit von der Zeit zu messen, und daraus eine Autokorrelationsfunktion  $G(t)$  zu berechnen.

Prinzipiell ist eine Autokorrelationsfunktion einer beliebigen zeitabhängigen Größe  $\xi(t')$  definiert als

$$\begin{aligned} G(t) &= \langle \xi(t') | \xi(t'+t) \rangle \\ &= \int \xi^*(t') \cdot \xi(t'+t) dt'. \end{aligned} \quad (2.74)$$

$G(t)$  gibt Auskunft über die Zeitdauer, in der die Bewegung eines gelösten Teilchens vom Zeitpunkt  $t' = 0$  bis zum Zeitpunkt  $t' = t$  noch nachverfolgt werden kann. Je schneller sich ein Teilchen bewegt, desto schneller geht die Korrelation verloren. Da Partikel in Lösung, aufgrund der Wechselwirkung mit den Lösungsmittelmolekülen sich im Mittel umso langsamer bewegen, je größer sie sind, kann ihr hydrodynamischer Radius durch Messung ihrer Korrelationsfunktion bestimmt werden.

In der Photonenkorrelations-Spektroskopie (*photon correlation spectroscopy* – PCS) unterscheidet man zwischen *homodyner* und *heterodyner* Messmethode. Erstere detektiert nur Streulicht, während letztere zusätzlich einen Teil des Primärlichts in die Detektion einkoppelt.

Allgemein kann die Lichtwelle, die zum Zeitpunkt  $t$  am Detektor eintrifft, geschrieben werden als

$$\bar{E}(t) = \sum_{j=1}^N \frac{\bar{k}_j}{|\bar{k}_j|} \cdot a_j e^{i(\bar{k}_j \bar{r} - \omega_j t)}. \quad (2.75)$$

$N$  sei die Zahl der Lichtquellen, von denen Photonen ausgesandt werden. Im Fall einer homodynen Messung gibt  $N$  die Zahl der Streuzentren an. Die Stärke des gestreuten Lichts von den einzelnen Quellen ist durch die Amplituden  $a_j$  bestimmt, und  $\omega_j$  ist die jeweils zugehörige Winkelgeschwindigkeit. Für die mittlere, am Detektor gemessene Intensität ( $I = P/A$ ,  $[I] = J/(s \cdot m^2)$ ) erhält man

$$\langle I_{sc} \rangle = \langle |\bar{E}|^2 \rangle = \frac{1}{T} \int_{t=0}^T I(t) dt. \quad (2.76)$$

Die Zeit  $T$  wird so groß gewählt, dass  $\langle I_{sc} \rangle$  praktisch unabhängig von  $T$  ist.

Die *Amplituden-* oder *Feldkorrelationsfunktion*  $G_1(t)$  (= Korrelationsfunktion 1. Ordnung) in heterodyner Detektion korreliert die elektrischen Feldamplituden  $E(0)$  und  $E(t)$  des am Detektor eintreffenden Lichts.<sup>[267]</sup>

$$\begin{aligned} G_1(t) &= \langle E^*(0) | E(t) \rangle \\ &= \langle I_{sc} \rangle \cdot e^{-q^2 D t} \end{aligned} \quad (2.77)$$

Der exponentielle Abfall von  $G_1(t)$  besagt, dass die Korrelation umso eher verloren geht, je größer die Diffusionskonstante der Teilchen ist, d.h. je schneller sie sich in Lösung bewegen.

In Gl. (2.77) wird beim Übergang von der ersten in die zweite Zeile die Einstein-Gleichung ausgenutzt, die das mittlere Verschiebungsquadrat  $\langle \Delta \bar{r}(t)^2 \rangle$  der Brownschen Bewegung eines gelösten Teilchens innerhalb der Zeit  $t$  mit dessen Diffusionskonstante  $D$ ,  $[D] = \text{m}^2/\text{s}$ , in Relation setzt. In einer Dimension lautet die Einstein-Gleichung für  $\langle \Delta x(t)^2 \rangle = \langle [x(t') - x(t'+t)]^2 \rangle$

$$\langle \Delta x(t)^2 \rangle = 2Dt. \quad (2.78)$$

Die Normierung von  $G_1(t)$  auf die mittlere Lichtintensität  $\langle I_{sc} \rangle$  am Detektor, liefert  $g_1(t)$ , mit

$$g_1(t) = e^{-q^2 D t}. \quad (2.79)$$

Photonenkorrelations-Geräte, die ausschließlich im homodynen Modus messen, nutzen statt der Feldkorrelationsfunktion die *Intensitäts-Korrelationsfunktion*  $G_2(t)$  (Korrelationsfunktion 2. Ordnung) zur Bestimmung von  $R_H$  mit<sup>[267]</sup>

$$\begin{aligned} G_2(t) &= \langle I_{sc}(0) | I_{sc}(t) \rangle \\ &= \langle |E(0)|^2 | |E(t)|^2 \rangle \\ &= \langle I_{sc}^2 \rangle \cdot (1 + e^{-2q^2 D t}). \end{aligned} \quad (2.80)$$

Aufgrund der Bewegung der Teilchen und den damit verbundenen Interferenzfluktuationen am Detektor ist die Streuintensität  $I_{sc}$  nicht konstant, sondern eine Funktion der Zeit. Die Autokorrelation von  $I_{sc}(t)$  enthält daher ebenso wie diejenige der elektrischen Feldamplitude  $E(t)$  ( $\rightarrow G_1(t)$ ) Informationen über die Ortsfluktuationen der Streuzentren in der Probe.

Analog zu  $g_1(t)$  leitet sich  $g_2(t)$  aus der Normierung von Gl. (2.80) auf das mittlere Quadrat der Streuintensität ab.

Die *Siegert-Relation*

$$g_2(t) = 1 + |g_1(t)|^2. \quad (2.81)$$

setzt  $g_1(t)$  und  $g_2(t)$  zueinander in Beziehung.

**Anmerkung:**

Die endliche Kohärenz des Lichtes am Detektor bedingt eine reduzierte Korrelationsfunktion 2. Ordnung  $g_2(t) = 1 + \beta \cdot \exp(-2Dq^2 t)$ . Der Parameter  $\beta$  wird üblicherweise aus dem aktuellen Korrelogramm durch Interpolation von  $g_2(t)$  mit  $t \rightarrow 0$  ermittelt.

Für  $g_2(t)$  lässt sich die Korrelationszeit  $\tau_c$  bzw. eine Zerfallsrate  $\Gamma$  wie folgt definieren

$$\Gamma = \frac{1}{\tau_c} = Dq^2, \quad [\text{Hz}]. \quad (2.82)$$

Beim Übergang von einer monomodalen zu einer polydispersen Verteilung, bestehend aus  $N$  diskreten Partikelsorten, deren Streuintensitäts-Wichtungen durch die Koeffizienten  $a_i$  festgelegt seien, erhält die normierte Intensitäts-Korrelationsfunktion nach Gleichung (2.80) die Gestalt

$$g_2(t) = 1 + \left( \sum_{i=1}^Z a_i \exp(-\Gamma_i t) \right)^2. \quad (2.83)$$

Für eine kontinuierliche Verteilung muss Gl. (2.83) durch Einführung einer Verteilungsfunktion verallgemeinert werden. Damit lässt sich  $g_2(t)$  mittels der normierten Verteilungsfunktion  $f(\Gamma)$  bzw. mit Hilfe der gemessenen Streulichtintensität  $I_{sc}$  schreiben als

$$g_2(t) = 1 + \left( \int_0^{\infty} f(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma \right)^2 = \frac{\int_{t=0}^T I_{sc}(t') \cdot I_{sc}(t'+t) dt'}{\int_{t=0}^T I_{sc}(t')^2 dt'}, \quad \text{mit } \int_0^{\infty} f(\Gamma) d\Gamma = 1 \quad (2.84)$$

*Heterodyne versus homodyne Messmethode*

Der experimentelle Aufbau für heterodyne Messungen erfordert das Einkoppeln von Primärlicht in das auf den Detektor treffende Streulicht. Die technische Realisierung mittels eines Interferometers macht derlei Geräte ausgesprochen empfindlich gegenüber äußeren Vibrationen, thermischen Drifts und ähnliches. Daher arbeiten die meisten PCS-Geräte, ebenso wie das von MALVERN vertriebene HPPS, mit dem die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen aufgenommen wurden, im homodynen Modus, obgleich die in  $g_2(t)$  auftretenden Cross-Terme die Analyse der Korrelationsfunktion bei polydispersen Lösungen erschweren.<sup>23)</sup>

<sup>23)</sup> Bei der Addition zweier oder mehrerer Exponentialfunktionen mit anschließender Quadrierung enthält  $g_2(t)$  Cross-Terme der Art:  $2 \cdot \exp(-(\Gamma_i + \Gamma_j) \cdot t)$ .

### 2.3.3 Berechnung des hydrodynamischen Radius $R_H$

#### Laplace-Transformation

Da  $g_1(t)$  (vgl. Gl. (2.84) unter Berücksichtigung der Siegert-Relation!) die Laplace-Transformierte von  $f(\Gamma)$  ist,<sup>24</sup> muss eine inverse Laplace-Transformation durchgeführt werden, um aus einer gemessenen Korrelationsfunktion die Verteilungsfunktion  $f(\Gamma)$  aus Gl. (2.84) und aus dieser dann  $R_H$  zu erhalten:

$$f(\Gamma) = \frac{1}{2\pi i} \int_{-i\infty}^{+i\infty} e^{+\Gamma t} g_1(t) dt. \quad (2.85)$$

Für die Bestimmung von  $R_H$  aus  $f(\Gamma)$  ist der Diffusionskoeffizient  $D$  durch die *Einstein-Gleichung*

$$D = \frac{k_B T}{f_{\text{trans}}}, \quad [\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]. \quad (2.86)$$

auszudrücken.  $f_{\text{trans}}$  ist der Reibungskoeffizient der Translationsbewegung der Partikel in Lösung. Nach Berne und Pecora<sup>[266]</sup> haben Rotationsdiffusionen keinen Einfluss auf die Messung von Korrelationsfunktionen mittels DLS, da bei Rotationen keine Ortsänderungen stattfinden. Der messbare Diffusionskoeffizient wird somit allein durch Translationsbewegungen bestimmt.  $f_{\text{trans}}$  gehorcht bei harten Sphären in einer Lösung mit starker Wechselwirkung zwischen den gelösten Teilchen und den Lösungsmittel-Molekülen (*stick boundary condition*), dem *Stokes-Gesetz*

$$f_{\text{trans}}^{\text{sph}} = 6\pi\eta R_H \quad (2.87)$$

Damit kann  $D$  durch Einsetzen von (2.87) in (2.86) über die *Stokes-Einstein-Gleichung* formuliert werden

$$D = \frac{k_B T}{f_{\text{trans}}^{\text{sph}}} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}; \quad (2.88)$$

<sup>24</sup> Die *Laplace-Transformation* definiert sich wie folgt:

Sei  $f(\Gamma)$  eine komplexwertige Funktion der reellen Variablen  $\Gamma$  und  $t$  eine komplexe Veränderliche. Dann bezeichnet man die Funktion

$$g(t) = \int_0^{\infty} e^{-\Gamma t} f(\Gamma) d\Gamma$$

als die *Laplace-Transformierte* von  $f(\Gamma)$  und schreibt  $g(t) = \mathcal{L}\{f(\Gamma)\}$ .

Für die Rücktransformation gilt im Falle, dass  $\Gamma$  eine reellwertige Variable ist:

$$\mathcal{L}^{-1}\{f(\Gamma)\} = \frac{1}{2\pi i} \int_{-i\infty}^{+i\infty} e^{+\Gamma t} g(t) dt = \begin{cases} f(\Gamma) & \text{für } \Gamma > 0 \\ 0 & \text{für } \Gamma < 0 \end{cases}$$

$k_B$  ist die Boltzmann-Konstante ( $k_B = 1,38065 \cdot 10^{-23} \text{J/K}$ ),  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin und  $\eta$  die Viskosität des Lösungsmittels in Einheiten von  $\text{Pa}\cdot\text{s} = \text{kg}/(\text{m}\cdot\text{s})$ .

Aus Gl. (2.82) kann jetzt eine Beziehung zwischen der Korrelationszeit  $\tau_c$  und  $R_H$  unter Ausnutzung von (2.66) und (2.88) aufgestellt werden

$$\tau_c = \frac{3}{8\pi} \frac{\eta}{k_B T} \cdot \left( \frac{\lambda_{\text{vak}}}{n_{\text{Lsgm}} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)} \right)^2 R_H. \quad (2.89)$$

Mit Hilfe der Gleichung (2.89) lässt sich ein Umrechnungsfaktor zwischen  $\tau_c$  und  $R_H$  zur Durchführung von Überschlagsrechnungen abschätzen. Man erhält für Wasser als Lösungsmittel bei  $25^\circ\text{C}$  und einer Viskosität von  $0,89 \text{mPa}\cdot\text{s}$  sowie einer Laserwellenlänge von  $632,8 \text{nm}$

$$\tau_c [\text{ms}] = \frac{R_H(T = 25^\circ\text{C}) [\text{nm}]}{171, (0)}. \quad (2.90)$$

#### Reibungskoeffizienten für elliptische Teilchen

Die Geometrie vieler Moleküle weicht mehr oder weniger stark von der einer Kugel ab. Als eine erste Näherung kann das Molekül in diesem Fall möglicherweise als rotationsymmetrischer Ellipsoid behandelt werden. Die Symmetrieachse stehe dabei parallel zur  $z$ -Achse. Die Halbachse in  $z$ -Richtung sei  $a$ , und die dazu senkrechte sei  $b$ , womit sich das Volumen des Ellipsoids zu  $V = (4/3) \cdot \pi a b^2$  bestimmt. Die Stokes-Reibungskoeffizienten für eine Sphäre mit dem gleichen Volumen wie das des betrachteten Ellipsoids lauten im Falle von *stick boundary* Bedingungen<sup>25)</sup>

$$f_{\text{trans}}^{\text{sph}} = 6\pi\eta (ab^2)^{\frac{1}{3}}, \quad (2.91)$$

$$f_{\text{rot}}^{\text{sph}} = 6\pi\eta \frac{4}{3} ab^2. \quad (2.92)$$

<sup>25)</sup> Bei starker Wechselwirkung (*stick boundary conditions*) zwischen den gelösten Partikeln und den Lösungsmittel-Molekülen existiert um jedes Teilchen eine Lösungsmittelschicht, welche die gleiche Translationsgeschwindigkeit wie das Teilchen selbst hat.

Der Rotationsreibungskoeffizient lautet in diesem Fall  $f_{\text{rot}}^{\text{sph}} = 6\pi\eta \frac{4}{3} R_H^3$ .

Existieren lediglich schwache Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelösten Teilchen, spricht man von *slip boundary conditions*, da die Lösungsmittel-Moleküle weitgehend an den Partikeln vorbeigleiten. Für die Reibungskoeffizienten erhält man dann

$$f_{\text{trans}}^{\text{sph}} = 4\pi\eta R_H \quad \text{und} \quad f_{\text{rot}}^{\text{sph}} = 0.$$

Da die Reibung zwischen einem Partikel und den Lösungsmittel-Molekülen u.a. von der Größe der Oberfläche des Teilchens abhängt, wird  $f$  für einen Ellipsoid umso größer sein, je größer dessen Oberfläche ist d.h. je stärker seine Form von der einer Kugel abweicht. Nach Perrin <sup>[268,269]</sup> lautet  $f_{\text{trans}}$  und  $f_{\text{rot}}$  in Abhängigkeit vom Achsenverhältnis  $p = b/a$

$$f_{\text{trans}} = \begin{cases} f_{\text{trans}}^{\text{sph}} \cdot \frac{\sqrt{1-p^2}}{p^{\frac{2}{3}}} \cdot \frac{1}{\ln\left(\frac{1+\sqrt{1-p^2}}{p}\right)}, & \text{mit } p < 1 \quad (\text{prolater Ellipsoid}) \\ f_{\text{trans}}^{\text{sph}} \cdot \frac{\sqrt{p^2-1}}{p^{\frac{2}{3}}} \cdot \frac{1}{\arctan(\sqrt{p^2-1})}, & \text{mit } p > 1 \quad (\text{oblater Ellipsoid}) \end{cases} \quad (2.93)$$

$$f_{\text{rot}} = \begin{cases} f_{\text{rot}}^{\text{sph}} \cdot \frac{3}{2} \cdot \frac{1 - \frac{p^2}{\sqrt{1-p^2}} \cdot \ln\left(\frac{1+\sqrt{1-p^2}}{p}\right)}{1-p^2}, & \text{mit } p < 1 \quad (\text{prolater Ellipsoid}) \\ f_{\text{rot}}^{\text{sph}} \cdot \frac{3}{2} \cdot \frac{\frac{p^2}{\sqrt{p^2-1}} \cdot \arctan(\sqrt{p^2-1}) - 1}{p^2-1}, & \text{mit } p > 1 \quad (\text{oblater Ellipsoid}). \end{cases} \quad (2.94)$$

Mittels der Stokes-Gleichung (2.87) lässt sich jetzt durch Einsetzen von (2.91) in (2.93) eine Beziehung zwischen dem messbaren hydrodynamischen Radius  $R_{\text{H,meas}}$  und den ellipsoidalen Halbachsen herstellen

$$R_{\text{H,meas}} = \begin{cases} \frac{\sqrt{a^2-b^2}}{\ln\left(\frac{a+\sqrt{a^2-b^2}}{b}\right)}, & \text{mit } p < 1 \quad (\text{prolater Ellipsoid}) \\ \frac{\sqrt{b^2-a^2}}{\arctan\left(\frac{\sqrt{b^2-a^2}}{a}\right)}, & \text{mit } p > 1 \quad (\text{oblater Ellipsoid}). \end{cases} \quad (2.95)$$

Vielfach wird bei Untersuchungen von Teilchen in Lösungen der *Shape-* bzw. *Per-rin-Faktor*  $F$ ,<sup>[270]</sup> benutzt

$$F = \frac{f_{\text{trans}}}{f_{\text{trans}}^{\text{sph}}} \quad (2.96)$$

Wenn  $F$  für die interessierenden Moleküle bereits anderweitig bestimmt wurde, reduziert sich die ellipsoidale Behandlung auf die einer Kugel mit dem messbaren Reibungskoeffizienten

$$\begin{aligned} f_{\text{trans}}^{\text{meas}} &= 6\pi\eta R_{\text{H,sph}} \cdot F \\ &= 6\pi\eta R_{\text{H,meas}} \end{aligned} \quad (2.97)$$

### 2.3.4 Wichtungen von Partikelverteilungen

#### *Intensitäts-gewichtete Zerfallszeit- und Radius-Verteilungsfunktion*

Die zur Streulichtintensität  $I_{\text{sc}}$  proportionalen Amplituden der Zerfallszeitfunktion  $f(\tau_c)$  lassen sich mit Hilfe der in Gl. (2.89) aufgestellten linearen Beziehung zwischen  $\tau_c$  und  $R_{\text{H}}$  in das *Intensitäts-gewichtete Radiusspektrum*<sup>26)</sup> mit den Amplituden  $c_l$  umrechnen. In der Rayleigh-Debye-Näherung ( $R \ll \lambda$ ) ist die Streuintensität einer Kugel des Radius  $R$  proportional zu  $R^6$  (Gl. (2.70)). Für zwei Partikelspezies mit  $R_{\text{H},1} = 1\text{nm}$  und  $R_{\text{H},2} = 10\text{nm}$  müssten somit ca.  $10^6$  mal mehr kleine als große Teilchen vorhanden sein, damit deren Streuintensitäten und somit auch ihre Amplituden in der Intensitäts-gewichteten Radiusverteilung etwa gleich wären.

#### *Massen- & Anzahl-gewichtete Radius-Verteilungsfunktion*

Ist man daran interessiert, dass die Amplituden eines Radiusspektrums die Gesamtmasse  $m_{\text{ges}}$  oder die Anzahl  $N$  der Partikel mit dem jeweiligen Radius in der Probe widerspiegeln, muss zur Massen- bzw. Anzahl-gewichteten Verteilung mit den Amplituden  $c_m$  bzw.  $c_N$  übergegangen werden. Hierzu sind die Abhängigkeiten  $I_{\text{sc}}(m_{\text{ges}})$  und  $I_{\text{sc}}(N)$  zu bestimmen, mit  $m_{\text{ges}}(R_{\text{H}}) = N(R_{\text{H}}) \cdot m_{\text{Molekül}}(R_{\text{H}})$ .  $m_{\text{Molekül}}(R_{\text{H}})$  ist die Masse eines Moleküls des Radius  $R_{\text{H}}$ .

Als Ausgangspunkt wird Gleichung (2.67) gewählt und die Virialentwicklung nach dem ersten Term abgebrochen.  $I_{\text{sc}}$  ist somit proportional zu  $M \cdot P(q, R_{\text{H}}) \cdot C$ . Für die Molmasse  $M$  und die Massen-Konzentration  $C$  [g/ml] einer Partikelspezies gilt

$$\begin{aligned} M &= m_{\text{Molekül}} \cdot N_{\text{A}} \\ &= \tilde{\rho}_{\text{p}} V_{\text{H}} N_{\text{A}} \sim V_{\text{H}} \end{aligned} \quad (2.98)$$

<sup>26)</sup> In der Literatur wird das Intensitäts-gewichtete Radiusspektrum oftmals auch als ungewichtete Verteilung bezeichnet.

$$\begin{aligned}
C &= \frac{m_{\text{ges}}}{V_{\text{Lsg}}} \sim m_{\text{ges}} \\
&= \frac{m_{\text{Molekül}} \cdot N}{V_{\text{Lsg}}} = \frac{\tilde{\rho}_p V_H \cdot N}{V_{\text{Lsg}}} \sim V_H \cdot N.
\end{aligned} \tag{2.99}$$

$N$  sei die Gesamtzahl aller Partikel einer Teilchensorte im Volumen  $V_{\text{Lsg}}$ ,  $N_A$  bezeichnet die Avogadro-Konstante, und  $\tilde{\rho}_p$  ist die partielle spezifische Dichte<sup>27)</sup> der Teilchen. Einsetzen von (2.98) und (2.99) in (2.67) liefert

$$\begin{aligned}
I_{\text{sc}}(m_{\text{ges}}) &\sim MP(q, R_H)C \\
&\sim P(q, R_H) \cdot m_{\text{ges}} V_H \sim P(q, R_H) \cdot m_{\text{ges}} R_H^3,
\end{aligned} \tag{2.100}$$

$$\begin{aligned}
I_{\text{sc}}(N) &\sim MP(q, R_H)C \\
&\sim P(q, R_H) \cdot N V_H^2 \sim P(q, R_H) \cdot N R_H^6.
\end{aligned} \tag{2.101}$$

Zu beachten ist, dass in den Gleichungen (2.100) und (2.101) die jeweils letzte Proportionalitäts-Relation nur im Fall harter, d.h. vollständig ausgefüllter Kugeln gilt! Mittels (2.100) und (2.101) lauten die Umrechnungsrelationen von  $c_1$  zu den Amplituden  $c_m$  und  $c_N$  im Fall einer nicht näher spezifizierten Teilchengeometrie

$$c_m = \frac{c_1}{V_H \cdot P(q, R_H)}, \quad c_N = \frac{c_1}{V_H^2 \cdot P(q, R_H)}, \tag{2.102}$$

mit  $V_H$  als dem hydrodynamischen Volumen eines Partikels.

Die Änderungen eines ungewichteten Radiusspektrums beim Übergang zu den gewichteten Verteilungen sind in Abbildung 2.19 schematisch dargestellt. Abschließend ist zu bemerken, dass sowohl die Intensitäts- als auch die Massen-gewichteten Radius-Verteilungsfunktionen eine intrinsische Radiusabhängigkeit besitzen, unabhängig von der tatsächlich vorliegenden Partikelgrößenverteilung in der Probe.

---

<sup>27)</sup>  $\tilde{\rho}_p$  ist das Inverse des partiellen spezifischen Volumens  $\tilde{V}_p$ . Dieses ist im Falle hoher Verdünnung (Interaktionen zwischen den gelösten Teilchen sind vernachlässigbar klein!) definiert als der durch Zugabe einer Stoffmenge verursachte Volumenzuwachs der Lösung dividiert durch die Masse des zugegebenen Stoffes:

$$\tilde{V}_p = \frac{V_{\text{Zuwachs}}}{m_{\text{zugegeben}}}$$

Für  $N$  sphärische Teilchen beträgt der Volumenzuwachs:  $V_{\text{Zuwachs}} = N \cdot \frac{4}{3} \pi R_H^3$ .

Zum Unterschied dazu ist das spezifische Volumen eines Körpers definiert als:  $\tilde{V}_s = \rho^{-1}$  !

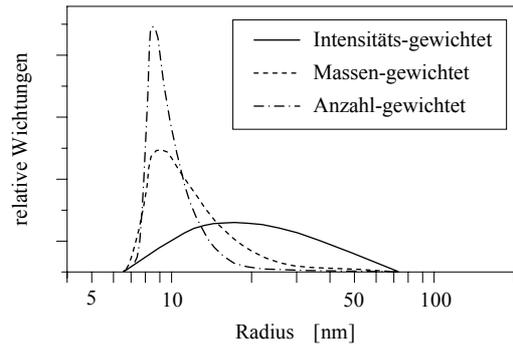


Abbildung 2.19: Radiusspektrum einer Intensitäts-, Massen- und Anzahl-gewichteten Partikelverteilung von Sphären. Das Flächenintegral ist für alle drei Kurven gleich.

### 2.3.5 Vesikel-Verteilungen

Das Markante an Vesikeln ist der von einer Membran umgebene, mit Lösungsmittel gefüllte Innenraum. Im Gegensatz zu harten Sphären trägt dadurch das Innenvolumen  $V_{in}$  nicht zur Streulichtintensität der Teilchen bei. Vielmehr gilt für das tatsächliche Streuvolumen  $V_{sc}$  eines Vesikels mit dem Gesamtvolumen  $V$  und dem Membranvolumen  $V_M$

$$V_{sc} = V_M = V - V_{in} . \quad (2.103)$$

Ungeachtet dessen ist die Diffusionskonstante  $D$  jedoch gleich der einer ausgefüllten Kugel gleicher Oberflächenrauigkeit. Unter der Annahme, dass große und kleine Vesikel die gleiche Membrandicke besitzen, wächst mit zunehmender Vesikelgröße das Innenvolumen ebenfalls konstant an. Damit ergeben sich die folgenden zwei Konsequenzen für die Berechnung der Radiusverteilungen:

- Die Korrelationszeit  $\tau_c$  einer gelösten Teilchenspezies ist allein von der mittleren Diffusionsgeschwindigkeit  $v_{Diff}$  abhängig. Wie Perrin zeigte,<sup>[268,269]</sup> hängt  $v_{Diff}$  jedoch nicht von der Masse eines Teilchens oder von dessen Massenverteilung im Innern ab.<sup>28)</sup> Aus diesem Grund liefern Vesikel dasselbe Zerfallszeit-Spektrum wie harte Sphären äquivalenter Streuintensität.

<sup>28)</sup> Das mittlere Verschiebungsquadrat der Translation eines Moleküls in  $x$ -Richtung lautet:  $\overline{\Delta x^2} = 2D_x \Delta t$ .<sup>[271]</sup> Durch Einsetzen der Stokes-Einstein-Gleichung für  $D_x$  kann  $v_{Diff,x}$  unabhängig von der Masse des betrachteten Moleküls formuliert werden

$$v_{Diff,x} = \frac{\sqrt{\overline{\Delta x^2}}}{\Delta t} = \sqrt{2 \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H \cdot \Delta t}} .$$

- Für den Übergang von der ungewichteten zur Massen- und Anzahlgewichteten Radiusverteilung wird  $V_M$  eines sphärisches Vesikels mit der Membrandicke  $R_M = R_H - R_{in}$  geschrieben als

$$\begin{aligned} V_M &= \frac{4}{3} \pi (R_H^3 - R_{in}^3) \\ &= 4\pi R_M R_H^2 - \mathcal{O}(R_H). \end{aligned} \quad (2.104)$$

Gleichung (2.104) besagt, dass das Streuvolumen eines Vesikels nicht proportional zu  $R_H^3$  sondern lediglich zu  $R_H^2$  ist plus einem Restterm  $\mathcal{O}(R_H)$ , der maximal mit  $R_H$  skaliert. Nach (2.100) bzw. (2.101) ist die Streuintensität  $I_{sc}$  eines Teilchens der Masse  $m$  proportional zu  $m \cdot V_{sc}$  bzw. zu  $V_{sc}^2$  mit  $V_{sc}$  als dessen Streuvolumen.<sup>29)</sup> Das Einsetzen von (2.104) in (2.100) bzw. (2.101) ändert die Relationen (2.102) zu

$$c_m = \frac{c_i}{R_H^2 \cdot P(q, R_H)}, \quad c_N = \frac{c_i}{R_H^4 \cdot P(q, R_H)}. \quad (2.105)$$

Da  $R_M$  als von  $R_H$  unabhängig und damit für alle  $R_H$  identisch vorausgesetzt wurde, hat die Membrandicke keinen Einfluss auf die Amplitudenverhältnisse in einem Radiusspektrum. Als Konsequenz von (2.105) ergibt sich für den Übergang von einer Intensitäts-gewichteten zu einer Radius- oder Anzahlgewichteten Vesikelverteilung eine geringere Verschiebung der mittleren Radien hin zu kleineren Werten als dies bei harten Kugeln der Fall wäre.

### 2.3.6 Analyse von DLS-Korrelogrammen

#### *Kumulantenmethode*

Bei der Auswertung von Korrelationsfunktionen ist zu unterscheiden, ob man den mittleren hydrodynamischen Radius aller in einer Probe enthaltenen Partikel wissen will, oder ob eine Verteilungsfunktion Gegenstand des Interesses ist. Im ersten Fall bietet sich die Kumulantenanalyse an.<sup>[272]</sup> Hierbei wird der Logarithmus von  $g_1(t)$  durch die sog. Kumulanten ausgedrückt (s. Anhang I)

$$\ln(g_1(-t)) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-t)^n}{n!} K_n. \quad (2.106)$$

$K_0$  ist lediglich ein Amplitudenfaktor. Die Bestimmungsgleichung für die Berechnung der Kumulanten  $K_n$  schreibt sich in allgemeiner Form als

<sup>29)</sup> Für „harte“, d.h. vollständig ausgefüllte Körper wäre  $V_{sc} = V_H!$

$$K_n = (-1)^n \left. \frac{d^n}{dt^n} \ln(g_1(t)) \right|_{t=0}. \quad (2.107)$$

Die Terme der ersten vier Kumulanten  $K_i$  lauten demnach als Funktion der Zerfallsrate  $\Gamma$  (vgl. Gl. (2.82))

$$K_1 = \langle \Gamma \rangle, \quad K_2 = \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2 \rangle, \quad K_3 = \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^3 \rangle, \\ K_4 = \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^4 \rangle - 3 \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2 \rangle^2.$$

$K_1$  ist somit die mittlere Zerfallsrate, die auch als *z-Mittelwert* bezeichnet wird, und  $K_2$  die Varianz der Partikelgrößenverteilung. Als Maß für die Breite der Verteilung wird häufig der Polydispersitätsindex PI herangezogen

$$PI = \frac{K_2}{K_1^2} = \frac{\langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2 \rangle}{\langle \Gamma \rangle^2}. \quad (2.108)$$

Die Definition von PI ist analog zu derjenigen der mittleren quadratischen Abweichung  $\Delta_2$  bei der Behandlung von NMR-Spektren mittels der Methode der Ordnungsparameter (s. Kap. 2.1.5 und Anhang I).

#### *Regularisierung – Geglättete / Ungeglättete Verteilung*

Genügt der mittlere Radius einer Partikelverteilung nicht als charakterisierender Probenparameter, bietet sich die Auswertung von  $g(t)$  durch Fitten einer integralen Verteilung gemäß Gl. (2.84) an. Aufgrund der Unsicherheit im Verlauf von  $g(t)$ , hervorgerufen durch die statistische Natur des Diffusions- und des Lichtstreuungsprozesses, ergeben sich innerhalb einer gewissen Variationsbreite mehrere theoretische Zerfallszeit-Verteilungen mit denen die gemessene Korrelationsfunktion in Übereinstimmung gebracht werden kann. Dies gilt insbesondere für multimodale Proben.

Aus diesem Grund ist es sinnvoll die wahrscheinliche Partikel-Verteilung in einer Probe durch ein Regularisierungs-Verfahren zu bestimmen. Dabei werden mehrere theoretische Korrelationsfunktionen aus Partikelverteilungen, die diskrete Teilchengrößen enthalten, berechnet. Die finale, regularisierte Verteilung ist dann eine Superposition sämtlicher kalkulierter Verteilungen, deren Varianz (unter Einbeziehung aller Datenpunkte) bezogen auf die gemessene Korrelationsfunktion innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite liegt. Die Wichtung der diskreten Verteilungsfunktionen im regularisierten Spektrum kann durch das Inverse der jeweiligen Varianz festgelegt werden.<sup>[259,260]</sup>

Die Regularisierung oder Glättung von Verteilungen dient letztlich dazu, die Verlässlichkeit des berechneten Partikelgrößen-Spektrums trotz der Unsicherheit im Verlauf eines gemessenen Korrelogramms zu erhöhen.

## Kapitel 3

# Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Expression und Reinigung des Proteins $\alpha$ -Synuclein

Der einleitende Schritt für die Gewinnung von  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ S) ist die 1984 von K. Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR).<sup>[273]</sup> Dabei wird die für das menschliche  $\alpha$ S kodierende DNA-Sequenz<sup>[274]</sup> amplifiziert unter Verwendung der Oligonucleotid-Primer

5'-TTCATTACATATGGATGTATTCATGAAAGG-3'

und

5'-GGAATTCATATGTTAGGCTTCAGGTTTCGTAG-3'.

Nach der Separation der beiden DNA-Stränge durch Erhitzen folgt auf die Anlage der Primer die Replikation. Im Anschluss daran werden die Replikate in die Nde I Position des pET-5a-Vektors (Promega; Madison WI) kloniert und in *Escherichia coli* BL21(DE3) pLys transfiziert. Nach 4-stündiger Kultivierung unter Beigabe von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid werden die Bakterien durch Einfrieren/Auftauen und Beschallen lysiert. Nach weiterem 15-minütigem Kochen und anschließender Zentrifugation (17000g) wird der hitzeresistente Überstand auf eine Q-Sepharose-Säule (Firma Amersham Biosciences) geladen und gereinigt. Auf einer Superdex 75 Gel-Säule wurde die  $\alpha$ -Synuclein-enthaltende Fraktion entsalzt, wie in [275] beschrieben. Dem Einsatz des Proteins ging ein finaler Reinigungsschritt auf einer S200-Sepharose-Säule in einer ÄKTA Purifier-Anlage (HPLC) (Firma Amersham Biosciences) voraus.

Kontrollmessungen von Proteinlösungen mittels dynamischer Lichtstreuung vor und nach dem letzten Säulenlauf ergaben, dass nahezu sämtliche Verunreinigungen entfernt werden konnten (s. Abb. 3.1). Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung eines Transmissionsspektrums (Elongationsmessung bei  $\lambda = 275\text{nm}$ , Extinktionskoeffizient von  $\alpha$ S:  $\epsilon = 5120(\frac{\text{Mol}}{\text{l}} \text{cm})^{-1}$ ).

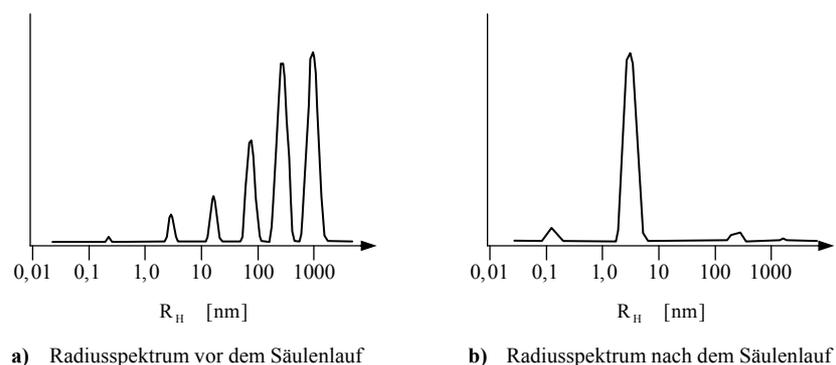


Abbildung 3.1: Partikelgrößen-Verteilungsspektrum einer  $\alpha$ -Synuclein-Lösung vor und nach dem finalen Reinigungsschritt. Zur besseren Darstellung der Verunreinigungen wurde eine Intensitäts-gewichtete Radius-Auftragung gewählt (s. Kap. 2.3.4)

### 3.1.2 Lipide und Sterole

Die verwendeten N-Palmitoyl-Sphingomyelin-Präparate

- N-Palmitoyl-Sphingomyelin (PSM),
- N-Perdeutero-Palmitoyl-SM- $d_{31}$  (PSM $d_{31}$ ),
- 2,2-Dideutero-Palmitoyl-SM- $d_2$  (PSM $d_2(C_2)$ ) (Abb. 3.2a)),
- 3,3-Dideutero-Palmitoyl-SM- $d_2$  (PSM $d_2(C_3)$ ) (Abb. 3.2b))

wurden in Kollaboration mit Prof. Robert Bittman im Department of Chemistry and Biochemistry der City University of New York, U.S. synthetisiert.

Cholesterol, wurde bei Sigma-Aldrich Fine Chemicals erworben. *egg yolk* Sphingomyelin (EYSM) und *bovine brain* Sphingomyelin (BBSM), ebenso wie alle restlichen deuterierten bzw. undeuterierten Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, U.S.) bezogen. Tabelle 1.1 enthält die von Avanti spezifizierte Acylketten-Zusammensetzung von EYSM und BBSM, sowie die jeweiligen Molmassen.

Die partiell deuterierten Phospholipide sind:

- 1-Palmitoyl-( $d_{31}$ )-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (POPC $d_{31}$ ),
- 1,2-Dipalmitoyl-( $d_{62}$ )-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DPPC $d_{62}$ ),
- 1-Palmitoyl-2-Palmitoyl-( $d_{31}$ )-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DPPC-(*sn*-2)- $d_{31}$ ).

Acylkette	BBSM	EYSM
16:0	2,0	84,0
18:0	46,0	6,0
20:0	5,0	2,0
22:0	7,0	4,0
24:0	0,0	4,0
24:1	6,0	0,0
Other	34,0	0,0
Molmasse	$731,09 \frac{\text{g}}{\text{Mol}}$	$703,03 \frac{\text{g}}{\text{Mol}}$

Tabelle 3.1: Fettsäureverteilung in Mol%, sowie Molmasse von BBSM und EYSM laut Angabe des Herstellers Avanti Polar Lipids, Inc., USA.

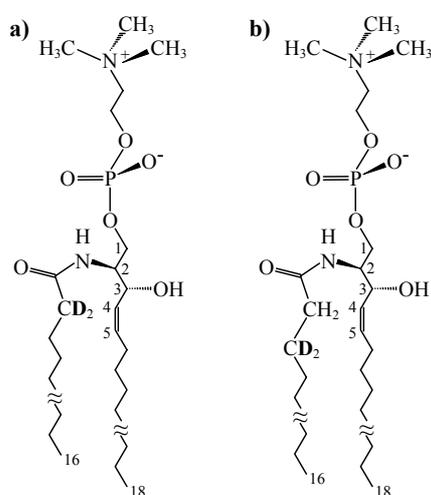


Abbildung 3.2: Deuterierungspositionen von  
 a) 2,2-Dideutero-N-Palmitoyl-SM-d<sub>2</sub> (PSMd<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>)),  
 b) 3,3-Dideutero-N-Palmitoyl-SM-d<sub>2</sub> (PSMd<sub>2</sub>(C<sub>3</sub>)).

Zu den undeuterten Phospholipiden zählen:

- 1,2-Dilauroyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DLPC),
- 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DMPC),

- 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DPPC),
- 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholine (POPC),
- 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (POPE),
- 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylglycerol (POPG),
- 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylserin (POPS).

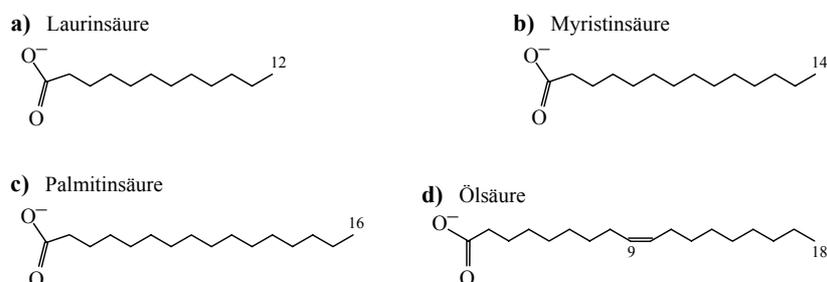


Abbildung 3.3: Strukturen der in den verwendeten synthetischen Lipiden vorkommenden Fettsäureketten.

### 3.2 Herstellung unilamellarer Schallvesikel

Die Eigenschaften kleiner Liposomen, wie sie in Synapsen als Transmitterspeicher vorkommen, und deren Wechselwirkung mit dem Parkinson-assoziierten, amyloido-genen Protein  $\alpha$ -Synuclein wurden mit Hilfe von Schallvesikeln (*sonicated unilamellar vesicles* – SUV) untersucht.

Nach Einwaage der benötigten Lipidmenge, wurden bei Mehrkomponentenproben die Substanzen zur Gewährleistung einer homogenen Lipidmischung in Chloroform/Methanol mit einem Volumenanteil von 1:1 aufgelöst. Der Hauptteil des Lösungsmittels wurde sodann mit  $N_2$  abgeblasen und mögliche Reste durch Inkubation in einem Exikator entfernt. Für Experimente mittels dynamischer Lichtstreuung wurde die Pufferlösung (150mM KCl, 20mM Phosphat, pH = 7,2) vor der Zugabe zu dem Lipidfilm über einen Spritzenvorsatzfilter der Porengröße 0,02 $\mu$ m gereinigt.

Speziell bei SM- bzw. DPPC-haltigen Präparaten war während der 10 minütigen Beschallung der Lipidlösung an einem Branson Sonifier der Firma Gerhard Heinemann (Laboratorium Ausrüstungen, Schwäbisch Gmünd) war darauf zu achten, dass die Probentemperatur oberhalb der Hauptphasenübergangs-Temperatur  $T_m$  gehalten wurde, weshalb die Beschallung bei ca. 45°C stattfand. Unterhalb von  $T_m$  war es

selbst nach einstündigem Beschallen nicht möglich, adäquate SUV-Lösungen herzustellen.

Die Entfernung vom Schallrüssel abgesplitteter Titanstücke sowie größerer liposomaler Partikel erfolgte in dem anschließenden Zentrifugationsschritt (12000g, 5min). SM- und DPPC-SUV-Lösungen wurden bei 45°C aufbewahrt. Zur Qualitätsprüfung der Schallvesikel wurden DLS-Messungen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für ein dabei erhaltenes Radiusspektrum zeigt Abb. 3.4.

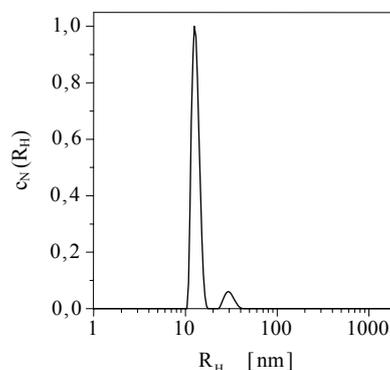


Abbildung 3.4: Anzahl-gewichtete Radiusverteilung einer DPPC-SUV-Probe nach dem Beschallen;  $c_{\text{DPPC}} = 40\text{mM}$ ,  $T = 22^\circ\text{C}$ . 96% aller Vesikel sind im Hauptpeak mit dem mittleren hydrodynamischen Radius von  $14,3 \pm 0,4\text{nm}$  enthalten.

### 3.3 Präparation orientierter Lipid-Doppelschichten

Die Gesamtmasse (Lipide + evtl. Cholesterol-Anteile) von Proben, die für Festkörper- $^2\text{H}$ -NMR-Messungen hergestellt wurden, lag bei 18–25mg. Nach der Lipideinwaage wurden 2,5ml eines Lösungsmittelgemisches bestehend aus 2/3 Methanol und 1/3 Chloroform (Angabe der Volumenverhältnisse) zugegeben. Speziell Cholesterol und Sphingomyelin lösen sich durch die Beigabe von Chloroform wesentlich besser. Das Gemisch wurde zu je 50 $\mu\text{l}$ -Portionen auf 48 ultradünne Glasplättchen der Firma Paul Marienfeld GmbH & Co. KG aufgetragen – die Dimensionierung der Plättchen beträgt: 8  $\square$  19  $\square$  0,06-0,08mm. Die Glasplättchen fungieren einerseits als Probenhalter und gewährleisten darüber hinaus eine zuverlässige Orientierung der Membranschichten. Die durch den Chloroformanteil erniedrigte Oberflächenspannung des Lösungsmittelgemisches ermöglicht eine bessere Verteilung der Lösung auf den Plättchen.

Der Großteil des Lösungsmittels verdampft nach dem Auftragen innerhalb von 15min. Das restliche noch vorhandene Lösungsmittel wurde durch Inkubation in einem Exikator über einen Zeitraum von mindestens 12h mittels einer Vakuumpumpe ( $p < 0,5\text{mbar}$ ) abgesaugt. Anschließend wurden die Plättchen gestapelt und auf der Ober- und Unterseite mit je einem Zylindersegment in ein Glasröhrchen geschoben (s. Abb. 3.5). Auf beiden Seiten des Plättchenstapels wurden Filterpapierstreifen platziert, die zur Aufnahme und Speicherung des zuzugebenden Wassers dienen. Die vollständige Separation des Probenvolumens von der Umgebung erfolgt mit zwei Teflonstößeln, die mit je einem Dichtungsring aus Silikon versehen sind. Eine deutliche Erhöhung der Dichtigkeit konnte durch Umwicklung der Teflonstößel mit Parafilm erreicht werden. Auf diese Weise war es teilweise möglich Proben über einen Zeitraum von 4 Tagen zu messen, ohne dass die Hydratation nachweisbar abnahm.

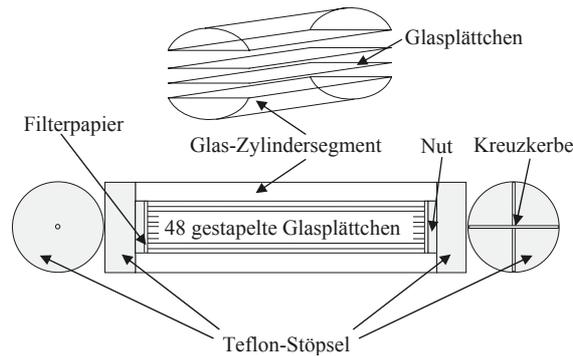


Abbildung 3.5: Probenhalter für Festkörper- $^2\text{H}$ -NMR-Messungen.

Die mittlere Zahl  $N$  der Lipid-Doppelschichten zwischen zwei Glasplättchen kann mit folgender Formel abgeschätzt werden

$$N = \frac{1}{2} \frac{N_{\text{Lipid}} \cdot A_{\text{Lipid}}}{(N_{\text{Glas}} - 1) \cdot A_{\text{Glas}}} = \frac{1}{2(N_{\text{Glas}} - 1)} \cdot \frac{m_{\text{Lipid}} N_A}{M_{\text{Lipid}}} \cdot \frac{A_{\text{Lipid}}}{A_{\text{Glas}}} \quad (3.1)$$

Beispielsweise erhält man bei einer Einwaage von  $m_{\text{Lipid}} = 20\text{mg}$   $\text{PSMd}_{31}$ , dessen molare Masse  $M(\text{PSMd}_{31}) = 719,8\text{g/Mol}$  ist, einer Querschnittsfläche pro Lipid von  $A_{\text{Lipid}} \approx 60\text{\AA}$ , einer Fläche pro Glasplättchen von  $A_{\text{Glas}} = 152\text{mm}^2$ ,  $N_{\text{Glas}} = 48$  und  $N_A$  als der Avogadro-Konstanten eine mittlere Bilayer-Anzahl von  $N \approx 702$ .

Die Reinheit der Lipide wurde zu Beginn und am Ende der NMR-Messreihen mittels Dünnschichtchromatographie geprüft.

## 3.4 Festkörper-NMR-Messungen

### 3.4.1 Das Kernspin-Spektrometer

Die Glaszylinder mit den darin befindlichen Proben werden für die Messungen in eine freitragende Spule, des Durchmessers  $d = 10\text{mm}$  und der Länge  $l = 18\text{mm}$  (Spulenvolumen:  $V_{\text{Sp}} = 1,4\text{cm}^3$ ), geführt, die gleichzeitig als Sender- und Empfängerspule fungiert, und deren Windungen ( $N = 6$ ) aus geplättetem Silberdraht bestehen. Für die Spuleninduktivität  $L$  gilt mit  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{VsA}^{-1}\text{m}^{-1}$  als der magnetischen Feldkonstante

$$L = \frac{\mu_0 \pi N^2 d^2}{4 l} \quad [\text{H}]. \quad (3.2)$$

Das zur Auslenkung der nuklearen Magnetisierung  $\bar{M}$  notwendige, mittels der Spule erzeugte Magnetfeld  $\bar{B}_p$  (s. Kap. 3.4.2) ist proportional zur Wurzel der eingespeisten Leistung  $P$  in  $[\text{W}]$ <sup>[196]</sup>

$$B_p \approx 3\mu_0 \sqrt{\frac{QP}{V_{\text{Sp}} v_0}} \cdot 10^{-4} \quad [\text{T}]. \quad (3.3)$$

Der Qualitätsfaktor  $Q$  in (3.3), mit  $Q = \omega_0 L/R$ , ist ein Maß für das Signal/Rausch-Verhältnis. Hohe  $Q$ -Werte liefern ein gutes S/N-Verhältnis.  $R$  ist der Widerstand in  $\Omega$  und  $v_0$  die im MHz-Bereich liegende Transmitterfrequenz, mit der  $B_p$  oszilliert.

In diesem Hochfrequenzbereich kommt es in dem Spulendraht bereits zum Skin-Effekt. Aus diesem Grund führt der bei Korrosion der Spule erhöhte Oberflächenwiderstand zu einem signifikanten Leistungsverlust. Da bei Festkörper- $^2\text{H}$ -NMR das anzuregende Frequenzfenster besonders breit ist und die einzustrahlende Leistung deshalb sehr stark sein muss, ist eine regelmäßige Entfernung der Korrosionsansätze von der Spule unerlässlich. Andernfalls können die äußeren Spektrenflanken nicht ausreichend angeregt werden.

Die Spule ihrerseits wird vor dem Einführen in den supraleitenden Magneten (Oxford Instruments, Oxford U.K.) auf einen Breitband-NMR-Probenkopf der Firma Varian (Palo Alto, U.S.) gesteckt. Um den Temperaturgradienten in der unmittelbaren Umgebung der Probe möglichst klein zu halten, wird abschließend ein kleiner Dewar auf den Probenkopf geschraubt. Für die Messungen stand ein Varian VXR-400S NMR-Spektrometer zur Verfügung. Die das  $\bar{B}$ -Feld erzeugende supraleitende Magnetspule befindet sich in einem doppelt gekühlten Kryostaten mit innerer Flüssig-Helium- und äußerer Flüssig-Stickstoff-Kühlung. Die magnetische Induktion beträgt  $9,36\text{T}$ , was einer  $^2\text{H}$ -Resonanzfrequenz von  $61,4\text{MHz}$  entspricht ( $\nu(^1\text{H})$  liegt bei ca.  $400\text{MHz}$ ; s. Tab. 2.1). Das  $\bar{B}$ -Feld kann am Probenort durch zusätzliche Sattel-

spulen homogenisiert werden (*shimming*). Für Messungen von  $^2\text{H}$ -Spektren wurde dem 50W-Verstärker wegen der Breite des anzuregenden Frequenzbereichs ein zusätzlicher Breitband-Verstärker (1000W) nachgeschaltet. Zur Steuerung der Anlage dient eine SPARC-Station 5 der Firma Sun Microsystems.

#### *Probenorientierung im NMR-Magnet*

Um eine Orientierung der Probe im Magneten zu ermöglichen sind an einem der beiden Teflonstöpsel, die den Glaszylinder mit den darin enthaltenen, Lipid-beschichteten Glasplättchen verschließen, zwei zueinander vertikal stehende Kerben eingefräst (Abb. 3.5). Das dazugehörige Passstück befindet sich an einem Messinggestänge, dessen Ende den Probenkopf außerhalb des Magneten verlässt. Auf diese Weise kann der Winkel zwischen dem externen Magnetfeld und der Flächennormalen der Doppel-Lipidschichten auf  $\pm 1^\circ$  variiert werden ohne, dass der Probenkopf jedes Mal aus dem Magneten entnommen werden muss.

Zur Einstellung der  $0^\circ$ -Orientierung wurde eine Serie von Messungen mit schrittweiser Annäherung an den  $0^\circ$ -Winkel durchgeführt; als Entscheidungskriterium wurde die maximale Spektrenbreite herangezogen.

#### *Temperaturkalibrierung*

Um temperaturabhängige Messungen durchführen zu können, strömt Pressluft durch ein Kupferspiralrohr, das sich in einer mit Eiswasser gefüllten Kühlbox befindet. Die so gekühlte Luft wird bei Bedarf elektrisch beheizt und über ein Dewar-Rohr zum Probenort geleitet. Das System ermöglicht auf diese Weise eine Temperatureinstellung im Bereich von  $15\text{--}100^\circ\text{C}$ . In unmittelbarer Umgebung der Probe befindet sich ein Thermoelement zur Temperaturmessung. Die Eichung erfolgte in regelmäßigen Abständen mittels eines PT100-Widerstands, der für diesen Zweck in einem Glasröhrchen an dem exakten Probenort postiert wurde.

### **3.4.2 Anregung & On-Resonanz-Pulse**

Zum Verständnis der Auslenkung von  $\bar{M}$  mittels  $\bar{B}_p$  wird vom raumfesten Koordinatensystem ( $\text{KS}_{\text{stat}}$ ) in ein Koordinatensystem ( $\text{KS}_{\text{rot}}$ ) gewechselt, das mit der Transmitter-Winkelgeschwindigkeit  $\omega_{\text{rf}}$  rotiert. Weiterhin werde das oszillierende  $\bar{B}_p$ -Feld als eine Superposition zweier entgegengesetzt rotierender Magnetfelder  $\bar{B}^+$  und  $\bar{B}^-$  dargestellt (vgl. Abb. 3.6), wobei  $\bar{B}^+$  die gleiche Bewegungsrichtung wie  $\text{KS}_{\text{rot}}$  besitze und sich daher in diesem ruhend in der  $xy$ -Ebene befinde. In  $\text{KS}_{\text{rot}}$  beträgt die reduzierte Larmor-Winkelgeschwindigkeit stets

$$\Omega = \omega_0 - \omega_{\text{rf}}. \quad (3.4)$$

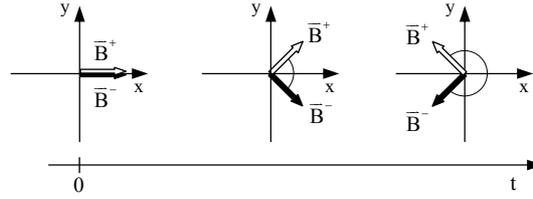


Abbildung 3.6: Rotation der links- und rechts-drehenden  $B_p$ -Komponente mit  $\vec{B}_p = \vec{B}^+ + \vec{B}^-$ .

Für die effektive Winkelgeschwindigkeit  $\omega_{\text{eff}}$  gilt

$$\omega_{\text{eff}} = \sqrt{\omega_{\text{rf}}^2 + \Omega^2}. \quad (3.5)$$

Analog zu Gl. (2.6) kann die effektive Präzessionsbewegung der Kernspins auch formuliert werden als

$$\vec{\omega}_{\text{eff}} = -\gamma \vec{B}_{\text{eff}}. \quad (3.6)$$

Im *On-Resonanz*-Fall, bei dem  $\omega_{\text{rf}} = \omega_0$  gewählt wird, ergibt sich aus den Gleichungen (3.4) bis (3.6), dass  $\vec{\omega}_{\text{eff}}$  in der  $xy$ -Ebene liegt, da  $\Omega = 0$  und somit  $\omega_{\text{eff}} = \omega_{\text{rf}}$  ist. Folglich gilt

$$\frac{|\vec{B}_{\text{eff}}|}{|\vec{B}^+|} = \frac{|\vec{B}^+|}{|\vec{B}^+|}. \quad (3.7)$$

Die Anregung mittels eines Rechteckpulses bei  $\omega_0$  erzeugt im Fourierraum der Zeit  $t$  eine breite Frequenzverteilung um die Resonanzfrequenz  $\omega_0$ . Dadurch werden auch die Dipolmomente von Kernen gedreht, deren Larmorfrequenz geringfügig von  $\omega_0$  abweicht. Während einer *On-Resonanz*-Anregung der Pulsdauer  $t_p$  dreht sich die makroskopische Magnetisierung  $M$  um den Winkel

$$\beta = \gamma B_p t_p. \quad (3.8)$$

Zur Anregung großer spektraler Breiten (*sweep width*)  $\Delta\nu$  muss die  $90^\circ$ -Pulslänge  $\Delta t$  möglichst kurz sein, da  $\Delta\nu = 1/\Delta t$  gilt. Typischerweise liegt die Dauer eines  $90^\circ$ -Pulses für  $^2\text{H-NMR}$  bei der für sämtliche Experimente verwendeten Anlage bei ca.  $7,5\mu\text{s}$ .  $\omega_{\text{rf}}$  ist damit  $210\text{rad}\cdot\text{kHz}$ .<sup>30)</sup> Die aufgenommenen Festkörper- $^2\text{H}$ -Spektren besitzen teilweise eine Gesamtbreite von  $\Delta\nu_{\text{max}} = 100\text{--}120\text{kHz}$ , d.h., die maximale re-

<sup>30)</sup>  $\pi/2 = \omega_{\text{rf}} \cdot t_p \Rightarrow \omega_{\text{rf}} = \pi/(2t_p) = \pi/(2 \cdot 7,5\mu\text{s}) = 0,21 \cdot 10^6 \frac{\text{rad}}{\text{s}}$ .

duzierte Larmor-Winkelgeschwindigkeit  $\Omega_{\max}$ <sup>31)</sup> liegt bei ca. 310–380rad·kHz. Nach einem 90°-Puls beträgt die xy-Komponente der Magnetisierung im äußeren Spektrbereich, in dem noch Signale auftreten, ca. 90% der maximalen Intensität, mit der in der Spektrmitte angeregt wird.

### 3.4.3 Detektion

Nach einer Anregung der Kernmagnetisierung ändert sich infolge der Präzession von  $\bar{M}$  permanent der magnetische Fluss durch die Spulen-Querschnittsfläche, deren Flächenvektor  $\bar{F}$  und deren Windungszahl  $N$  sei. Aufgrund des Induktionsgesetzes

$$U_{\text{ind}} = -N \cdot \dot{\Phi}, \quad \text{mit } \Phi = \bar{B} \cdot \bar{F} \quad (3.9)$$

induziert die Bewegung von  $\bar{M}$  in der Spule eine Spannung  $U_{\text{ind}}$ . Schließt  $\bar{M}$  mit der z-Achse den Winkel  $\beta$  ein (Abb. 3.7), kann die Magnetisierung  $M_{xy}$  in einer beliebigen Richtung in der xy-Ebene geschrieben werden als

$$M_{xy} = M \sin \beta \sin(\omega_0(t - t_0)). \quad (3.10)$$

$t_0$  ist ein zeitlicher Offset, der berücksichtigt, dass zum Zeitpunkt  $t = 0$  die Projektion der Magnetisierung auf die xy-Ebene nicht notwendig genau senkrecht zur betrachteten Richtung weisen muss. Durch geeignete Wahl des zeitlichen Beginns, kann  $t_0$  gleich Null gesetzt werden. Das Einsetzen von (3.10) in (3.9) ergibt für die *freie Induktion*

$$U_{\text{ind}} \propto M \sin \beta \cos(\omega_0 t). \quad (3.11)$$

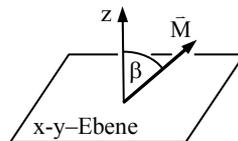


Abbildung 3.7: Deklaration des Winkels  $\beta$ .

Die in Kap. 2.1.6 erwähnten Relaxationsmechanismen führen das System nach der Anregung wieder in den thermischen Gleichgewichtszustand zurück mit  $\bar{M} \parallel \bar{B}_0$ . Daher spricht man bei der Datenakkumulation auch vom *freien Induktionszerfall* (*free induction decay* – FID). Die Fouriertransformation des FID liefert das ge-

<sup>31)</sup>  $\Omega_{\max} = 2\pi \cdot (\Delta\nu/2)$ .

wünschte Frequenzspektrum  $F(\omega)$ . Eine exponentiell abklingende Kosinusfunktion  $f(t)$ , wie sie in NMR-Messungen typischerweise detektiert wird, ergibt für  $F(\omega)$  eine Lorentz-Kurve der Mittenfrequenz  $\omega_0$  und Halbwertsbreite  $T_2^{-1}$

$$f(t) = \begin{cases} 0 & \text{für } t < 0 \\ e^{-\frac{t}{T_2}} \cos(\omega_0 t) & \text{für } t \geq 0, \end{cases} \quad (3.12)$$

$$F(\omega) = \int_0^{\infty} f(t) \cos(\omega t) dt = \frac{T_2^{-1}}{T_2^{-2} + (\omega - \omega_0)^2}.$$

Die Aufnahme des FID erfolgt in Quadraturdetektion<sup>32)</sup> durch  $N_k$ -malige Messung des Induktionssignals im zeitlichen Abstand  $t_{\text{dwell}}$  über den Zeitraum  $t_{\text{acq}}$ , der einige hundert Millisekunden beträgt ( $t_{\text{acq}} = N_k \cdot t_{\text{dwell}}$ ). Die Spektralbreite  $\Delta\nu_{\text{sw}}$  des akquirierten Spektrums ist das Inverse von  $2 \cdot t_{\text{dwell}}$ . Damit ergibt sich als Beziehung zwischen  $N_k$ ,  $\Delta\nu_{\text{sw}}$  und  $t_{\text{acq}}$

$$N_{\text{Points}} = \frac{t_{\text{acq}}}{t_{\text{dwell}}} = \left( \frac{1}{2 \cdot \Delta\nu_{\text{sw}}} \right)^{-1} \cdot t_{\text{acq}} = 2 \Delta\nu_{\text{sw}} t_{\text{acq}}. \quad (3.13)$$

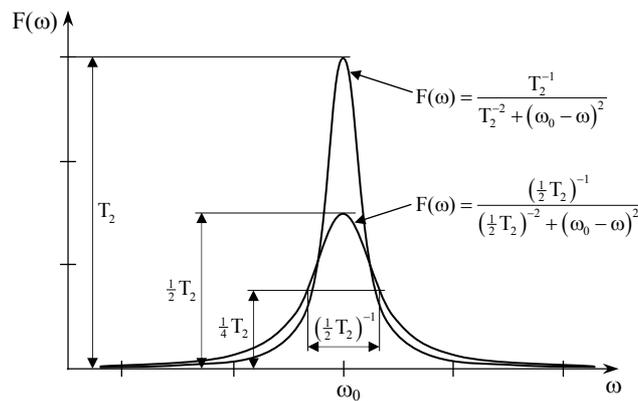


Abbildung 3.8: Zwei Lorentz-Kurven der Halbwertsbreiten  $\Delta\omega = 2T_2^{-1}$  bzw.  $T_2^{-1}$ .

<sup>32)</sup> Quadraturdetektion bedeutet die getrennte Digitalisierung des FID, sowie seiner Verschiebung um  $\pi/2$ . Durch diese separate Speicherung des sog. Real- und Imaginärteils des FID bleibt die Phaseninformation erhalten, so dass es möglich ist, zwischen Signalen ober- und unterhalb der Träger- sprich Anregungsfrequenz zu unterscheiden.<sup>[276]</sup>

### 3.4.4 Verwendete Pulssequenzen

#### Quadrupolare Echo-Pulssequenz

Die Totzeit des Receivers bedingt die Verwendung von Pulssequenzen mit einer gewissen Verweilzeit vor der FID-Akquisition.<sup>[277]</sup> Eine für  $^2\text{H-NMR}$  ( $I = 1$ ) geeignete Pulsfolge ist deshalb die quadrupolare Echo-Pulssequenz

$$d_1 - \left(\frac{\pi}{2}\right)_\theta - \tau_1 - \left(\frac{\pi}{2}\right)_{\theta \pm 90^\circ} - \tau_2 - \text{Akquisition} .$$

Vor jeder einzelnen Akquisition verstreicht eine Zeitspanne  $d_1$ , die vier- bis fünfmal so lang wie die längste vorkommende  $T_{1,Z}$ -Zeit ist (ein typischer Wert für  $d_1$  war 0,8sec) um sicherzustellen, dass sich das System zu Beginn der Messung im thermischen Gleichgewicht befindet. Anschließend wird  $\bar{M}$  durch einen  $\pi/2$ -Puls in die  $xy$ -Ebene umgeklappt. In der sich anschließenden Verweilzeit  $\tau$  sinkt die Phasenkorrelation durch Spin-Spin-Relaxationen (Kap. 2.1.6). Ein zweiter  $\pi/2$ -Puls (bzw.  $\pi$ -Puls für Kerne mit  $I = 1/2$ ) refokussiert  $\bar{M}$  (*Spin-Echo*). Das Maximum des Echos wird erreicht nach einer Zeit von  $t = 2\tau$ .  $\tau_1$  und  $\tau_2$  betragen bei den Messungen jeweils 20 $\mu\text{s}$ .

#### Inversion Recovery-Pulssequenz

Zur Bestimmung der longitudinalen Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_{1,Z}$  wird  $\bar{M}$  mit einem  $180^\circ$ -Puls invertiert. Während der Zeit  $d_2$  relaxiert  $\bar{M}$  ins thermische Gleichgewicht.

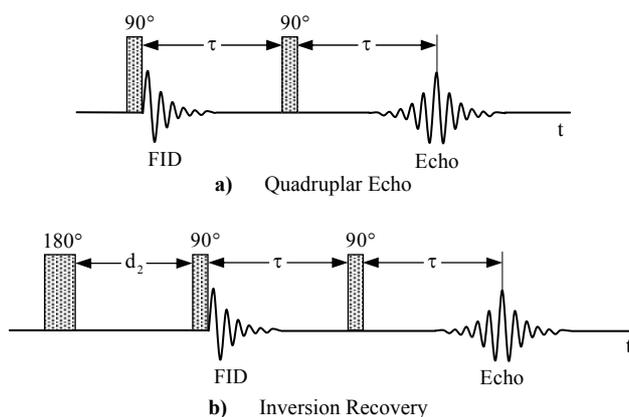


Abbildung 3.9: Verwendete Pulssequenzen in der  $^2\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

$$d_1 - \pi - d_2 - \left(\frac{\pi}{2}\right)_\theta - \tau - \left(\frac{\pi}{2}\right)_{\theta \pm 90^\circ} - \tau - \text{Akquisition}$$

Die nach  $d_2$  noch vorhandene Restmagnetisierung  $M_z$  in negativer  $z$ -Richtung wird sodann mit einer Quadrupol Echo-Folge detektiert. Die Variation von  $d_2$  liefert eine Änderung von  $M_z$  als Funktion der Relaxationszeit. Die für das Fitten von  $M_z(t)$  relevante Gleichung lautet<sup>33)</sup>

$$M_z(t) = M_\infty + (M_0 - M_\infty) \cdot e^{-\frac{t}{T_{1,Z}}} \quad (3.14)$$

Somit sind die 3 Parameter  $M_0 = M_z(t=0)$ ,  $M_\infty = M_z(t \rightarrow \infty)$  und  $T_{1,Z}$  durch das Fitten zu ermitteln. Da für gewöhnlich nach einem  $180^\circ$ -Puls immer noch transversale Restanteile von  $\bar{M}$  existieren, kann  $M_0$  normalerweise nicht gleich  $-M_\infty$  gesetzt werden.

### 3.4.5 Bestimmung der Hydratation $n_w$

Zur Bestimmung der Zahl der Wassermoleküle  $n_w$  pro Lipid ist die Kenntnis des Deuterierungsgrades und bei Lipidmischungen der molaren Probenzusammensetzung aus den unterschiedlichen Lipiden notwendig. Das bedeutet, dass mindestens eine Membrankomponente (partiell) deuteriert sein oder aber über labile Hydroxyl- bzw. Amidprotonen verfügen muss.

Bei der  $n_w$ -Berechnung von Mischungen mit Cholesterol wird der Cholesterol-Anteil nicht zur Gesamtlipidmenge gezählt, da das  $H_2O$  (bzw.  $D_2O$ ) vorwiegend im Kopfgruppenbereich an die Lipide assoziiert ist und Cholesterol keine Kopfgruppe besitzt, sondern lediglich seine OH-Gruppe als Donor bzw. Akzeptor für eine Wasserstoffbrücken-Anlagerung von  $H_2O$ -Molekülen zur Verfügung steht.

<sup>33)</sup> Unter Berücksichtigung der beiden Randbedingungen:

$$M_z(t=0) = M_0 \text{ und } M_z(t \rightarrow \infty) = M_\infty ,$$

lässt sich Gleichung (3.14) aus den Bloch-Gleichungen ableiten:

$$\begin{aligned} \frac{dM_z(t)}{dt} &= \frac{M_\infty - M_z(t)}{T_{1,Z}} \Rightarrow \int \frac{dM_z(t)}{M_\infty - M_z(t)} = \int \frac{dt}{T_{1,Z}} \\ \Rightarrow \ln(M_\infty - M_z(t)) &= -\frac{t}{T_{1,Z}} + C \Rightarrow M_z(t) - M_\infty = A \cdot e^{-\frac{t}{T_{1,Z}}} \end{aligned}$$

Die Erfüllung der Randbedingungen impliziert:  $A = M_0 - M_\infty$

$$\Rightarrow M_z(t) = M_\infty + (M_0 - M_\infty) \cdot e^{-\frac{t}{T_{1,Z}}} .$$

Mit Hilfe der Signal-Integralverhältnisse lässt sich  $n_w$  folgendermaßen kalkulieren

$$n_w = \left( \frac{I_{D_2O}}{N_{D_2O} \cdot \rho_{D_2O}} \right) \cdot \left( \frac{I_{Lipid}}{N_{Lipid} \cdot \rho_{Lipid} \cdot p} \right)^{-1} = \frac{I_{D_2O} \cdot N_{Lipid} \cdot \rho_{Lipid} \cdot p}{I_{Lipid} \cdot N_{D_2O} \cdot \rho_{D_2O}} \left[ \frac{\text{Mol}}{\text{Mol}} \right]. \quad (3.15)$$

$I$  sind die Integrale der  $^2\text{H}$ -NMR-Singale,  $N$  die Zahl der Deuteronen pro Molekül,  $\rho$  der Deuterierungsgrad (= Zahl der  $^2\text{H}$ -Kerne pro Molekül) und  $p$  der molare Anteil des deuterierten Lipids bezogen auf die Gesamtlipidmenge in der Probe.

Es ist anzunehmen, dass aufgrund der inhomogenen Anregung des spektralen Resonanzbereichs die Intensitäten der äußeren  $^2\text{H}$ -Resonanzen allgemein etwas zu niedrig ausfallen (vgl. Kap. 3.4.2), weshalb die tatsächliche Hydratisierung stets etwas kleiner sein dürfte als die berechnete. Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, dass sich bei sämtlichen Messungen, die im voll hydratisierten Zustand durchgeführt werden sollten, ein berechnetes  $n_w$  von mindestens 30 ergab.

Für Sphingomyelin und Phospholipide wie etwa das DPPC oder das POPC spricht man ab einem  $n_w$  von ca. 22-26 von voller Hydratation, das heißt, die Kopfgruppen der Lipide können bei weiterer  $n_w$ -Erhöhung keine zusätzlichen Wassermoleküle mehr binden. Im  $^2\text{H}$ -NMR-Spektrum macht sich diese Situation durch einen zusätzlichen Peak in der Mitte des  $D_2O$ -Signals bemerkbar, der dem unorientierten, isotropen Wasseranteil der Probe zuzuordnen ist.

Der Deuterierungsgrad des Wassers wurde in allen Experimenten auf 5% gesetzt. Die damit verbundenen Vorteile sind:

- die Intensität des Wassersignals im NMR-Spektrum beträgt nur 1/20 im Vergleich zu einem 100%-igen Deuterierungsgrad, wodurch Überlappungen mit Methylgruppensignalen stark reduziert und sehr oft vollständig unterbunden werden;
- damit einhergehend ist eine exaktere Integralbestimmung des Wassersignals und der Methylgruppen-Resonanzen der Lipide möglich;
- die Schwankungsbreite des Wasser-Deuterierungsgrades durch Austausch von  $D_2O$  gegen in der Luft befindliches  $H_2O$  wird stark herabgesetzt, was ebenfalls einer genaueren  $n_w$ -Bestimmung zugute kommt;
- unerwünschte Signale im NMR-Spektrum, hervorgerufen durch die Anregung von Hydroxyl- und Amidgruppen-Resonanzen, infolge des Austauschs labiler Protonen gegen  $^2\text{H}$  auftauchen, verlieren ihre Relevanz und haben keinen störenden Einfluss auf die Spektren.<sup>34)</sup>

---

<sup>34)</sup> Die Deuteronen der Hydroxyl- und Ammoniumgruppen tauschen mit dem umgebenden Wasser mit einer Rate von  $10^2$ - $10^3$  Hz aus.

### 3.4.6 Bearbeitung der $^2\text{H}$ -NMR-Spektren

Die Momentberechnung, ebenso wie die Bestimmung der Ordnungsparameter aus den Quadrupolsplittings sowie der Hydratation  $n_w$  erfordern Spektren korrekter Phase und eine FID-Transformation, die exakt am Echotop beginnt, d.h. beim absoluten Maximum des FID. Andernfalls treten neben den Flanken der äußeren Quadrupolsplittings Einbrüche in der Basislinie auf bei gleichzeitiger artifizieller Erhöhung des Spektrenbereichs, in den die  $^2\text{H}$ -Resonanzen erscheinen.

Daher wurde nach der Aufnahme von Spektrenarrays, etwa bei Untersuchung der Temperaturabhängigkeit von Membraneigenschaften, zur Gewährleistung der Daten-Verlässlichkeit ein selektives Phasen der Einzelspektren vorgenommen, ebenso wie eine individuelle Bestimmung des Echotops. In Fällen, bei denen sich kein FID-Akquisitionspunkt exakt am Echotop befand, erfolgte eine Interpolation von je 8 Punkten zwischen zwei gemessenen FID-Punkten. Auf diese Weise konnte das Echotop stets mit hinreichender Genauigkeit festgelegt werden.

## 3.5 Circular Dichroismus-Messungen

Die Proteinfaltung wurde durch Aufnahme von CD-Spektren mit einem Jasco 810 Spektropolarimeter (Firma Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) untersucht. Unter Verwendung eines Peltier-Elements liegt die Gerätegenauigkeit der Temperatur-Adjustierung bei  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Die Äquilibrierungszeit vor jeder Messung betrug mindestens 5min.

Abhängig davon, ob bei physiologischen Salzkonzentrationen gemessen wurde, bzw. ob die Spektren einer detaillierten quantitativen Analyse unterzogen werden sollten, wurden unterschiedlich dicke Küvetten benutzt. Experimente, bei denen das Interesse in einer detaillierten Bestimmung der Sekundärstrukturanteile lag, und somit Messungen bis in den fernen UV-Bereich nötig waren, erfolgten unter Verwendung einer Küvette mit einer Lichtweglänge von 0,1cm. Bei sämtlichen Titrationsexperimenten dagegen fand eine 0,2cm-Küvette Anwendung.

Für die Untersuchung der Faltung von  $\alpha$ -Synuclein in Gegenwart von Vesikeln war es zusätzlich notwendig Vesikelproben ohne Protein als Kontrolle zu messen, um das Lipid-CD-Signal, das besonders bei SM-haltigen Lösungen bereits unterhalb von 225nm die Messkurven vollständig dominiert, von den Spektren der Protein-Vesikel-Lösungen subtrahieren zu können.

Einige Proben enthielten nach Fraktionierung bzw. Reinigung über eine FPLC-Anlage nur sehr geringe Proteinmengen, weshalb die Spektren auch bei einer sechsfachen Wiederholrate immer noch stark verrauscht blieben. In diesem Fall wurde der Savitzky-Golay-Algorithmus <sup>[278]</sup> zur Spektrenglättung genutzt. Falls erforderlich wurde ebenfalls eine Basislinienkorrektur vorgenommen, bei der nach der Spektrensubtraktion  $\Psi_{\lambda=260\text{nm}}$  Null gesetzt wurde.

Für eine Spektrendekonvolution zur Ermittlung der Sekundärstrukturanteile mittels des Programmpakets CDPro<sup>[240,241]</sup> mussten die CD-Daten in Einheiten der residuellen Extinktionskoeffizienten-Differenz umgerechnet werden (s. Kap. 2.2.1).

### 3.6 Das Programm *CD-Deconvolution*

Für eine detaillierte Strukturanalyse der gemessenen CD-Spektren wurde ein Programm namens *CD-Deconvolution* unter der Oberfläche von Excel XP in VBA (*Visual Basic for Applications*) von mir entwickelt, dessen Kern die 3 in CDPro integrierten Fitalgorithmen CDSSTR,<sup>[242,243]</sup> SELCON3<sup>[239]</sup> und CONTINLL<sup>[244]</sup> (vgl. Kap. 2.2.7) bilden. Das Programm soll im folgenden kurz vorgestellt werden. Eine detaillierte Beschreibung sämtlicher Optionen, die *CD-Deconvolution* bietet, findet sich im Internet unter:

<http://beyer.web.med.uni-muenchen.de/Deconvolution/indexdecon.htm>

wo man das Programm auch als Freeware downloaden kann.

#### 3.6.1 Programmoptionen

Abb. 3.10 zeigt das Hauptmenü von *CD-Deconvolution*. Seine wesentliche Stärke besteht in der Möglichkeit eine Vielzahl verschiedener Berechnungen gleichzeitig starten zu können, die daraufhin nacheinander abgearbeitet werden, ohne dass der Benutzer weitere Interaktionen vornehmen muss.

So können Daten von Messserien, wie von Temperatur-Arrays, komplett auf einmal geladen werden, und sowohl unter Verwendung mehrerer Basissätze (Kapitel 2.2.7, Tabelle 2.3), als auch innerhalb verschiedener Wellenlängenbereiche mittels der 3 Methoden von CDPro analysiert werden. Die Ergebnisse, und wahlweise auch die kalkulierten Spektren, werden automatisch gespeichert.

Die Resultate kann der Benutzer später aus den Ergebnisdateien einlesen, wobei die Sekundärstrukturanteile in übersichtlicher Form, gegliedert nach den verwendeten Basissätzen, dargestellt werden. Die sukzessive Darstellung mehrere simultan geladene Ausgabedateien ist auch hierbei möglich. Für eine visuelle Prüfung der Güte von Berechnungen existiert die Option, zuvor gespeicherte Spektren-Dateien zu laden und für jede der drei CDPro-Methoden Basissatz-selektiv das gemessene, das errechnete und das Differenzspektrum graphisch einzusehen.

Auf diese Weise ist es z.B. möglich Wellenlängenbereiche, vor allem im fernen UV-Bereich, in dem selten verlässliche Spektren gemessen werden können, und bei denen oft starke Abweichungen zwischen gemessenem und errechnetem Spektrum auftreten, graphisch auszumachen und in einer erneuten Analyse auszulassen.

Abbildung 3.10: Hauptmenü des Programms *CD-Deconvolution*.

Da die gemessenen CD-Spektren für eine Auswertung normiert sein müssen und daher in Einheiten von  $\Delta\epsilon$  pro Aminosäure ( $= \Delta\epsilon_r$ ) (Kap. 2.2.1, Gl. (2.48) und (2.49)) für die Dekonvolution vorzuliegen haben, sind folgende Spezifikationen nötig:

1. die Proteinkonzentration  $c$ ,
2. die Länge der Messzelle sowie
3. die Zahl der Aminosäuren, aus denen das untersuchte Protein besteht.

Der Bereich, in dem die Amplituden  $y(\lambda)$  der normierten CD-Spektren (Normierung auf  $\Delta\epsilon_r$ ) variieren können, lässt sich anhand der für die reinen Sekundärstrukturen (Helix, Faltblatt, Turn und *random coil*) berechenbaren theoretischen Spektren und der aus ihnen superponierbaren Spektren eingrenzen. Dabei kann die maximale Amplitude  $y_{\max}$ , ebenso wie die minimale  $y_{\min}$  innerhalb eines bestimmten Wellenlängenbereichs  $\Delta\lambda$  nie einen gewissen Wert unter- bzw. überschreiten. Die oberen und unteren Grenzen für  $y_{\max}$  und  $y_{\min}$  sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tritt die Schwierigkeit auf, dass die Proteinkonzentration  $c$  nur vage bestimmt werden kann, bietet das Programm dem Benutzer die Möglichkeit das normierte Spektrum nach Angabe der drei Messparameter, inklusive einem geschätzten Wert für  $c$ , einzusehen. Damit ist eine grobe Fehlbestimmungen der Proteinkonzentration bereits im Vorfeld eruiert aufgrund der Tatsache, dass  $y_{\max}$  und  $y_{\min}$  der normierten Amplituden nur innerhalb eines gewissen Elongationsbereichs variieren können (s. Tabelle 3.2).

	$\Delta\lambda = 200\text{--}300\text{nm}$	$\Delta\lambda = 178\text{--}300\text{nm}$
positive Amplituden	$0,5 < y_{\max}$	$y_{\max} < 22$
negative Amplituden	$y_{\min} < -0,5$	$-11 < y_{\min}$

Tabelle 3.2: Spezifikation der Bereiche, in denen sich die maximalen und minimalen Amplituden  $y_{\max}$  bzw.  $y_{\min}$  in Einheiten von  $\Delta\epsilon$  pro Aminosäure – [ $\text{Liter}\cdot\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] – eines korrekt normierten CD-Spektrums innerhalb der jeweiligen Wellenlängenbereiche  $\Delta\lambda$  befinden müssen.

Schließlich kann man noch, mittels *CD-Deconvolution*, die gemessenen Spektren der Referenzproteine von CDPro einsehen, ebenso wie die theoretischen Spektren der reinen Sekundärstrukturen –  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -Turn und *random coil*. Abbildung 4.2 zeigt das hierfür entsprechende Exceltabellenblatt. Für eine beliebige Komposition der Sekundärstruktur-Anteile ist es zudem möglich sich das zugehörige theoretische CD-Spektrum graphisch anzeigen zu lassen.

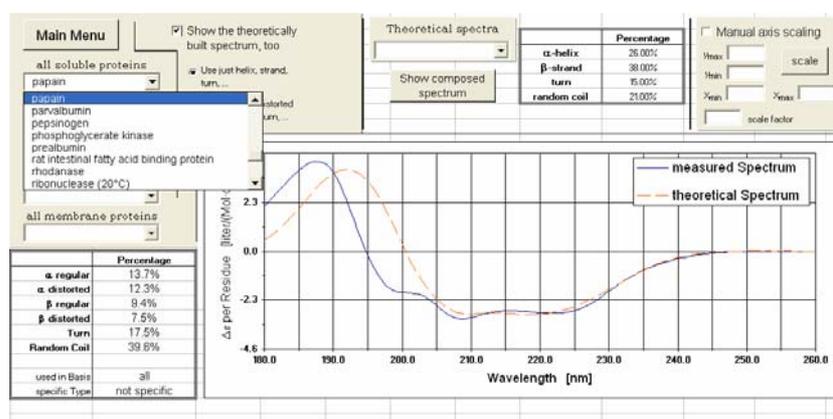


Abbildung 3.11: Menü zur Einsicht der CD-Spektren sämtlicher in CDPro enthaltenen Referenzproteine und für die Darstellung theoretischer Spektren.

### 3.6.2 Berechnung der theoretischen CD-Spektren

Für die Implementierung der theoretischen Spektren reiner Sekundärstrukturen in *CD-Deconvolution* wurden diese aus den 48 Referenzspektren des Programmpaketes CDPro errechnet.

Dabei wurden vier Sekundärstruktur-Klassen – Helix,  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -Turn und *random coil* – unterschieden. Zu Vergleichszwecken fand in einer zweiten, erweiterten Analyse eine zusätzliche Aufspaltung der Helix- und Faltblatt-Klasse in reguläre und gestörte Anteile statt (vgl. Kap. 2.2.6). Aus Gl. (2.57) leiten sich die beiden, den Berechnungen zugrunde liegenden Gleichungssysteme ab, wobei die einzelnen Gleichungen, mit  $i$  als Zeilenindex, die folgende allgemeine Form besitzen

$$y_{\lambda,i}^{\text{ref}} = a_i \cdot y_{\lambda}^{\alpha} + b_i \cdot y_{\lambda}^{\beta} + c_i \cdot y_{\lambda}^{\text{turn}} + d_i \cdot y_{\lambda}^{\text{coil}}, \quad (3.16)$$

bzw.

$$y_{\lambda,i}^{\text{ref}} = g_i \cdot y_{\lambda}^{\alpha\text{-reg}} + h_i \cdot y_{\lambda}^{\alpha\text{-dis}} + k_i \cdot y_{\lambda}^{\beta\text{-reg}} + l_i \cdot y_{\lambda}^{\beta\text{-dis}} + m_i \cdot y_{\lambda}^{\text{turn}} + n_i \cdot y_{\lambda}^{\text{coil}}. \quad (3.17)$$

In die aus (3.16) und (3.17) sich ableitenden Gleichungssysteme gehen die CD-Spektren, mit  $y_{\lambda,i}^{\text{ref}}$  als den Elongationen des  $i$ -ten Referenzproteins, sowie die jeweiligen Sekundärstruktur-Anteile ( $a_i$  bis  $d_i$ , bzw.  $g_i$  bis  $n_i$ ) als bekannte Parameter ein. Die Sekundärstruktur von Referenzproteinen wird üblicherweise aus NMR-Messungen bzw. Röntgenstrukturanalysen gewonnen.

In dem zu Gleichung (3.16) gehörigen Gleichungssystem sind die Amplituden  $y_{\lambda}^{\alpha}$ ,  $y_{\lambda}^{\beta}$ ,  $y_{\lambda}^{\text{turn}}$  und  $y_{\lambda}^{\text{coil}}$  die zu bestimmenden Variablen. Für einen Wellenlängenbereich von 240–190nm und einen Messpunkteabstand von 1nm existieren jeweils 51 lineare Gleichungssysteme (unterschieden durch den Index  $\lambda$ ), zu deren Lösung eine Mathematica-Routine (Mathematica 5.2, Wolfram Research Inc., U.S.) geschrieben wurde. Abhängig von der Zahl der Referenzspektren sind die Gleichungssysteme normalerweise überbestimmt, weshalb die Lösungen durch einen Fit mit der kleinsten mittleren Standardabweichung als Konvergenzkriterium gewonnen wurden.

Insgesamt standen 48 Spektren von verschiedenen Referenzproteinen zur Verfügung (s. Kap. 2.2.7, Tab. 2.3). Um lineare Abhängigkeiten in den Gleichungssystemen zu vermeiden wurden die 5 *random coil*-Spektren von Sreerama et al.<sup>[240]</sup> zu einem Spektrum gemittelt, da für alle 5 ein unstrukturierter Anteil von 90% und die übrigen Sekundärstrukturanteile mit je 2% angegeben wurde.

In die Berechnung des Spektrums einer einzelnen Sekundärstruktur-Klasse gingen nur Spektren von Proteinen mit hohem Anteil der jeweiligen Struktur-Klasse und (nach Möglichkeit) lediglich geringem Anteil aller übrigen Klassen ein. So wurde beispielsweise das Bungarotoxin-Spektrum nicht mit in die Bestimmung des reinen  $\beta$ -Turn-Spektrums hineingenommen, da das Protein zwar 28,4% Turn-Struktur aufweist, aber gleichzeitig zu 60,8% ungeordnet ist. In Tab. 3.3 und 3.4 sind die nach diesem Kriterium festgelegten Basissätze aufgelistet. Innerhalb von 240–190nm wurden die CD-Spektren sämtlicher aufgelisteter Proteine herangezogen. Für die darüber hinausgehenden Bereiche von 190–178nm bzw. 260–240nm standen nur Spektren der fett markierten Proteine zur Verfügung.

Helix	$\beta$ -Faltblatt
Lactate Dehydrogenase	$\alpha$ -Chymotrypsin
Hemerythrin	$\alpha$ -Chymotrypsinogen
Hemoglobin	Bence Jones Protein
Myoglobin	Beta-Lactoglobulin
T4 Lysozym	Concanavalin A
Thermolysin	Elastase
Triose Phosphate Isomerase	g-Crystallin
Adenylate Kinase	Pepsinogen
Carboxypeptidase A	Prealbumin
Colicin A	Ribonuclease A
Insulin	Superoxide Dismutase
Parvalbumin	Tumor Necrosis Factor
	green fluorescence Protein
	Rat intestinal Fatty Acid binding Protein
<b>Mindestanteil an reg. Helix: 23%</b>	<b>Mindestanteil an reg. Faltblatt: 20%</b>

Tabelle 3.3: Verwendete Proteine zur Bestimmung der Spektren für reine Helix und reines  $\beta$ -Faltblatt mit Angabe des Mindestprozentwerts an regulärer Helix- bzw. Faltblatt-Struktur.

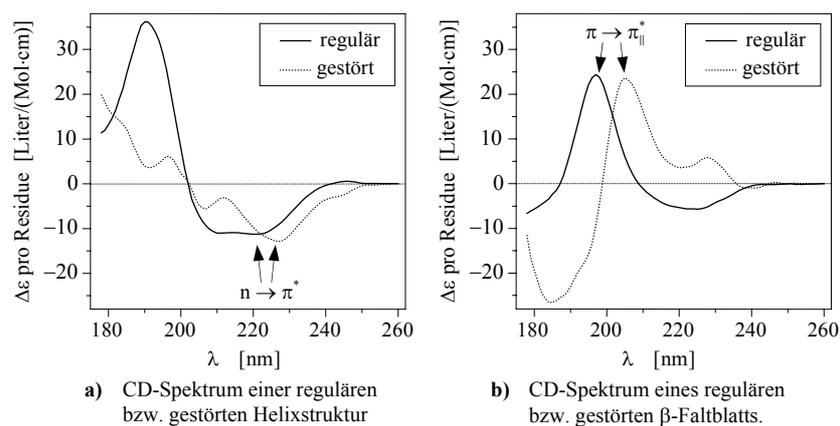


Abbildung 3.12: Auf der Grundlage von Gl. (3.17) bestimmte theoretische Spektren mittels der in Tab. 3.3 spezifizierten Proteine.

<b><math>\beta</math>-Turn</b>	<i>random coil</i>
a-Chymotrypsinogen	a-Bungarotoxin
Alcohol Dehydrogenase	a-Chymotrypsin
Azurin	a-Chymotrypsinogen
Carbonic Anhydrase	Azurin
Cytochrome C	Carbonic Anhydrase
Elastase	Cytochrome C
Glyceraldehyde 3-P Dehydrogenase	Elastase
Lysozyme	Glyceraldehyde 3-P Dehydrogenase
Phosphoglycerate Kinase	Papain
Ribonuclease A	Phosphoglycerate Kinase
Rhodanase	Rhodanase
Subtilisin BPN	Subtilisin novo
Subtilisin novo	Superoxide Dismutase
Superoxide Dismutase	Adenylate Kinase
	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
	Nuclease
	Mittelwertspektrum von 5 denaturierten Proteinen
<b>Mindestanteil an <math>\beta</math>-Turn: 20%</b>	<b>Mindestanteil an <i>random coil</i>: 30%</b>

Tabelle 3.4: Verwendete Proteine zur Bestimmung der Spektren für reinen  $\beta$ -Turn und ungeordnete Struktur mit Angabe des Mindestprozentwerts an Turn- bzw. *random coil*-Struktur. Die 5 denaturierten Proteine von Sreerama et al.<sup>[240]</sup> sind in Tab. 2.3 aufgelistet.

Abbildung 2.14 gibt die aus Gl. (3.16) gewonnenen CD-Spektren der reinen Sekundärstrukturen wider. Die zusätzliche Differenzierung zwischen regulären und gestörten Strukturanteilen ändert den Verlauf für das  $\beta$ -Turn- und das *random coil*-Spektrum lediglich marginal. Demgegenüber treten deutliche Unterschiede zwischen den in Abb. 3.12 enthaltenen Spektren der regulären und gestörten Helices bzw. Faltblätter auf.

Aus Abb. 3.12a) geht für den Übergang von regulärer in gestörte Helix eine Rotverschiebung des  $n\pi^*$ -Übergangs hervor (vgl. auch Abb. 2.15). Gleiches gilt in Abb. 3.12b) für den  $\pi\pi^*$ -Übergang bei den  $\beta$ -Faltblatt-Spektren.

### 3.7 Experimente mittels dynamischer Lichtstreuung

Zur Untersuchung der Aggregationsneigung des Proteins  $\alpha$ -Synuclein bzw. der Bindung zwischen  $\alpha$ -Synuclein und kleinen unilamellaren Lipidvesikeln, sowie um die Größenverteilung dieser Vesikel zu bestimmen, wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) eingesetzt.

Das von der Firma MALVERN Instruments GmbH (Herrenberg, Deutschland) vertriebene HPPS-Gerät (High Performance Particle Sizer), mit dem die DLS-Messungen durchgeführt wurden, enthält einen Helium-Neon-Laser mit einer Leistung von 10mW. Das emittierte Licht besitzt eine Wellenlänge von 632,8nm. Der Durchmesser des Laserstrahls beträgt 100nm. Gleiches gilt für das Detektorfenster. Unter der Annahme perfekter zylindrischer Strahlgänge (Vernachlässigung von Randeffekten, wie Abnahme der Laserintensität im Randbereich) berechnet sich das Mess-Streuvolumen zu  $7,159 \cdot 10^{-6}$ ml (bzw.  $7,159 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ ).

Damit bei hohen Teilchenkonzentrationen die Streuintensität am Detektor nicht zu groß wird, regelt ein Attenuator zu Beginn jeder Messung die Strahlintensität und passt sie der individuellen Streuintensität der Probe an. Gemessen wird unter einem Winkel von  $173^\circ$  bezogen auf den Strahlengang des einfallenden Laserlichts. Die Einstellung dieses Winkels bietet mehrere Vorteile. Zum einen durchläuft das Streulicht nur eine geringe Lösungsschicht, was die Wahrscheinlichkeit für Mehrfachstreuung minimiert. Gleichzeitig vergrößert sich das Streuvolumen im Vergleich zu einer  $90^\circ$ -Einstellung um mehr als das 6-fache ( $\rightarrow$  Erhöhung der Mess-Sensitivität).

Die Küvette befindet sich in einer temperierbaren Kammer und ist bzgl. der Vertikalen leicht gekippt positioniert, wodurch störende Reflexe des Küvettenglasses nicht in den Detektor gelangen. Für die Temperaturäquilibrierung im HPPS wurden zwischen 10 und 30min anberaumt, um „Schlieren“ in der Probe aufgrund von Temperaturgradienten zu vermeiden. Differenzen zwischen der Proben- und der Messtemperatur spielen dagegen für die Genauigkeit der Bestimmung einer Radiusverteilung prinzipiell nur eine geringe Rolle, selbst wenn diese relativ weit auseinanderliegen (bis zu etwa  $0,5^\circ\text{C}$ ).

DLS-Messungen sind extrem Schmutz-empfindlich. Aus diesem Grund wurden die Proben in einer mit reinem Stickstoff beblasenen Kammer durch Filtrierung von Verunreinigungen gesäubert und danach sofort in Küvetten gefüllt, die mit Hilfe von Parafilm-umkleideten Teflonstößeln luftdicht verschlossen wurden. In Abhängigkeit von der Größe der zu messenden Partikel wurden Anotop Spritzenvorsatzfilter der Firma Whatman mit einer spezifizierten mittleren Porengröße von  $0,02\mu\text{m}$ ,  $0,22\mu\text{m}$  bzw.  $0,45\mu\text{m}$  verwendet.

Die Steuerung der Messungen, ebenso wie deren Auswertung wurde mit der von der Firma ALV GmbH (Langen, Deutschland) entwickelten ALV-Correlator Software Version 3.0 durchgeführt und zum Teil durch selbst verfasste Pascal-Skripten automatisiert. Die im Anhang II gegebene Diskussion hinsichtlich der Wahl der Fitparameter bezieht sich ausschließlich auf die ALV-Software.

### *Diffusions- & Photonenrauschen*

Die durch die statistische Natur der Diffusionsbewegung sowie des Lichtstreuungsprozesses bedingte Unsicherheit im Verlauf einer Korrelationsfunktion wird allgemein als *Diffusionsrauschen* bezeichnet.<sup>[242,279]</sup> Für die Eliminierung des Diffusionsrauschens, d.h. zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, sind lange Messzeiten erforderlich; das S/N-Verhältnis ist dabei proportional zu  $\sqrt{t}$ , mit  $t$  als der Messzeit.

Allerdings zeigen die zu untersuchenden Partikel teilweise eine innere Dynamik, die die Teilchen reversiblen oder irreversiblen Konformations- bzw. Strukturänderungen unterwirft, wie etwa Aggregations- oder Fusionsprozessen. In diesem Fall führen sehr lange Messzeiten zu einer Superposition mehrerer ähnlicher Verteilungsspektren.

Demgegenüber enthält eine Korrelationsfunktion  $g(t)$ , die mittels kurzer Messzeiten aufgenommen wurde, in ihrem Verlauf starke, rausch-bedingte Fluktuationen, die beim Fitten oft artifiziell als Diffusionskorrelations-Zerfälle interpretiert werden. Zur Validierung einer Radiusverteilung wurden stets zwischen 3 und 10 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Zusätzlich zum Diffusionsrauschen wird jede Korrelationsfunktion durch Hintergrundstrahlung, dem sog. *Photonenrauschen*, beeinflusst. Um diesen Einfluss zu minimieren sind mehrere Einzelmessungen zu einer Gesamtmessung zu akkumulieren. Ab 4 Einzelmessungen ist das Photonenrauschen aus der Gesamtkorrelationsfunktion weitgehend eliminiert. Als günstig haben sich Messzeiten von 900–3000sec pro Einzelmessung erwiesen.

### *Anzahlfluktuationen*

Neben dem Diffusionsrauschen können auch Anzahlfluktuationen Einfluss auf den Verlauf von Korrelationsfunktionen haben. Treten Anzahlfluktuationen von Teilchen einer bestimmten Größe auf, äußert sich das in einer lokal stärker verrauschten Korrelationsfunktion, wie in Abb. 3.13b) illustriert. Je nachdem, in welchem Zeitfenster das Rauschen auftritt, rühren diese Störeinflüsse von kleineren oder größeren Partikeln her. Anzahlfluktuationen machen sich überdies im Intensitätsdiagramm durch periodische Schwankungen bemerkbar; s. Abb. 3.13a). Um solche Schwankungen feststellen zu können, sollte die Messzeit pro Einzelmessung nicht unter 60–180s liegen.

Gelegentlich sind auch Korrelationsverläufe zu beobachten, die einer gedämpften Schwingung sehr ähneln (s. Abb. 3.13b)). In diesem Fall können Anzahlfluktuationen, Luftblasen oder thermische „Schlieren“ in der Probe dafür verantwortlich sein. Zeigt die Korrelationsfunktion ein unruhiges Ausklingen, kann das unter Umständen auch auf eine in der Nähe des Messgeräts befindliche Vibrationsquelle zurückgeführt werden.

MALVERN spezifiziert, dass ab einer Teilchenkonzentration von  $10^3$  Partikeln im Streuvolumen – das entspricht einer Konzentration von  $c = 2,2 \cdot 10^{-4} \text{ nM}$  – der Einfluss der statistischen Schwankung der Partikelanzahl auf die Messung vernachlässigbar ist. Üblicherweise liegt die Partikelkonzentration kaum unter  $1 \mu\text{M}$ , so dass sich mindestens  $10^9$  Teilchen im Streuvolumen befinden.

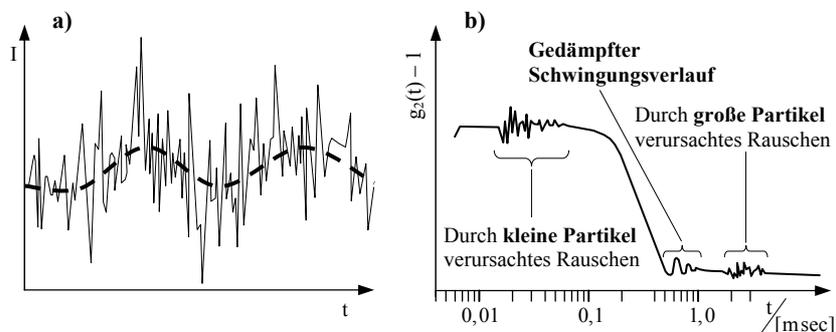


Abbildung 3.13: a) Periodische Intensitätsschwankungen, wie sie bei Anzahlfluktuationen auftreten.  
b) Korrelationsfunktion mit verschiedenen typischen Störbildern.

#### *Partikel-Partikel-Interaktionen*

Bei hohen Konzentrationen treten Wechselwirkungen zwischen den Teilchen auf. Dadurch sind die Bewegungen der Partikel über einen längeren Zeitraum korreliert, was zu scheinbar größeren Radien führt. Als grobe Grenze, ab der mit nicht-vernachlässigbaren Partikel-Interaktionen zu rechnen ist, kann  $c = 50 \text{ mM}$  angesehen werden.

#### *Mehrfachstreuung*

Ein weiterer Effekt, der bei hohen Partikelkonzentrationen auftritt, ist die Mehrfachstreuung. In diesem Fall geht die Korrelation schneller verloren als bei Einfachstreuung. Dementsprechend werden daher zu kleine Radien erhalten. Um bei hohen Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit von Mehrfachstreuprozessen zu minimieren und gleichzeitig bei niedrigen Konzentrationen das Streuvolumen möglichst groß wählen zu können, bietet das HPPS die Möglichkeit das Streuzentrum durch Variation der Küvettenposition weiter ins Küvetteninnere oder näher an den Rand zu legen.

## Kapitel 4

# Ergebnisse

Die experimentellen Ergebnisse wurden entsprechend den inhaltlichen Schwerpunkten untergliedert:

- Die ersten Kapitel umfassen die Resultate der CD- und DLS-Messungen, die im Hinblick auf Parkinson-relevante Fragestellungen durchgeführt wurden.
- Der folgende Teil beinhaltet die NMR-Analyse spezifischer Sphingomyelin-induzierter Membraneigenschaften.

### 4.1 Biophysikalische Eigenschaften von $\alpha$ -Synuclein

Besonderes Augenmerk wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Wechselwirkung von  $\alpha$ S mit kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV – *small unilamellar vesicles*), von 10–15nm Radius, verschiedener Zusammensetzung gerichtet. Da  $\alpha$ S vornehmlich in den Synapsen von Neuronen des Zentralnervensystems vorkommt<sup>[280-282]</sup> und nach Jensen et al.<sup>[283]</sup> an synaptische Vesikel des Rattenhirns bindet, dienen diese SUV als Modellsysteme für die Erforschung einer möglichen Wechselwirkung von  $\alpha$ S mit synaptischen Vesikeln im humanen Gehirn.

Die Experimente beinhalten u.a. Untersuchungen zur Abhängigkeit dieser Wechselwirkung von der Lipidkomposition der Vesikel. Außerdem wird die Frage behandelt, inwieweit die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Bindungs-Eigenschaften des  $\alpha$ S beeinflussen. Diese Untersuchungen zielen auf das Auffinden möglicher  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerter Mechanismen ab, an denen  $\alpha$ S bei der Exocytose (vgl. Kap. 1.3.2) beteiligt sein könnte. In einer weiteren Experimentserie erfolgt die Analyse der Aggregationsdynamik von  $\alpha$ S mittels DLS über einen mehr als einmonatigen Zeitraum.

Abb. 4.1 enthält das Anzahl-gewichtete Radiusspektrum und den Verlauf der zugehörigen gemessenen Korrelationsfunktion. Der hydrodynamische Radius von  $\alpha$ S wurde in einer Serie aus 10 Einzel-DLS-Messungen zu  $3,29 \pm 0,119$ nm bestimmt. Das Protein besitzt unmittelbar nach der Reinigung über eine FPLC-Anlage eine ungefal-

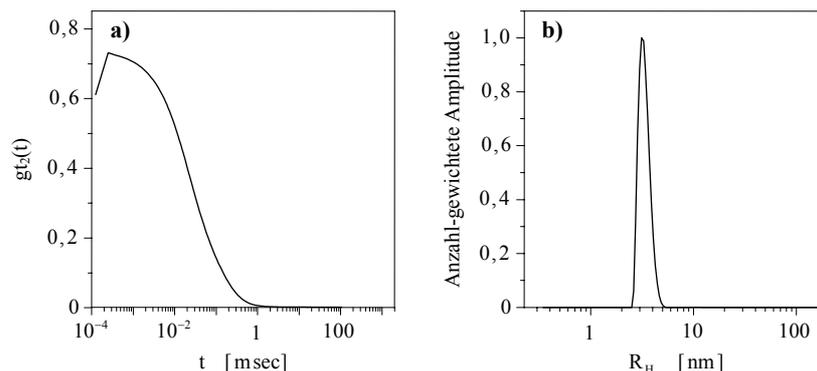


Abbildung 4.1: DLS-Messung des isolierten  $\alpha$ S direkt nach der FPLC-Säulenreinigung, bei  $T = 37^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$  und  $\text{pH} = 7,2$ .<sup>35)</sup>

- a) Gemessene Korrelationsfunktion;  
b) Anzahl-gewichtetes Radiusspektrum.

tete Struktur, wie anhand des in Abb. 4.2 gezeigten CD-Spektrums ersichtlich ist (vgl. Abb. 2.14, S. 66). Daher erfolgte die Umrechnung der Intensitäts-gewichteten in die Anzahl-gewichtete Radiusverteilung (Abb. 4.1b)) mittels Gl. (2.102) unter Verwendung des Strukturfaktors  $P(q, R_G)$  aus Gl. (2.72) und der für ein ungefaltetes Protein gültigen Relation  $R_G/R_H = 1,51$ .<sup>[284]</sup> Das Partikelvolumen wurde für die Umrechnung näherungsweise als  $V_H \approx (4\pi/3) \cdot R_H^3$  gesetzt.

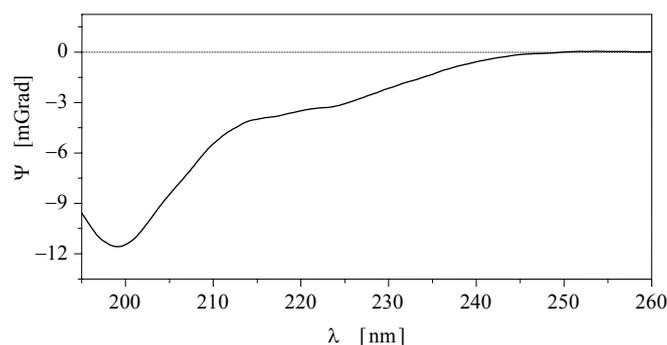


Abbildung 4.2: CD-Spektrum des frisch gereinigten  $\alpha$ S.  
Messbedingungen:  $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$  sowie  $T = 37^\circ\text{C}$ ;  $c_{\alpha\text{S}}$  unbekannt.

<sup>35)</sup> Die Konzentration  $c_{\alpha\text{S}}$  wurde hierbei nach der Filtrierung über einen  $0,02\mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter nicht bestimmt, um Probenverunreinigungen zu vermeiden.

#### 4.1.1 Wechselwirkung von $\alpha$ S mit kleinen unilamellaren Vesikeln

Der Einfluss der effektiven Ladung unilamellarer Phospholipid-Vesikel auf die Bindung von  $\alpha$ S an diese Liposomen wurde bereits eingehend untersucht (s. Kap. 1.4).<sup>[130-132,169]</sup> Bislang unbeachtet blieb jedoch die Abhängigkeit der Bindungsfähigkeit des  $\alpha$ S an Vesikel vom Phasenzustand der Lipidkonstituenten. Dieser Frage soll im folgenden nachgegangen werden.

Hierfür wurden CD-Messserien durchgeführt, bei denen Vesikel zu einer Synuclein-Lösung titriert wurden. Um den Circular Dichroismus des Lipids aus den Proteinspektren zu eliminieren wurden Kontroll-Titrations der Vesikel zu reiner Pufferlösung aufgenommen und von den  $\alpha$ S-CD-Spektren subtrahiert. Die bei den Titrations auftretende Verdünnung der Proteinlösung wurde bei der Umrechnung der Spektren in Einheiten von molarer Elliptizität pro Residue  $[\Theta_r]$  korrigiert. Aufgrund der hohen Salzkonzentration des oft verwendeten Puffers, mit  $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$ ,  $20\text{mM}$  Phosphat und  $\text{pH} = 7,2$ , waren die CD-Spektren unterhalb von  $210\text{nm}$  üblicherweise stark verrauscht und für eine Sekundärstruktur-Analyse nicht verwendbar. Daher wurde als Maß für die Helixfaltung  $[\Theta_r]_{222}$ , d.h.  $[\Theta_r]$  bei  $\lambda = 222\text{nm}$ , benutzt.

##### *Bindung an negativ geladene Vesikel oberhalb von $T_m$*

Zu Vergleichszwecken wurden zunächst CD-Titrations mit verschieden stark negativ geladenen SUV durchgeführt. Abbildung 4.3 zeigt  $[\Theta_r]_{222}$ , als Funktion des Lipid/Protein-Verhältnisses  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}}$  für verschiedene Vesikelkompositionen, bestehend aus POPC und POPG.<sup>36)</sup>

Während die Titration reiner, ungeladener POPC-SUV nahezu keine Änderung von  $[\Theta_r]_{222}$  bewirkt, nimmt der Betrag der Steigung von  $[\Theta_r]_{222}$  mit wachsendem POPG-Gehalt, d.h. mit höherem Anteil an negativ geladenem Lipid, während der ersten Titrations ungefähr linear zu, wobei für die beiden Mischsysteme das Verhältnis der Steigungen für die ersten drei Titrationschritte mit 1,4 etwa dem Verhältnis der in den Mischungen enthaltenen POPG-Anteile entspricht. Für alle drei Systeme mit negativem Ladungsanteil ist gleichfalls eine asymptotische Näherung von  $[\Theta_r]_{222}$  gegen  $-17 \cdot 10^3 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2 / \text{dMol}$  für  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} \rightarrow \infty$  erkennbar.

##### *Bindung an Gelphasen-Vesikel*

In den bisher durchgeführten Untersuchungen zur Bindung von  $\alpha$ S an Vesikel wurden hauptsächlich Phospholipide mit mindestens einer ungesättigten Fettsäurekette verwendet. Dadurch befanden sich die Vesikelmembranen oberhalb der Phasenübergangstemperatur  $T_m$  in der flüssig-kristallinen  $L_\alpha$ -Phase (Kap. 1.2.7).

---

<sup>36)</sup> Die vollständigen Bezeichnungen der Lipide finden sich unter:  
**Verwendete Abkürzungen** auf S. X–XII.

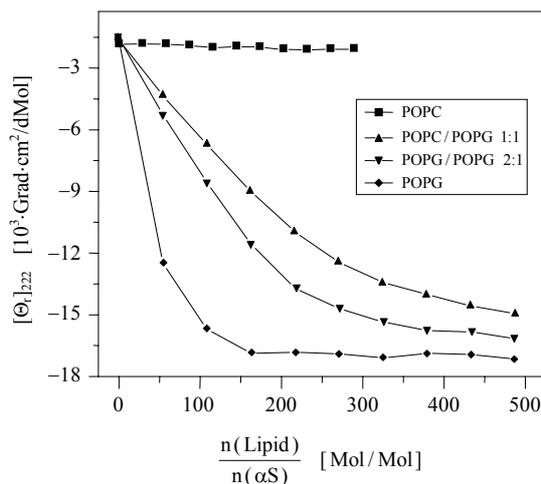
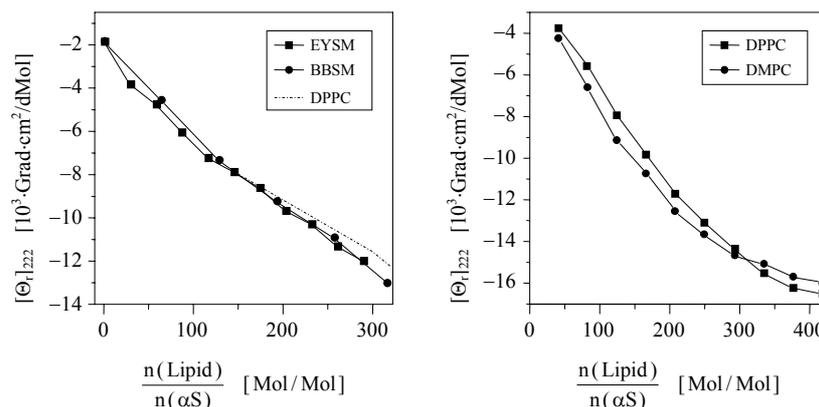


Abbildung 4.3: Molare Elliptizität pro Amidgruppe bei  $\lambda = 222\text{nm}$  aufgetragen gegen  $n_{\text{Lipid}/\alpha\text{S}}$ . Messbedingungen: Lösungsvolumen zu Beginn der Titrationsen  $V_0 = 500\mu\text{l}$ ,  $c_0(\alpha\text{S}) = 8,31\mu\text{M}$ , Titrationseneinheit:  $5\mu\text{l}$  mit  $c_{\text{Lipid}} = 45\text{mM}$ ; Puffer:  $c_{\text{KCl}} = 100\text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 20\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ .

Allerdings besitzen die meisten, in biologischen Membranen vorkommenden Sphingomyelin-Lipide (SM) eine Übergangstemperatur  $T_m$  nahe  $37^\circ\text{C}$ .<sup>[285-288]</sup> Zusätzlich weist der größte Teil der Sphingolipide einen ausgeprägten *chain mismatch* auf,<sup>[285,287,289]</sup> das heißt, die Kettenlänge der Sphingosin-Alkylkette unterscheidet sich deutlich von derjenigen der N-Acylkette. Beide Eigenschaften geben dem SM ein hohes Potential laterale Lipid-Heterogenitäten bzw. -Entmischungen im physiologischen Temperaturbereich hervorzurufen<sup>[290]</sup> und so partielle Regionen geordneter Phasenstruktur in Membranen auszubilden.<sup>[58,291,292]</sup> Aus diesem Grund ist eine Untersuchung der Wechselwirkung von  $\alpha\text{S}$  mit Membranen, die sich in der Gel- bzw. in einer  $L_O$ -Phase befinden, durchaus biologisch relevant.

Als Modellsysteme wurden als erstes SM- und Phosphatidylcholin-Lipide unterschiedlicher Kettenlänge gewählt. Der Phasenübergang in den  $L_\alpha$ -Zustand tritt für multilamellare DPPC-Membranen bei  $T_m = 41^\circ\text{C}$  auf.<sup>[75]</sup> Gaber und Sheridan bestimmten  $T_m$  für DPPC-SUV zu  $38^\circ\text{C}$ .<sup>[293]</sup> Die Phasenübergangs-Temperatur für flache DMPC-Membranen liegt bei  $T_m = 23^\circ\text{C}$ ,<sup>[137]</sup> und für die respektiven SUV dürfte er sich bei ca.  $20^\circ\text{C}$  befinden. Abb. 4.4 zeigt die Titrationsen dieser Vesikel zu  $\alpha\text{S}$  bei  $T < T_m$ .

Klar erkennbar in Abb. 4.4 ist für alle vier Lipide eine signifikante Abnahme von  $[\Theta_r]_{222}$  mit zunehmendem  $n_{\text{Lipid}/\alpha\text{S}}$ , d.h. eine Faltung des Proteins. Diese ist aufgrund von ITC-Experimenten<sup>[137]</sup> auf eine Membranbindung des  $\alpha\text{S}$  zurückzuführen.



a) CD-Titration von BBSM- bzw. EYSM-SUV zu  $\alpha$ S bei  $T = 30^\circ\text{C}$

b) CD-Titration von DPPC- und DMPC-SUV zu  $\alpha$ S bei  $T = 12^\circ\text{C}$ .

Abbildung 4.4: Faltung von  $\alpha$ S durch Bindung an SUV mit geordneter Phasenstruktur bestehend aus reinem SM bzw. PC.  
 Messbedingungen: Lösungsvolumen zu Beginn der Titrations  $V_0 = 500\mu\text{l}$ ,  
 $c_0(\alpha\text{S}) = 6,92\mu\text{M}$ , Titrationseinheit:  $5\mu\text{l}$  mit  $c_{\text{Lipid}} = 20\text{mM}$ ;  
 Puffer:  $c_{\text{KCl}} = 100\text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 20\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ .

Nach den Resultaten in Abb. 4.4 ist der Grad der Proteinfaltung bei der Bindung des  $\alpha$ S sowohl an SM- als auch an PC-Vesikel nur gering von der Fettsäureketten-Zusammensetzung der Lipide abhängig, wobei bei EYSM die Palmitinsäure (C16:0) mit 84Mol% den Großteil der Acylketten ausmacht, während BBSM ca. 46Mol% Stearinsäure (C18:0) und sonst v.a. längerkettige Fettsäuren enthält (vgl. Tab. 3.1).

Ein Vergleich der Graphen aus Abb. 4.4 und 4.3 enthüllt, dass sich  $[\Theta_r]_{222}$  für die untersuchten SUV in der geordneten Phase zwischen denjenigen der beiden im flüssig-kristallinen Zustand befindlichen POPC/POPG-Mischsysteme bewegt. Das bedeutet, Bindungs- und Faltungsgrad liegen ebenfalls in der gleichen Größenordnung.

Um zu klären, inwieweit eine Temperaturabhängigkeit der Wechselwirkung von  $\alpha$ S mit Gelphasenvesikeln existiert, wurde ein Temperaturscan mit einer  $\alpha$ S-Lösung in Gegenwart von DPPC-SUV mit  $n_{\text{Lipid}/\alpha\text{S}} = 250\text{Mol/Mol}$  durchgeführt. Abb. 4.5 gibt den Verlauf von  $[\Theta_r]_{222}$  als Funktion der Temperatur wider, der in mehrere Abschnitte untergliedert werden kann:

- $T < 28^\circ\text{C}$ : In diesem Temperaturbereich ist  $[\Theta_r]_{222}$  nur schwach von  $T$  abhängig. Allerdings ist ein stetiger leichter He-

lix-Verlust mit zunehmender Temperatur klar erkennbar (s. auch Diskussion, Kap. 4.1.2);

- $28^{\circ}\text{C} < T < 38^{\circ}\text{C}$ : Bei  $28^{\circ}\text{C}$  befindet sich nach [75] ein Vorübergang, der sich auch in den CD-Daten widerspiegelt. Die Faltung verringert sich jetzt mit steigender Temperatur stärker als unterhalb von  $28^{\circ}\text{C}$ .
- $38^{\circ}\text{C} < T$ : Sobald der Phasenübergang zur  $L_{\alpha}$ -Phase überschritten ist, geht die Helixfaltung von  $\alpha\text{S}$  rapide verloren, und  $[\Theta_r]_{222}$  nähert sich asymptotisch dem Wert für das ungefaltete Protein.

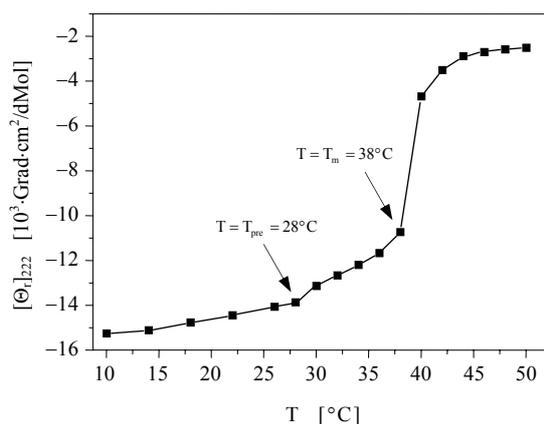


Abbildung 4.5: Temperaturabhängigkeit von  $[\Theta_r]_{222}$  für  $\alpha\text{S}$  in Gegenwart von DPPC-Schallvesikeln, mit  $c_{\alpha\text{S}} = 7,5 \mu\text{M}$  und  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 250 \text{Mol/Mol}$ . Puffer:  $c_{\text{KCl}} = 100 \text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 20 \text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ .

Ergänzend zu den CD-Messungen konnte die Bindung des Proteins an SUV gleichfalls mittels DLS verifiziert werden. Tab. 4.1 enthält die Anzahl-gewichteten hydrodynamischen Radien von Vesikeln verschiedener Zusammensetzung in Gegenwart von  $\alpha\text{S}$  bzw. ohne in Lösung befindliches Protein.

Die in Tab. 4.1 und 4.2 angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen von  $R_{\text{H}}$  wurden jeweils aus einer Serie von 10 Einzelmessungen erhalten, wobei die Akquisition der Korrelationsfunktion für jede Messung über eine Zeitdauer von einer Stunde erfolgte. Nach Berechnung der Intensitäts-gewichteten Radiusverteilungen wurden diese in Anzahl-gewichtete Spektren gemäß Gl. (2.102) unter Verwendung des für Sphären gültigen Strukturfaktors  $P(q, R_{\text{H}})$  aus Gl. (2.70) renormiert.

	$R_H$ [nm]	
	ohne $\alpha$ S	mit $\alpha$ S
POPG	16,3 $\pm$ 0,4	17,6 $\pm$ 0,6
POPC/POPG 1:1	14,5 $\pm$ 0,5	15,6 $\pm$ 0,5
POPC/POPS 1:1	14,6 $\pm$ 0,6	16,2 $\pm$ 0,6
POPC/POPS 9:1	13,7 $\pm$ 0,5	15,0 $\pm$ 0,4
-----	-----	-----
DPPC	15,6 $\pm$ 0,3	17,1 $\pm$ 0,5
BBSM	15,7 $\pm$ 0,6	17,3 $\pm$ 0,5
BBSM + 20% Chol	15,6 $\pm$ 0,4	17,2 $\pm$ 0,6
BBSM + 33% Chol	15,6 $\pm$ 0,6	17,1 $\pm$ 0,6

Tabelle 4.1: Anzahl-gewichteter hydrodynamischer Radius von SUV verschiedener Komposition, gemessen bei  $T = 30^\circ\text{C}$ .

Bedingungen:  $c_{\text{Lipid}} = 25\text{mM}$  ohne eventuelle Cholesterol-Anteile;  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 1000$ .

Alle Liposomen zeigen eine Zunahme von  $R_H$  im Protein-adsorbierten Zustand. Die mittlere Radiusvergrößerung liegt bei 1,44nm. Das entspricht fast der Hälfte von  $R_H$  des ungebundenen, ungefalteten Proteins (vgl. Abb. 4.1b)), obwohl ca. 65% aller Peptidgruppen bei der Bindung an Vesikel oder Mizellen mit der Membranoberfläche assoziiert sind und lediglich der C-Terminus (mit den Residuen 95–140) tentakelartig in die Lösung ragt.<sup>[133,134]</sup> Zieht man jedoch in Betracht, dass die Nähe der Vesikeloberfläche sowie die C-Termini benachbarter gebundener Proteine den C-terminalen Proteinschwanz in eine eher gestreckte Konformation zwingen, wird die hohe Radiuszunahme verständlich.

Demgegenüber ergibt die Messung des  $R_H$  von DPPC-SUV in Gegenwart von  $\alpha$ S mit  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 1000$  bei  $T = 46^\circ\text{C}$ , also oberhalb des Phasenübergangs in den flüssig-kristallinen  $L_\alpha$ -Zustand,  $14,2 \pm 0,4\text{nm}$ . Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem in Tab. 4.2 protokollierten  $R_H$  für reine DPPC-SUV ohne  $\alpha$ S oberhalb von  $T_m$  überein.

Die in Tab. 4.2 enthaltenen  $R_H$ -Werte zeigen, dass die Größe der reinen Vesikel in der  $L_\alpha$ -Phase praktisch unabhängig von der Temperatur ist. Ähnliches gilt auch für die gemessenen BBSM-Vesikel unter- wie oberhalb von  $T_m$ . Lediglich im Bereich des Phasenübergangs deutet sich möglicherweise eine leichte Erhöhung des mittleren hydrodynamischen Radius an. Im Gegensatz dazu besitzen sowohl DPPC- als auch DMPC-SUV innerhalb der Gel- bzw. der  $P_\beta$ -Phase einen temperaturabhängigen Radius, der bei  $T_m$  ein Maximum durchschreitet und sich daraufhin deutlich verkleinert.

Ein Vergleich des  $R_H$  ungeladener POPC-Vesikel mit denjenigen von SUV mit negativem Ladungsanteil enthüllt eine sukzessive Vergrößerung des hydrodynamischen Radius mit zunehmender Menge an negativ geladenen Phospholipiden pro Liposom.

	$R_H$ [nm]				
	T = 12°C	T = 20°C	T = 30°C	T = 37°C	T = 46°C
POPC		13,1±0,4	13,1±0,5	13,1±0,5	13,1±0,3
POPG		16,4±0,5	16,3±0,4	16,1±0,6	16,3±0,4
POPC/POPG 1:1		14,4±0,6	14,5±0,5	14,3±0,6	14,6±0,6
POPC/POPS 1:1		14,4±0,5	14,0±0,5	14,5±0,4	14,3±0,6
POPC/POPS 9:1		13,5±0,4	13,7±0,5	13,4±0,6	13,6±0,4
DMPC	11,4±0,5	12,4±0,4	11,0±0,5	11,1±0,5	11,4±0,4
DPPC	13,1±0,6	14,0±0,3	15,6±0,3	16,6±0,5	14,0±0,4
BBSM		15,5±0,6	15,7±0,6	15,8±0,6	15,7±0,4
BBSM + 20% Chol		15,3±0,6	15,6±0,5	16,0±0,5	15,5±0,5
BBSM + 33% Chol		14,9±0,4	15,6±0,4	15,8±0,4	15,4±0,4

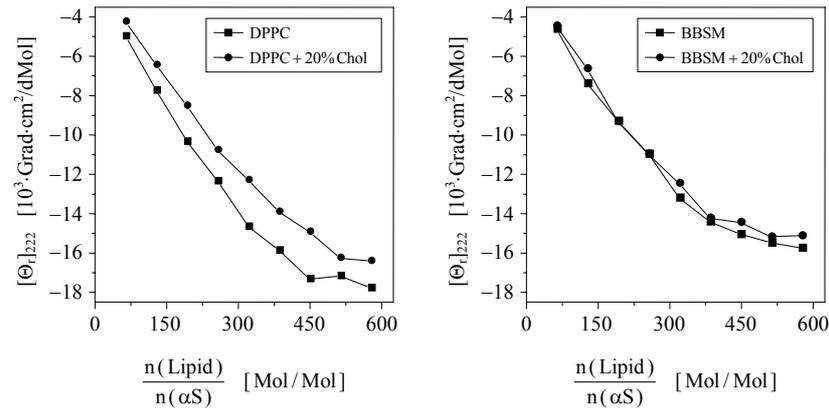
Tabelle 4.2: Anzahl-gewichteter hydrodynamischer Radius kleiner Vesikel unterschiedlicher Zusammensetzung bei verschiedenen Temperaturen, mit  $c_{\text{Lipid}} = 25\text{mM}$  (ohne Berücksichtigung evtl. Cholesterol-Anteile).

Entsprechend den in Tab. 4.2 protokollierten Messungen der 1:1-molaren POPC/POPG- bzw. POPC/POPS-Systeme scheint die Struktur der Kopfgruppe nur einen geringfügigen Einfluss auf die Ausdehnung der Membransphären zu besitzen.

Da Cholesterol (Chol) bei eukaryontischen Zellen einen hohen Molanteil der lipidartigen Membrankomponenten ausmacht und beispielsweise die Eigenschaften von SM-reichen Domänen maßgeblich beeinflusst, wurde die Faltungsneigung von  $\alpha\text{S}$  auch in Abhängigkeit des Cholesterol-Anteils der Phospholipid-Vesikel untersucht.

Für SUV in der geordneten Lipidphase zeigt Abb. 4.6 die Unterschiede von  $[\Theta_r]_{222}$  für Membranen mit und ohne Cholesterol. Bei den BBSM-SUV (Abb. 4.6b)) ändert sich  $[\Theta_r]_{222}$  durch Beimischung des Sterols praktisch überhaupt nicht, d.h. die für  $\alpha\text{S}$  Faltungs-bestimmenden Membraneigenschaften werden durch die Gegenwart von Cholesterol höchstens marginal geändert.

Für das DPPC-System ist dagegen eine mittlere Verringerung des Betrags von  $[\Theta_r]_{222}$  um  $1,5 \cdot 10^3 \text{Grad}\cdot\text{cm}^2/\text{dMol}$  zu beobachten. Demnach muss der Gesamthelixanteil aller in Lösung befindlichen Proteine im binären DPPC/Chol-SUV-System erniedrigt worden sein. Folglich ist entweder der an die Vesikel bindende molare Anteil  $n_b$  der vorhandenen Proteine erniedrigt und/oder aber die Liposomen-adsorbieren  $\alpha\text{S}$ -Moleküle tragen eine verminderte Helixfaltung.



a) CD-Titration von reinen DPPC-SUV bzw. mit 20Mol% Cholesterol zu  $\alpha$ S.

b) CD-Titration von reinen BBSM-SUV bzw. mit 20Mol% Cholesterol zu  $\alpha$ S.

Abbildung 4.6: Faltungsabhängigkeit von  $\alpha$ S in Gegenwart von SUV in der geordneten Lipidphase mit und ohne Cholesterol-Anteil bei  $T = 30^\circ\text{C}$ .  
 Messbedingungen: Lösungsvolumen zu Beginn der Titrationen  $V_0 = 500\mu\text{l}$ ,  
 $c_0(\alpha S) = 6,23\mu\text{M}$ , Titrationseinheit:  $5\mu\text{l}$  mit  $c_{\text{Lipid}} = 40\text{mM}$ ;  
 Puffer:  $c_{\text{KCl}} = 100\text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 20\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ .

In einer ternären ungeladenen Lipidmischung, bestehend aus POPC/EYSM-1:1 plus variablem Cholesterol-Gehalt, wirkt dagegen ein steigender Sterolanteil faltungsfördernd, wenn die Temperatur so gewählt ist, dass sich das POPC in der  $L_\alpha$ -Phase befindet, das SM dagegen noch eine geordnete Phasenstruktur besitzt. Die Graphen für die entsprechenden CD-Titrationen sind in Abb. 4.7 dargestellt.

$[\Theta_r]_{222}$  ist für alle vier Mischungen bis  $n_{\text{Lip}/\alpha S} = 300$  wiederum näherungsweise eine lineare Funktion von  $n_{\text{Lip}/\alpha S}$ . Weiterhin deutet sich eine Asymptotik des  $[\Theta_r]_{222}$ -Verlaufs bzgl. des Cholesterol-Gehalts in den SUV an, so dass man erwarten kann, dass wahrscheinlich bei einem Sterolanteil von 33–50Mol% die Abhängigkeit des Verlaufs der Funktion  $[\Theta_r]_{222}(n_{\text{Lip}/\alpha S})$  von der Cholesterol-Menge in den SUV in eine Sättigung mündet.

Eine deutliche Erhöhung der Steigung von  $[\Theta_r]_{222}(n_{\text{Lip}/\alpha S})$  kann für  $n_{\text{Lip}/\alpha S} \leq 300$  dagegen erzielt werden, wenn der SM-Gehalt auf Kosten der POPC-Menge in den Vesikeln ansteigt, was besonders hinsichtlich des Alterungsprozesses und der damit einhergehenden Veränderung der Membranzusammensetzungen von Interesse ist (vgl. Kap. 1.2.1). In Abb. 4.8 ist klar erkennbar, dass eine Verdopplung des SM-Anteils einen stärkeren Einfluss auf die Faltung des  $\alpha$ S (Erniedrigung von  $[\Theta_r]_{222}$ ) besitzt als eine Beimengung von 25Mol% Cholesterol in die Vesikelmembranen.

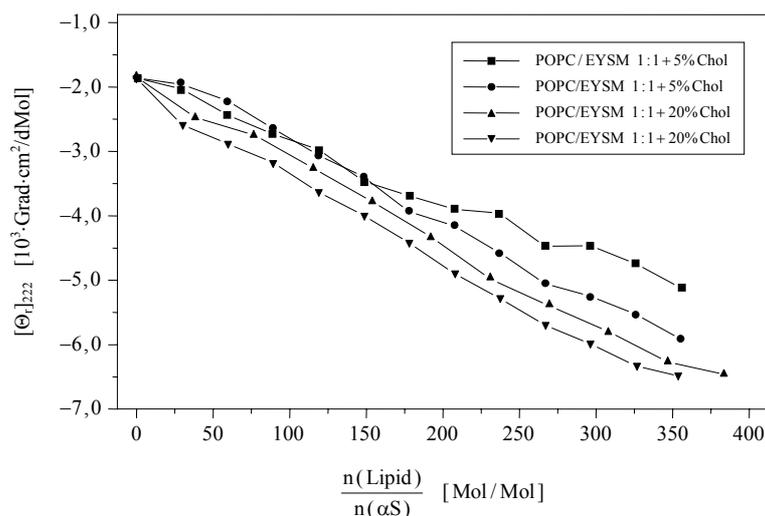


Abbildung 4.7: Abhängigkeit der  $\alpha$ S-Faltung vom Anteil an Cholesterol in SUV aus POPC/EYSM mit einem molaren Verhältnis von 1:1.

Messbedingungen:  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $c_0(\alpha\text{S}) = 9,0\mu\text{M}$  zu Beginn der Titrationen mit  $V_0 = 500\mu\text{l}$ ; Titrationseinheit:  $5\mu\text{l}$ -Schritte mit  $c_{\text{Lipid}} = 26,66\text{mM}$  (Angabe der Lipidkonzentration ohne Berücksichtigung von Cholesterol).

Beim Vergleich der molaren residualen Elliptizitäten mit und ohne Cholesterol für die beiden POPC/EYSM-Mischungen 1:1 und 1:2, stellt man fest, dass mit Zunahme des SM-Gehalts der Einfluss einer Beimengung von Cholesterol auf den Verlauf von  $[\Theta_r]_{222}$  stetig geringer wird. Als Grenzfall hierfür kann die in Abb. 4.6b) dargestellte CD-Titration mit reinen SM-SUV bzw. mit den SM/Chol-Vesikeln angesehen werden, wo das Cholesterol keinen Einfluss mehr auf den Verlauf von  $[\Theta_r]_{222}$  zeigt.

#### *Fusionsneigung von Gelphasen-SUV*

Bereits in den 80er und 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde die Fusionsneigung kleiner Vesikel intensiv untersucht.<sup>[294-300]</sup> Für DPPC-SUV unterhalb von  $T_m$  fanden Schullery et al.,<sup>[301]</sup> dass nach einer Inkubationszeit von 19 Tagen die kleinen Liposomen nahezu vollständig zu größeren Gebilden mit Radien zwischen 25nm und 30nm fusionierten.

Möglicherweise beruht die Fusionsneigung kleiner Vesikel mit geordneter Phasenstruktur auf der Tendenz dadurch den lateralen Packungsstress in der inneren wie äußeren Membranschicht zu reduzieren,<sup>[302]</sup> der durch den hohen Krümmungsgrad der Liposomen verursacht wird.<sup>[303]</sup>

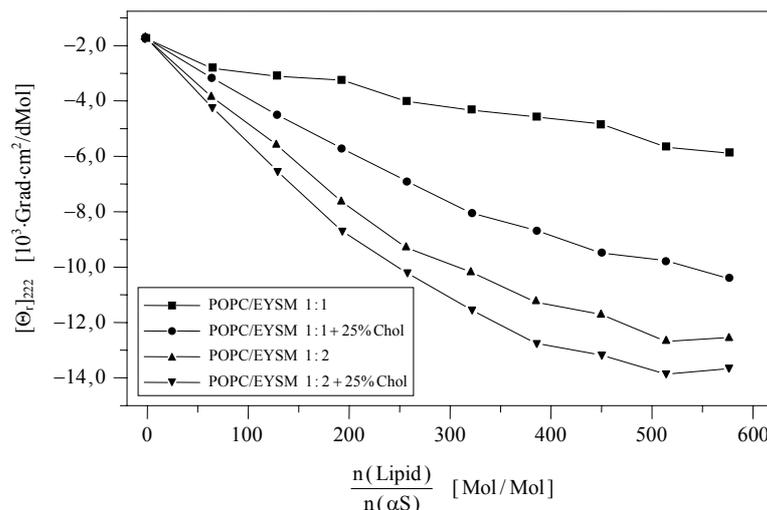


Abbildung 4.8: CD-Titrationen von POPC/EYSM/Chol-SUV zu einer  $\alpha$ S-Lösung. Messbedingungen:  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $c_0(\alpha\text{S}) = 6,23\mu\text{M}$  zu Beginn der Titrationen mit  $V_0 = 500\mu\text{l}$ ; Titrationseinheit:  $5\mu\text{l}$ -Schritte mit  $c_{\text{Lipid}} = 40,0\text{mM}$  (Angabe der Lipidkonzentration ohne Berücksichtigung von Cholesterol).

Auf der Grundlage, dass  $\alpha$ S hauptsächlich in den neuronalen synaptischen Endigungen auftritt<sup>[280-282]</sup> und an Transmitter-speichernde Vesikel bindet,<sup>[283]</sup> taucht die Frage auf, inwieweit letzteres eine funktionale Eigenschaft des  $\alpha$ S sein könnte. Im Hinblick auf diese Frage wurde das Fusionsverhalten kleiner Vesikeln in Gegenwart bzw. ohne  $\alpha$ S getestet. Abb. 4.9 zeigt das Ergebnis für DPPC-SUV bei einer Temperatur von  $22^\circ\text{C}$ .

Klar erkennbar ist für die reinen POPC-SUV im  $L_\alpha$ -Zustand, deren  $R_H$  als Kontrolle ebenfalls während der 30-tägigen Zeitspanne gemessen wurde, ein unveränderter mittlerer Radius. Demgegenüber zeigen die reinen DPPC-SUV innerhalb der ersten 3 Tage bereits eine signifikante Vergrößerung um ca. 4nm auf  $R_H \approx 17\text{nm}$ , womit das mittlere Volumen eines größeren Vesikels im Zeitbereich zwischen 5 und 10 Tagen mit  $V_{\text{gr}} \approx 20,6 \cdot 10^3 \text{nm}^3$  in guter Näherung demjenigen zweier kleiner Vesikel ( $2 \cdot V_{\text{kl}} \approx 18,4 \cdot 10^3 \text{nm}^3$ ) entspricht. Nach ungefähr 15 Tagen tritt eine erneute sprunghafte  $R_H$ -Vergrößerung der DPPC-Vesikel auf knapp 20nm in Erscheinung.

Die bei den DLS-Experimenten erreichbare Auflösung lässt eine Differenzierung der in der Lösung vorhandenen Partikel in kleine SUV (= Monomere) und größere Vesikel, bestehend aus 2 (= Dimere), bzw. aus 3 (= Trimere) oder 4 (= Tetramere) fusionierten SUV, nicht zu. Über die Art der beiden Fusionschritte kann daher allenfalls spekuliert werden, da stets nur ein mittlerer Radius angegeben werden kann.

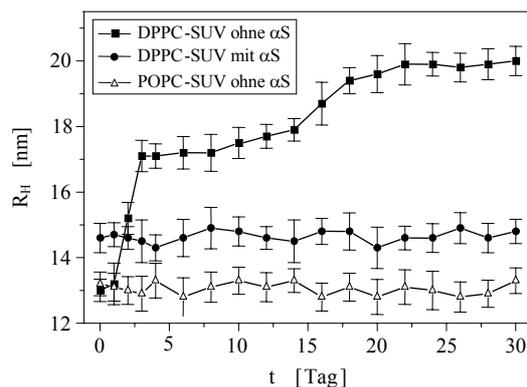


Abbildung 4.9: Fusionskinetik von DPPC-SUV mit bzw. ohne  $\alpha S$ . Zum Vergleich ist die zeitliche Änderung des  $R_H$  von POPC-SUV mit dargestellt. Messbedingungen:  $c_{KCl} = 150\text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 1\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ ;  $c_{\text{Lipid}} = 20\text{mM}$ ,  $n_{\text{lip}/\alpha S} = 200$ ;  $T = 22^\circ\text{C}$ . Angabe der Messpunkte durch Mittelung über 5 Einzelmessungen.

Der nach ungefähr 22 Tagen messbare Radius der DPPC-Vesikel legt immerhin den Schluss nahe, dass am Ende des Experiments vornehmlich Tri- und Tetramere in der Lösung vorliegen. Diese Abschätzung wird zusätzlich durch die Ergebnisse von Schullery et al.<sup>[301]</sup> gestärkt, wonach bei Inkubationszeiten länger als 20 Tage nahezu sämtliche kleine Vesikel verschwunden, d.h. zu größeren Partikeln fusioniert sind. Im intermediären Plateaubereich zwischen 5 und 15 Tagen scheint jedoch noch ein deutlicher Anteil an vesikulären Monomeren zu existieren,<sup>[301]</sup> womit in diesem Zeitraum hauptsächlich Monomere, sowie Di- und Trimere in Lösung vorliegen dürften bei stetiger Verringerung der Monomer-Spezies zugunsten der Multimere.

Wesentlich interessanter ist allerdings der Befund, dass die  $\alpha S$ -adsorbierten DPPC-Vesikel in ihrer Größe über die gesamten 30 Tage unverändert geblieben sind (für die Erörterung der physiologischen Relevanz siehe Diskussion, Kap. 4.1.2).

#### *Einfluss des $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms auf die Bindung von $\alpha S$ an SUV*

Hinsichtlich der neuronalen Signaltransduktion und der von Jensen et al.<sup>[283]</sup> gemachten Beobachtungen bzgl. der Bindung von  $\alpha S$  an Rattenhirnvesikel taucht eine weitere Frage auf. Sie betrifft das Verhalten von  $\alpha S$  während der Exocytose, genauer während des Einstroms von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den Bereich der aktiven Zonen (s. Kap. 1.3.1, Abb. 1.13b)). Da  $\text{Ca}^{2+}$  das Oberflächenpotential von Membranen beeinflusst,<sup>[304,305]</sup> ist eine Änderung der Proteinfaltung sowie der  $\alpha S$ -Vesikel-Bindung durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die synaptischen Endigungen nicht auszuschließen.

Die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytoplasma einer ruhenden Zelle liegt ungefähr bei  $0,1\mu\text{M}$  und kann durch Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Nähe der aktiven Zonen auf bis zu  $100\mu\text{M}$  ansteigen.<sup>[100 S. 177 & S. 279]</sup> Die Variation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei den durchgeführten CD-Messungen beschränkt sich deshalb im wesentlichen auf diesen Bereich. Die Proteinkonzentration bewegte sich zwischen  $7,73\mu\text{M}$  für  $c(\text{Ca}^{2+}) = 0\mu\text{M}$  und  $6,77\mu\text{M}$  für  $c(\text{Ca}^{2+}) = 300\mu\text{M}$ . Für  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}}$  wurde 200 gewählt. In Analogie zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei der Exocytose erfolgte das Zutitrieren der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nach der Zugabe von  $\alpha\text{S}$  zu den Vesikeln, d.h. nach der Protein-Lipid-Bindung.

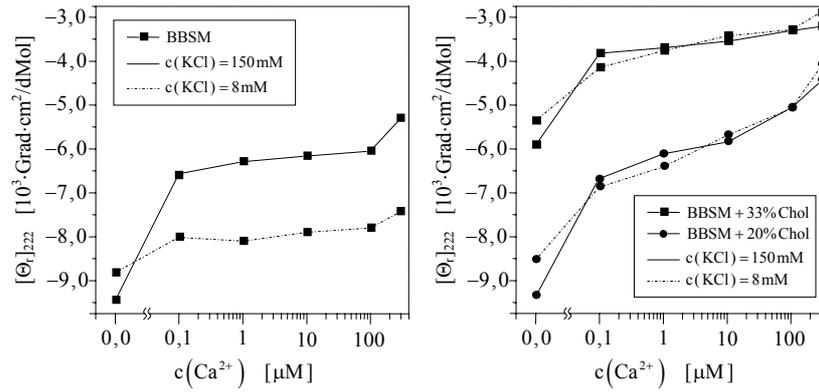
Um den durch die vorhandene Ionenstärke bedingten Abschirmeffekt und die damit verbundene Verringerung des Einflusses der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Synuclein-Faltung abschätzen zu können, wurden die Messungen sowohl bei physiologischen Salzkonzentrationen mit  $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$  durchgeführt, als auch bei einer verringerten Ionenstärke mit  $c_{\text{KCl}} = 8\text{mM}$ . Die erhaltenen  $[\Theta_r]_{222}$ -CD-Titrationskurven sind in den Abb. 4.10 – 4.12 für  $T = 37^\circ\text{C}$  dargestellt.

Den Graphen können mehrere Aussagen entnommen werden:

- Die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0\mu\text{M}$  auf  $0,1\mu\text{M}$  ist sowohl im Falle geladener als auch neutraler Liposomen mit einer signifikanten Verringerung des Betrags von  $[\Theta_r]_{222}$  und damit mit einem Faltungsverlust von  $\alpha\text{S}$  verbunden.
- Die Änderungen innerhalb des physiologischen Bereichs von  $c(\text{Ca}^{2+})$  – also von  $0,1$ – $100\mu\text{M}$  – sind dagegen wesentlich schwächer ausgeprägt.
- In Gegenwart von Vesikeln mit BBSM-Anteil kann für  $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$  auch in Bereich von  $c(\text{Ca}^{2+}) = 0,1$ – $300\mu\text{M}$  eine weitere Verringerung des Faltungsanteils von  $\alpha\text{S}$  beobachtet werden. Für die geladenen, POPC-haltigen Vesikel im flüssig-kristallinen Zustand bleibt dagegen  $[\Theta_r]_{222}$  oberhalb von  $c(\text{Ca}^{2+}) = 0,1\mu\text{M}$  praktisch unverändert.

Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt auf eine rasche  $\text{Ca}^{2+}$ -Sättigung der negativ geladenen Vesikelloberflächen bei Zugabe bereits geringer Mengen des Ions durch die starke elektrostatische Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Lipidkopfgruppen und den zweiwertigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen zurückzuführen ist.

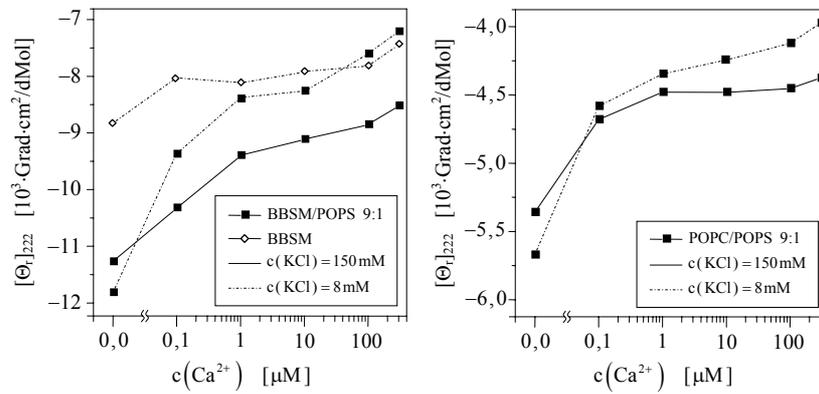
- Schließlich unterscheidet sich das Bindungsverhalten von  $\alpha\text{S}$  an PC- bzw. SM-haltige Vesikel bezüglich der vorherrschenden Ionenstärke. Werden Vesikel mit SM-Anteil zu  $\alpha\text{S}$  geben, ist der Faltungsgrad bei hohem  $c_{\text{KCl}}$  für  $c(\text{Ca}^{2+}) = 0,0\mu\text{M}$  stets größer als bei niedrigen Ionenstärken. Einzige Ausnahme bildet das BBSM/POPS-(9:1)-System. Im Gegensatz dazu ist die Faltung von  $\alpha\text{S}$  in Lösungen ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit PC-haltigen Liposomen bei niedrigen Ionenstärken größer als bei hohen; dies gilt selbst für die ungeladenen Vesikel bestehend aus POPC bzw. POPC/POPE-(1:1) (Abb. 4.12a)).



a)  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration zu BBSM-SUV mit adsorbiertem  $\alpha\text{S}$ .

b)  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration zu BBSM-SUV mit unterschiedlichem Cholesterol-Anteil und mit adsorbiertem  $\alpha\text{S}$ .

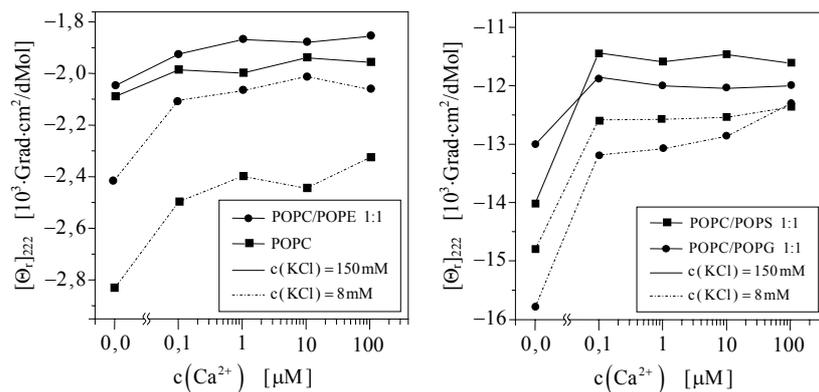
Abbildung 4.10: Molare residuale Elliptizität von  $\alpha\text{S}$  bei  $\lambda = 222\text{nm}$  in einer SUV-haltigen Lösung als Funktion von  $c(\text{Ca}^{2+})$  bei  $T = 37^\circ\text{C}$ .



a)  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration zu einer  $\alpha\text{S}$ -Lösung mit BBSM/POPS-(9:1)-SUV. Als Vergleich ist erneut die Titrationskurve für die BBSM-SUV bei 8mM KCl eingetragen.

b)  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration zu einer  $\alpha\text{S}$ -Lösung mit POPC/POPS-(9:1)-SUV.

Abbildung 4.11: Molare residuale Elliptizität von  $\alpha\text{S}$  bei  $\lambda = 222\text{nm}$  als Funktion von  $c(\text{Ca}^{2+})$  bei  $T = 37^\circ\text{C}$ . In der Lösung befindlich sind kleine Phospholipid-Schallvesikel mit  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$ .



a)  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration zu einer  $\alpha\text{S}$ -Lösung in Gegenwart ungeladener SUV.

b)  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration zu einer  $\alpha\text{S}$ -Lösung in Gegenwart geladener SUV.

Abbildung 4.12: Molare residuale Elliptizität bei  $\lambda = 222 \text{ nm}$  von  $\alpha\text{S}$  in SUVhaltigen Lösungen mit  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$  bei  $T = 37^\circ\text{C}$  als Funktion von  $c(\text{Ca}^{2+})$ .

Zur Prüfung, ob die  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe eine Ablösung des Proteins von den Vesikelmembranen induziert, wurden DLS-Messungen repräsentativ mit einem negativ geladenen und einem ungeladenen, in der geordneten Lipidphase befindlichen Vesikel-System durchgeführt. Tab. 4.3 enthält die mittleren hydrodynamischen Radien der sphärischen Anzahl-gewichteten Verteilungen. Als Kontrollen wurden ebenfalls die reinen Vesikel ohne Protein gemessen. Vor dem Befüllen der Küvetten erfolgte jeweils eine Reinigung der vesikulären Lösungen über einen  $0,22 \mu\text{m}$ -Filter. Die zuzugebende  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung wurde über einen  $0,02 \mu\text{m}$ -Filter von Schmutzpartikeln befreit.

	$R_{\text{H}}$ [nm]	
	ohne $\alpha\text{S}$	mit $\alpha\text{S}$
POPC/POPG 1:1	$14,2 \pm 0,41$	$15,7 \pm 0,25$
BBSM + 33Mol% Chol	$15,0 \pm 0,43$	$16,2 \pm 0,38$

Tabelle 4.3: Hydrodynamische Radien kleiner unilamellarer Phospholipid-Vesikel in Lösung mit bzw. ohne  $\alpha\text{S}$  in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ . Das  $\text{Ca}^{2+}$  wurde nach der Bindung von  $\alpha\text{S}$  an die Vesikel zutitriert.

Bedingungen:  $c(\text{Ca}^{2+}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $c_{\text{KCl}} = 150 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 1,0 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ ;  $c_{\alpha\text{S}} = 0,2 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{Lipid}} = 40 \text{ mM}$  (ohne Cholesterol)  $\rightarrow n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$ ;  $T = 37^\circ\text{C}$ . Bestimmung der Werte durch Mittelung über 10 Einzelmessungen.

Klar erkennbar ist auch für die  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Lösungen eine  $R_H$ -Differenz von ungefähr 1,4nm zwischen den Vesikeln im reinen Puffer und denjenigen in einer  $\alpha\text{S}$ -haltigen Lösung. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Vesikel nach wie vor reich mit angelagerten Synuclein-Molekülen umhüllt sind.

Zusammenfassend stellt Abb. 4.13 noch einmal den Faltungsgrad von  $\alpha\text{S}$  in Gegenwart kleiner Vesikel verschiedener Lipidkomposition bei hoher bzw. niedriger Salzkonzentration dar.

Einschränkend ist allerdings anzumerken, dass mittels der durchgeführten Messungen keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob eine Erhöhung von  $[\Theta_r]_{222}$  gleichbedeutend mit einem geringeren Bindungsanteil des gesamten in Lösung vorhandenen Synucleins bei gleicher Faltung pro gebundenem Protein ist, oder ob im Mittel die gleiche  $\alpha\text{S}$ -Menge bindet, jedoch mit einem durchschnittlich geringeren Helixanteil. Denkbar ist auch eine Kombination beider Möglichkeiten.

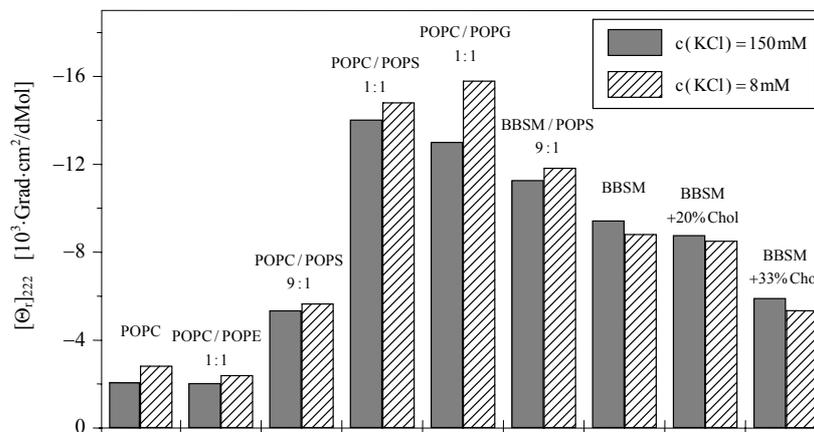


Abbildung 4.13: Molare residuale Elliptizität von  $\alpha$ -Synuclein bei  $\lambda = 222\text{nm}$  in Gegenwart von SUV verschiedener Komposition ohne Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen;  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.2 Diskussion

Bislang intensiv untersucht und mithin allgemein akzeptiert ist die Bindung von  $\alpha\text{S}$  an negativ geladene, stark gekrümmte Phospholipid-Vesikel.<sup>[130]</sup> Kaum Beachtung fand dagegen die Adsorption des Proteins an ungeladene Vesikel, da diese bisher stets nur im flüssig-kristallinen Zustand untersucht wurden, und deshalb keine Wechselwirkung zwischen  $\alpha\text{S}$  und den Membranoberflächen nachgewiesen werden

konnte. Aus diesem Grund fand die Argumentation breite Zustimmung, dass die Protein-Lipid-Wechselwirkung nahezu ausschließlich elektrostatischer Natur zwischen den positiv geladenen Aminosäureresten des  $\alpha$ S und der negativen Nettoladung der Phospholipid-Vesikel sei.<sup>[130]</sup>

In den hier durchgeführten Experimenten zur Untersuchung der Faltung von  $\alpha$ S bei Anlagerung an Vesikel, wurden kleine Liposomen verwendet, deren Vesikel mittlerer hydrodynamischer Radius mit 13–17nm ähnlich dem von synaptischen Vesikeln (SV) ist.<sup>[306]</sup> SV besitzen einen Sphingomyelin-Anteil von 8–10Mol% bezogen auf die Gesamtmenge an Phospholipid und ein hohes Cholesterol/Phospholipid-Verhältnis, das bei ca. 0,5 liegt (vgl. Tab. 1.3).<sup>[38,40]</sup> Das heißt, auch in SV können durchaus Lipid-Heterogenitäten und laterale Entmischungen im physiologischen Temperaturbereich auftreten.<sup>[307]</sup>

Damit einhergehend ist das Auftreten von Defektlinien zwischen Regionen flüssig-kristalliner Phasenstruktur und SM/Chol-reichen Domänen, die sich in einem  $L_O$ -Zustand befinden.<sup>[308]</sup> Darüber hinaus können durch den hohen Krümmungsgrad der Membranen in SV und dem dadurch verursachten Packungsstress,<sup>[303]</sup> abhängig von der Größe dieser Domänen, deren Durchmesser bis zu einige Mikrometer betragen kann,<sup>[51-53]</sup> auch Störstellen innerhalb von Membranbereichen geordneter Phasenstruktur auftreten. Schematisch ist dieser Fall in Abb. 4.14 dargestellt.

#### Bindungsgrad

Nach [130,134,158] herrscht intrazellulär, ebenso wie *in vitro* stets ein Gleichgewicht zwischen gebundenem helikalem und freiem ungefaltetem  $\alpha$ S. Gleichzeitig geht aus NMR-Studien hervor, dass  $65 \pm 1\%$  der  $\alpha$ S-Sequenz bei Bindung an SUV in eine helikale Konformation übergehen.<sup>[133,134]</sup> Für die weitere Überlegung wird angenommen, dass jedes gebundene  $\alpha$ S diesen Faltungsgrad aufweist unabhängig vom Lipid/Protein-Verhältnis  $n_{Lip/\alpha S}$ .

Der Bindungsgrad  $n_b$ , d.h. der Bruchteil der gebundenen bezogen auf alle in der Lösung vorhandenen Proteine, lässt sich aus

$$X_{hel} = n_b \xi_{hel} + (1 - n_b) \zeta_{hel} . \quad (4.1)$$

berechnen, sofern die Gesamthelikalität  $X_{hel}$  einer Probe, der Faltungsgrad  $\xi_{hel}$  eines gebundenen und der Helixanteil  $\zeta_{hel}$  eines ungebundenen Proteins bekannt sind. Die Bestimmungsgleichung für  $n_b$  lautet

$$n_b = \frac{X_{hel} - \zeta_{hel}}{\xi_{hel} - \zeta_{hel}} . \quad (4.2)$$

Der Bindungsgrad ist somit linear von der messbaren Helixfaltung  $X_{hel}$  abhängig.

Nach Abb. 4.3 ist für  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} \geq 200$  der maximale Bindungsgrad  $n_{\text{b,max}}$  bei der CD-Titration mit POPG-SUV erreicht. Gleichzeitig nähert sich bei einem Großteil der untersuchten SUV-Systeme die molare residuale Elliptizität für  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} \rightarrow \infty$  asymptotisch etwa  $[\Theta_r]_{222,\text{min}} \approx (-17,0 - -18,0) \cdot 10^3 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2/\text{dMol}$ . Das heißt, wenn in einer  $\alpha\text{S}$ -SUV-Lösung der Bindungsgrad maximal ist ( $n_{\text{b}} = n_{\text{b,max}}$ ) gilt:  $[\Theta_r]_{222} = [\Theta_r]_{222,\text{min}}$ . Mittels der in Kap. 4.1.3 (Tab. 4.5) dargelegten Relation zwischen  $X_{\text{hel}}$  und  $[\Theta_r]_{222}$  lässt sich  $X_{\text{hel,max}}$  zu 53–58% berechnen. Mit einem angenommenen, zeitlich wie sequentiell gemittelten  $\zeta_{\text{hel}}$  von 3% (s. Abb. 4.20) erhält man für den maximalen Bindungsgrad:  $n_{\text{b}} = 82\text{--}89\%$ .

#### *Defektzonen-Heilung*

Die durch die Anlagerung des  $\alpha\text{S}$  an SUV, bestehend aus zwitterionischen Phospholipiden im geordneten Zustand, freigesetzte Enthalpie ist trotz der fehlenden elektrostatischen Wechselwirkung wesentlich höher als bei Bindung des Proteins an kleine geladene, im  $L_{\alpha}$ -Zustand befindliche Phospholipid-Vesikel.<sup>[137]</sup> Die Ursache hierfür wird auf eine Defektheilung der gestörten Membranstruktur bei Bindung des Proteins an die Vesikeloberfläche zurückgeführt, die den Packungsstress in den Vesikeln verringert.<sup>[137]</sup> Die dabei freigesetzte Wärme kann als Gefrierenthalpie der Lipide für den Übergang von der flüssigen, ungeordneten in eine geordnete Phase angesehen werden. Zusätzlich ist ein teilweises Eintauchen apolarer Aminosäurereste in die Phospholipidmembran denkbar wodurch das Ausheilen der Störstellen, wie in Abb. 4.14c) illustriert, unterstützt werden könnte. Die in Kap. 4.1.3 dargelegten Resultate bzgl. der Restbindung von  $\alpha\text{S}$  an ungeladene Vesikel nach einem Erhitzen der Lösung über  $T_{\text{m}}$  der Vesikel-Lipidkomponenten hinaus, stärken diese Annahme.

Im Hinblick auf die Bindung des  $\alpha\text{S}$  an Grenzregionen zwischen koexistierenden flüssig-kristallinen und geordneten Membranbereichen ist auch eine Richtungs-spezifische Bindung des  $\alpha\text{S}$  entlang der Grenzlinie denkbar (s. Abb. 4.15). Die positiv geladenen Seitenketten sind dabei hin zu den fluiden, zum Teil negativ geladenen Membranregionen ausgerichtet. Die unmittelbar benachbarten apolaren Aminosäurereste können durch partielles Eintauchen in die Vesikelmembran die Ausrichtung der im Defektlinienbereich lokalisierten Lipide unterstützen. Das Protein besäße im Fall der von Bussell und Eliezer<sup>[134]</sup> vorgeschlagenen  $3_{11}$ -Helix eine perfekt dafür adaptierte amphipathische Struktur (s. Abb. 4.15).

#### *Bindungs- bzw. Faltungsspezifität von $\alpha\text{S}$*

Es wurden bereits bei mehreren biologischen Prozessen spezifische Wechselwirkungen von Proteinen mit Sphingolipid- & Cholesterol-reichen Membranregionen gefunden.<sup>[56-58]</sup> SM/Chol-reiche Domänen mit einer  $L_{\text{O}}$ -Phasenstruktur sind damit prinzipiell auch relevante Wechselwirkungspartner für das  $\alpha\text{S}$ , womit sich die Frage stellt, ob zwischen dem Protein und solchen Domänen ebenfalls eine spezifische Wechselwirkung existiert.

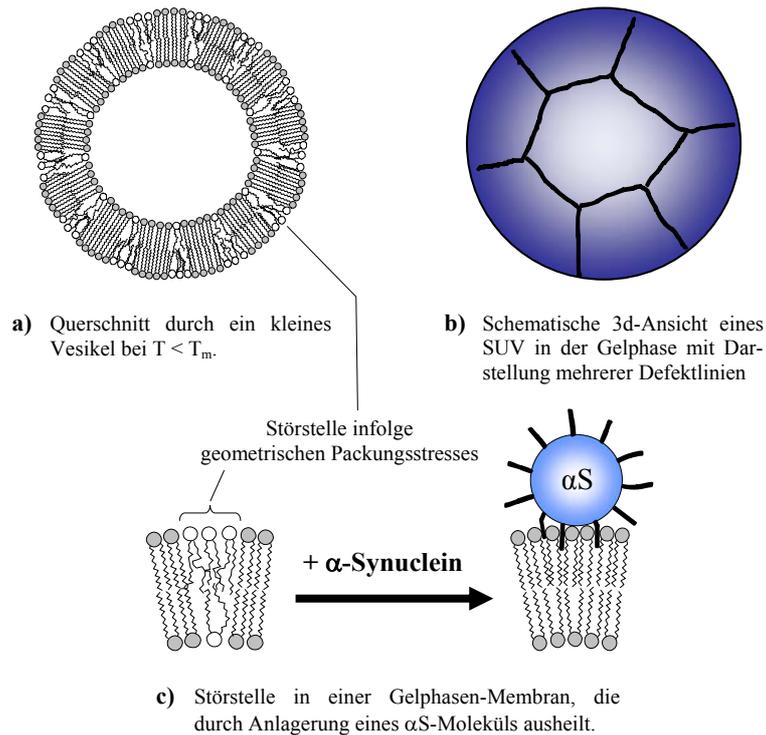


Abbildung 4.14: Modell kleiner Vesikel im geordneten Zustand mit Illustration der Wirkungsweise des  $\alpha$ -Synucleins bei Adsorption an die Membranoberfläche.

Aus den durchgeführten CD-Experimenten geht hervor, dass es offenbar keine solche SM-Spezifität bzgl. der Helixbildung des  $\alpha$ S gibt. Die Titrationsexperimente zeigen eine nahezu perfekte Übereinstimmung des  $[\Theta_r]_{222}$ -Verlaufs bei SM- und DPPC-Vesikeln unterhalb von  $T_m$ . Vielmehr scheint die zweite Spezifität des  $\alpha$ S, neben der ladungsabhängigen Membranwechselwirkung, die Phasenstruktur der Bilayer zu betreffen.

Einer der hierfür sprechenden Punkte ist die Erniedrigung des Bindungsgrades (bzw. des Faltungsgrades) von  $\alpha$ S in Gegenwart von DPPC-SUV mit steigender Temperatur. Die Sensitivität der Proteinfaltung bzgl. des Ordnungsgrades in den Vesikelmembranen, zeigt sich z.B. in der sprunghaften Verringerung von  $[\Theta_r]_{222}$  am Vorübergang bei  $T_{pre}$  (vgl. Abb. 4.5), der für vesikuläre DPPC-Membranen bei 28°C liegt.<sup>[309]</sup> Sie offenbart sich ferner in den CD-Titrationsen mit binären den POPC/SM-

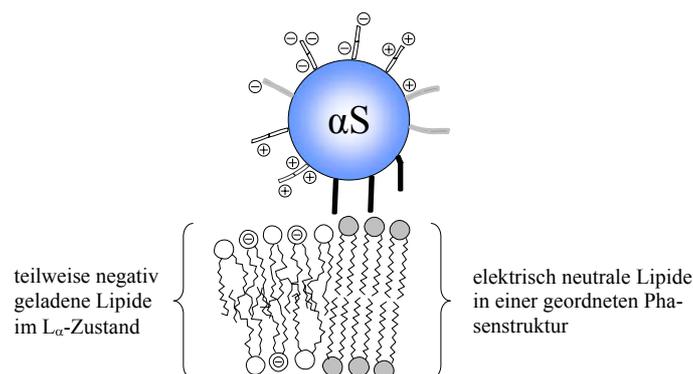


Abbildung 4.15: Mögliche Positionen der Aminosäurereste des  $\alpha S$  bzgl. der Grenzlinie zwischen zwei koexistierenden Phasen. Die Projektionen der Seitenketten-Positionen des  $\alpha S$  bzgl. der Helixachse entsprechen exakt der Lage in einer  $3_{11}$ -Helix.<sup>[134]</sup> Projektionen, bei denen sämtliche Seitenketten elektrisch neutral sind, wurden grau dargestellt; schwarze enthalten viele hydrophobe Seitenketten. Bei Projektionen mit einer dargestellten Ladung ist genau eine der 8–9 Seitenketten geladen, zwei Ladungen stehen für 2–3 und drei für 4–5 geladene Seitenketten.

bzw. ternären POPC/SM/Chol-Mischungen. Je höher der Anteil an Lipiden ist, welche eine ordnende Wirkung auf die Phasenstruktur der Membran besitzen, desto stärker ist die Faltung und damit auch die Bindung<sup>[137]</sup> des Proteins an die Vesikel.

Cholesterol reduziert die Unterschiede zwischen Gel- und  $L_\alpha$ -Phase durch Erhöhung der Flexibilität ersterer und Verfestigung der letzteren.<sup>[48]</sup> Die ausgleichende Wirkung des Sterols bzgl. der Membranfluidität zeigt sich auch bei den hier durchgeführten Experimenten: je höher der Anteil der Gelphasen-Lipidkonstituenten in den Vesikelmembranen ist, desto weniger vermag Cholesterol die Faltung des Proteins zu begünstigen (s. z.B. Abb. 4.8). In Übereinstimmung damit ist bei dem binären System BBSM + 20Mol% Chol gegenüber reinen BBSM-Vesikeln praktisch keine Änderung von  $[\Theta_r]_{222}$  beobachtbar.

#### *Intrazelluläre Funktion des $\alpha S$*

Hinsichtlich der Frage, warum synaptische Vesikel in Zellen wahrscheinlich von  $\alpha S$ -Molekülen umhüllt sind,<sup>[310-312]</sup> liefert das beobachtete Fusionsverhalten von Vesikeln in der Gelphase möglicherweise einen entscheidenden Hinweis. Für die Gewährleistung bzw. Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des Signaltransduktions-Apparates müssen u.a. die synaptischen Vesikel auch während ihres Aufenthalts im Reservepool, wo sie vor dem Andocken an die aktiven Zonen gespeichert werden

(vgl. Kap. 1.3.2),<sup>[104]</sup> intakt bleiben. Da synaptische Vesikel einen kleinen Radius besitzen,<sup>[306]</sup> besteht die Tendenz den infolge des hohen Krümmungsgrades verursachten lateralen Packungsstress in der inneren und äußeren Membranschicht in Regionen geordneter Phasenstruktur<sup>[303]</sup> durch Fusion mit anderen Liposomen zu vermindern.<sup>[302]</sup> In diesem Fall würde nicht nur die Funktionstüchtigkeit der synaptischen Vesikel verloren gehen, sondern es bestünde dabei möglicherweise auch die Gefahr der Freisetzung von Neurotransmittern in das intrazelluläre Medium, von denen etwa das Dopamin für Neuronen toxisch ist.

Wie sich gezeigt hat, verhindert die Anlagerung von  $\alpha$ S an Gelphasenvesikel deren Fusion und konserviert damit die geometrische Struktur dieser Partikel über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen. Es ist anzunehmen, dass dies mit einer Folge der weiter oben erwähnten Defektheilung ist. Gleichzeitig könnte der tentakelartig in die Flüssigkeitshülle des Vesikels hineinragende C-Terminus (s. Abb. 4.16) einen zusätzlichen mechanischen Schutz vor einer zu starken gegenseitigen Annäherung von Vesikeln bieten. Die Neigung an negativ geladene Membranoberflächen zu binden dient vermutlich einer besseren Vesikelerkennung, wodurch sich die Anlagerungswahrscheinlichkeit erhöht.

Den CD-Messungen bei Variation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb des physiologisch relevanten Konzentrationsbereichs –  $c(\text{Ca}^{2+}) \approx 0,1\text{--}100\mu\text{M}$ <sup>[100 S. 177 & S. 279]</sup> – kann entnommen werden, dass der zu Beginn der Exocytose stattfindende  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom praktisch keinen Einfluss auf die Faltung des Proteins hat. Und die in diesem Zusammenhang durchgeführten DLS-Experimente zeigen ebenso eine nach wie vor ausgeprägte Umhüllung der Vesikel mit  $\alpha$ S bei erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

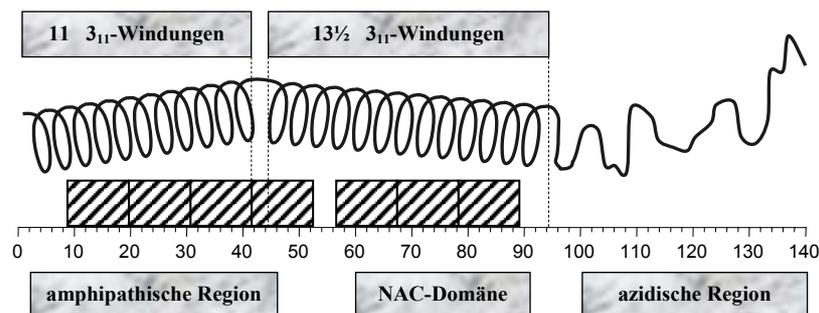


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung der Struktur des  $\alpha$ -Synucleins bei Bindung an kleine Phospholipidvesikel mit Angabe der Positionen der sieben 11mer-Wiederholungen (gestreift ausgefüllte Quadrate). Durch den von Aminosäure 42–44 vorhandenen Knick<sup>[133]</sup> wird die Proteinstruktur der Membrankrümmung synaptischer Vesikel angepasst. (Ausdehnung der 1. Helix: Aminosäure 1–41 und der 2. Helix: Aminosäure 45–94)

### 4.1.3 Protein-Lipid-Interdigitierung

#### Residuale Helixstruktur

Gibt man DMPC-SUV zu einer  $\alpha$ S-Lösung und plottet  $[\Theta_r]_{222}$  während eines Temperatur-Zyklus, bestehend aus einer Heizphase von 10°C auf 70°C und nachfolgendem Abkühlen zurück auf 10°C, erhält man den in Abb. 4.17 dargestellten bemerkenswerten Verlauf von  $[\Theta_r]_{222}$ .

Klar erkennbar ist ein sprunghafter Verlust an Helikalität in der Nähe des thermotropen Phasenübergangs zur  $L_\alpha$ -Phase bei ca. 20°C. Überraschenderweise bleibt jedoch eine deutliche Restfaltung bestehen, welche erst oberhalb von 38°C zu zerfallen beginnt. Der Temperaturbereich  $\Delta T_d$  (s. Abb. 4.19) des zweiten Anstiegs von  $[\Theta_r]_{222}$ , innerhalb dessen sich das Protein komplett entfaltet, ist mit 38–54°C ungefähr doppelt so breit wie  $\Delta T_m$ , die Breite des Hauptphasenübergangs in den  $L_\alpha$ -Zustand, der sich von ca. 16°C bis 24°C erstreckt.

Beim Abkühlen der Lösung bleibt das Protein bis in den Bereich von  $T_m$  vollständig entfaltet und bildet erst unterhalb von 20°C, d.h. unterhalb von  $T_m$ , wieder eine partielle Helix aus. Die perfekte Reproduzierbarkeit der Hystereseschleife bei Wiederholung des Temperatur-Zyklus (vgl. 1. & 2. Temperatur-upscan in Abb. 4.17) schließt die Möglichkeit aus, dass es sich hierbei um irreversible Schädigungen des Proteins durch Überhitzung handeln könnte. Vor dem 2. Temperatur-upscan wurde

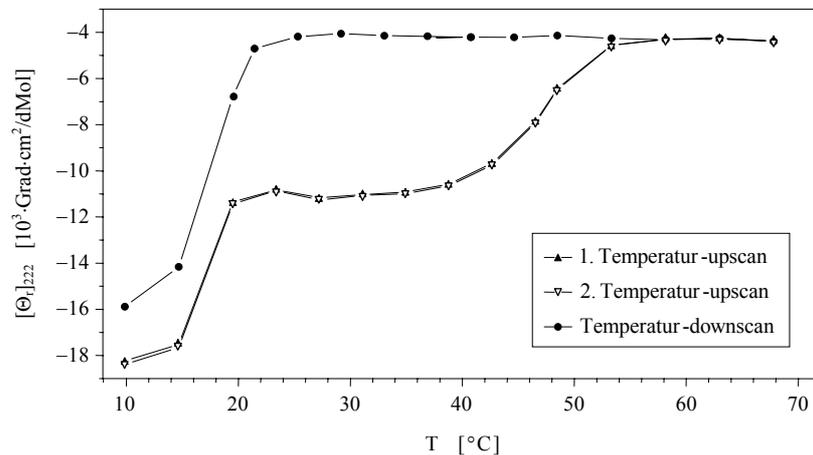


Abbildung 4.17: Temperaturabhängige Hysteresekurve der molaren residualen Elliptizität bei  $\lambda = 222\text{nm}$  von  $\alpha$ S in Gegenwart von DMPC-SUV.

Bedingungen:  $c_{\alpha S} = 6,23\mu\text{M}$ ,  $n_{Lip/\alpha S} = 400$ ;  $c_{KCl} = 18\text{mM}$ ,  $c_{Phosphat} = 5,0\text{mM}$  und  $\text{pH} = 7,2$ .

die Lösung zur thermischen Äquilibration nach dem Temperatur-downscan etwa 1h bei 10°C gehalten. Die in dieser Zeit von  $-16$  auf  $-18,5 \cdot 10^3 \text{ Grad-cm}^2/\text{dMol}$  stattfindende weitere  $[\Theta_r]_{222}$ -Senkung tritt vermutlich infolge einer retardierten Faltung auf.

Abb. 4.18 zeigt mehrere CD-Spektren von  $\alpha$ S + DMPC-SUV, die bei unterschiedlichen Temperaturen während des Erhitzens gemessen wurden. Im unteren Temperaturbereich besitzen die Spektren den für eine ausgeprägte Helixfaltung klassischen Verlauf, während bei hohen Temperaturen typische *random coil*-Spektren gemessen werden. Durch das Auftreten eines sehr scharfen isobestischen Punktes, der sich bei  $202,4 \pm 0,2 \text{ nm}$  befindet, enthüllen die Spektren ferner, dass tatsächlich ein reiner Helix-coil-Übergang stattfindet und das Protein keine anderen Sekundärstrukturen, wie etwa  $\beta$ -Faltblatt, während der Messungen in nennenswertem Maße aufweist.

Um eine detailliertere Analyse der Proteinfaltung durchführen zu können, wurde der Temperatur-Zyklus bei zwei verschiedenen  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}}$ -Werten gemessen. Zusätzlich erfolgte wiederum eine Variation der Ionenstärke. Abb. 4.19 zeigt einige der so erhaltenen unterschiedlichen  $[\Theta_r]_{222}$ -Graphen.

Bei beiden  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}}$ -Verhältnissen unterscheiden sich – ähnlich den neutralen BBSM-haltigen Gelphasenvesikel (Abb. 4.10) – unterhalb von  $T_m$  die Faltungsgrade in Gegenwart eines hohen bzw. niedrigen Ionenhintergrunds kaum voneinander. Für Temperaturen über  $T_m$ , d.h. zwischen 25°C und 40°C, gilt dies allerdings nur noch für

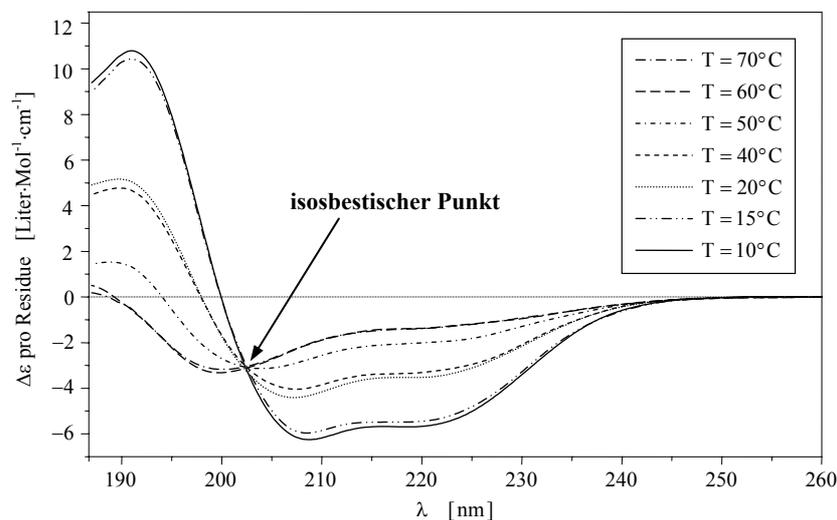


Abbildung 4.18: CD-Spektren von  $\alpha$ S in einer DMPC-SUV-haltigen Lösung mit  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$  während des Erhitzens der Probe.

Bedingungen:  $c_{\alpha\text{S}} = 6,23 \mu\text{M}$ ;  $c_{\text{KCl}} = 18 \text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 1,0 \text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ .

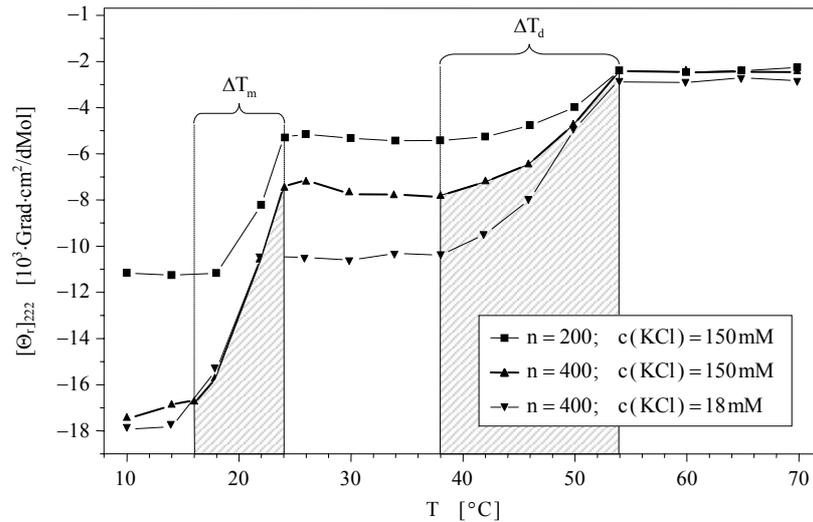


Abbildung 4.19: Molare residuale Elliptizität, gemessen bei  $\lambda = 222\text{nm}$  für  $\alpha\text{S}$  mit DMPC-SUV bei unterschiedlicher Ionenstärke und  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$  bzw. 400. Puffer:  $c_{\text{KCl}}$  variable,  $c_{\text{Phosphat}} = 1,0\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ .

$n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$  (Ergebnisse nur für  $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$  in Abb. 4.19 gezeigt). Bei einem Verhältnis von  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 400$  ist dagegen die residuale Helikalität, für  $T_m < T < T_d$  in Gegenwart einer großen Ionenstärke merklich geringer als bei einer niedrigen. Für hohe Temperaturen ( $T > 50^\circ\text{C}$ ) erreichen alle Graphen erwartungsgemäß den gleichen Plateauwert mit  $[\Theta_r]_{222} \approx -2,3 \cdot 10^3 \text{Grad} \cdot \text{cm}^2/\text{dMol}$ .

Abbildung 4.20 fasst die in sämtlichen Messungen erhaltenen Beträge der residualen  $[\Theta_r]_{222}$ -Werte für den Temperaturbereich unterhalb von  $T_m$ , für den im physiologisch relevanten Bereich und für  $T > 54^\circ\text{C}$  zusammen. Die sich daraus ergebenden Quotienten von  $[\Theta_r]_{222}$  der beiden Temperaturbereiche  $T < T_m$  und  $T_m < T < T_d$  sowie das Verhältnis  $[\Theta_r]_{222}(n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 400)/[\Theta_r]_{222}(n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200)$  bei  $T = \text{konst.}$  und unveränderter Ionenstärke sind in Tab. 4.4 enthalten (für deren Analyse s. Kap. 4.1.4).

Im Hinblick auf die Frage, ob die zwischen  $T_m$  und  $T_d$  zu beobachtende residuale Helikalität einer schwachen Bindung des  $\alpha\text{S}$  an die kleinen DMPC-Vesikel entspringt, oder aber ob sich das Protein vollständig ablöst und dabei eine Restfaltung beibehält, wurden zu den CD-Experimenten analoge DLS-Messungen während einer Heizperiode von  $12^\circ\text{C}$  auf  $55^\circ\text{C}$  und einem nachfolgenden Abkühlen zurück auf  $12^\circ\text{C}$  durchgeführt. In Abb. 4.21 sind die erhaltenen mittleren hydrodynamischen Radien für beide Temperaturarrays dargestellt.

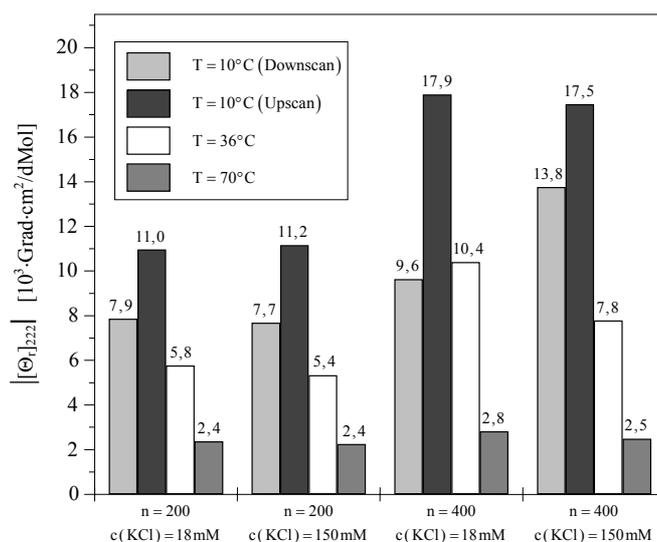


Abbildung 4.20: Molare residuale Elliptizität bei  $\lambda = 200\text{nm}$  für  $\alpha\text{S}$  in Gegenwart von DMPC-SUV für die drei Plateaubereiche in Abb. 4.22 bei zwei verschiedenen Ionenstärken. Puffer:  $c_{\text{Phosphat}} = 1,0\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ .

$c_{\text{KCl}}$	18mM	150mM
$T_{12}/T_{30}(n_{200})$	1,97	2,09
$T_{12}/T_{30}(n_{400})$	1,72	2,18
$n_{400}/n_{200}(T_{12})$	1,57	1,50
$n_{400}/n_{200}(T_{30})$	1,79	1,44

Tabelle 4.4: Verschiedene Verhältnisse der residualen  $[\Theta]_{222}$ -Werte aus Abb. 4.20 für  $\alpha\text{S}$  in Gegenwart von DMPC-SUV.

Ein Vergleich der in Tab. 4.2 zusammengefassten  $R_{\text{H}}$ -Werte für die reinen DMPC-Vesikel bei verschiedenen Temperaturen zeigt, dass im Lauf der Temperaturerhöhung erst ab  $T = 50^\circ\text{C}$  mit  $R_{\text{H}} = 11,6\text{nm}$  etwa der Radius gemessen wird, den die DMPC-SUV ohne adsorbiertes  $\alpha\text{S}$  besitzen. Weiterhin ist die Rückbindung von  $\alpha\text{S}$  an die Vesikel im Bereich von  $T_{\text{m}}$  bei ca.  $20^\circ\text{C}$  durch eine Zunahme von  $R_{\text{H}}$  um ungefähr  $1,3\text{nm}$  erkennbar. Die während der Heizperiode auftretende kontinuierliche RADIUSERHÖHUNG oberhalb von  $T = 20^\circ\text{C}$  bis hin zu  $T = 40^\circ\text{C}$  erscheint zunächst überraschend. Diese großen Radien sind jedoch ein eindeutiges Indiz für die auch ober-

halb von  $T_m$  noch bestehende Anhaftung der Proteine an die Vesikel. Sowohl die Breite des Temperaturbereichs für die ab  $T = 40^\circ\text{C}$  einsetzende Radiussschrumpfung als auch dessen Beginn stimmen mit dem Zerfallsbereich  $\Delta T_d$  der residualen Helizität, die bei den CD-Messungen beobachtet wurde (Abb. 4.19), überein.

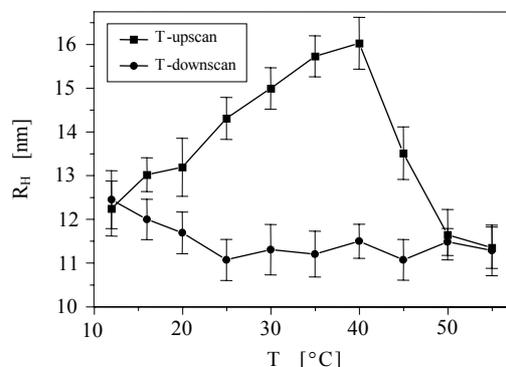


Abbildung 4.21:  $R_H$  von DMPC-SUV in Gegenwart von  $\alpha\text{S}$  mit  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 400$  während des Erhitzens und anschließenden Abkühlens der Lösung.

*Messbedingungen:*  $c_{\text{DMPC}} = 5,0\text{mM}$ ;  $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 14,5\text{mM}$  und  $\text{pH} = 7,2$ . Angabe der  $R_H$ -Werte sowie der Standardabweichungen durch Mittelung über 6 einstündige Einzelmessungen.

Zu Vergleichszwecken wurde schließlich auch  $[\Theta_r]_{222}$  einer  $\alpha\text{S}$ -Lösung in Gegenwart von DLPC-SUV<sup>37)</sup> während des Durchfahrens eines Temperaturzyklus gemessen. Wie aus Abb. 4.22 hervorgeht, erhält man auch in diesem Fall eine Hysteresekurve, in der sich allerdings kein Plateaubereich oberhalb von  $T_m$  abzeichnet, wie dies bei den Messungen mit den DMPC-Vesikel der Fall war. Vielmehr findet nach dem Überschreiten der Phasenübergangstemperatur, die bei  $7\text{-}10^\circ\text{C}$  liegt, ein kontinuierlicher Faltungszersfall statt.

Das bedeutet:  $\alpha$ -Synuclein bleibt an den Vesikeln haften, wenn diese aus einer geordneten in die  $L_\alpha$ -Phase wechseln. Den CD-Messungen von  $\alpha\text{S}$  mit SM-, DPPC-, DMPC- bzw. DLPC-SUV ist zu entnehmen, dass  $T_m$  dafür jedoch deutlich unterhalb von  $40^\circ\text{C}$  liegen sollte. Andernfalls kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits im Phasenübergangsbereich zur vollständigen Ablösung von den Vesikeln. Sowohl der Temperaturbereich  $\Delta T_d$  der vollständigen Entfaltung bzw. der endgültigen Proteinablösung von den SUV als auch der Verlauf von  $[\Theta_r]_{222}$  zwischen  $T_m$  und  $T_d$  sind Lipid-abhängig.

<sup>37)</sup> 1,2-Dilauroyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin

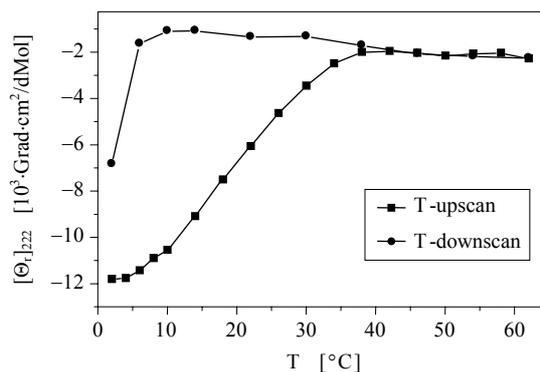


Abbildung 4.22: Hysterese der molaren residualen Elliptizität  $[\Theta_r]_{222}$  beim Erhitzen und nachfolgenden Abkühlen einer  $\alpha$ S-Lösung mit DLPC-SUV.

Messbedingungen:  $c_{\alpha S} = 6,23 \mu\text{M}$ ,  $n_{\text{Lip}/\alpha S} = 400$ , sowie  $c_{\text{KCl}} = 150 \text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 7,8 \text{mM}$  und  $\text{pH} = 7,2$ .

#### Zeitliche Entwicklung der Helixfaltung

Die Stabilität der Adsorption von  $\alpha$ S an Vesikel, die sich zuvor in einem geordneten Zustand befanden und danach in die  $L_{\alpha}$ -Phase überführt werden, ist nicht bekannt. Daher wurde die zeitliche Entwicklung der Helikalität des  $\alpha$ S in Gegenwart von DMPC-SUV untersucht. Wie aus Abb. 4.23 ersichtlich ist, ändert sich  $[\Theta_r]_{222}$  über einen Zeitraum von 1h praktisch nicht.

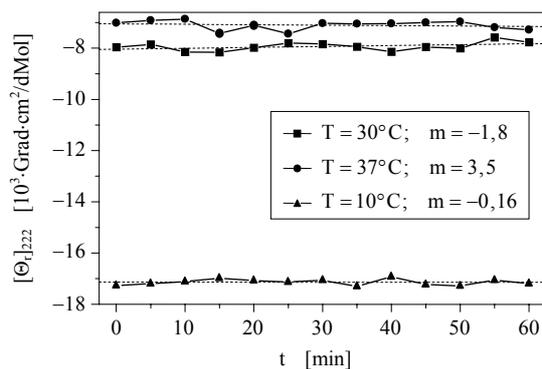


Abbildung 4.23:  $[\Theta_r]_{222}(t)$  bei 3 Temperaturen für  $\alpha$ S mit DMPC-SUV. Ferner sind die Steigungen  $m$  der linearen Fits (---) in der Legende mit angegeben.  $c_{\text{KCl}} = 150 \text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 1,0 \text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ ;  $n_{\text{Lip}/\alpha S} = 400$ .

Faltungs- bzw. Entfaltungsprozesse, die auf einer wesentlich längeren Zeitskala stattfinden und unabhängig von der Bindung an Membranoberflächen erfolgen, werden nachfolgend gegen Ende dieses Kapitels behandelt. Die mit der Anlagerung an Vesikel einhergehende Faltung dagegen muss eine mittlere Äquilibrierungsdauer besitzen, die kleiner als 1h ist. Denn der in Abb. 4.17 erkennbare Shift bei  $T = 10^\circ\text{C}$  zwischen dem Temperatur-downscan und dem 2. Temperatur-upscan ist bereits nach 1h überwunden.

*Zusammenhang zwischen dem Helixanteil  $X_{\text{hel}}$  und dem gemessenen  $[\Theta_r]_{222}$*

Die teilweise geringen Salzkonzentrationen in den Proteinlösungen erlaubten eine zuverlässige Messung der CD-Spektren bis unterhalb von 200nm; für  $c_{\text{KCl}} = 18\text{mM}$ ,  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$  sogar bis 185nm. Somit konnten die Spektren mit Hilfe der 3 Fitalgorithmen (CDSSTR, SELCON3 und CONTINLL) von CDPPro<sup>[240,241]</sup> (s. Kap. 2.2.7) einer Sekundärstruktur-Analyse zugeführt werden. Als Protein-Basissatz fand der Basissatz 7 von CDPPro Verwendung (vgl. Tab. 2.4). Alle drei Algorithmen lieferten übereinstimmende Resultate für die berechneten Strukturanteile. Da CDSSTR als die verlässlichste Methode angesehen wird,<sup>[241]</sup> werden im weiteren nur mehr die damit bestimmten Sekundärstrukturanteile angegeben.

Abhängig von der vorhandenen Salzkonzentration und der Lipidmenge lag die untere Grenze des auswertbaren Wellenlängenbereichs  $\Delta\lambda$  der CD-Spektren zwischen 190nm und 199nm. Um die Verlässlichkeit der Berechnungen zu testen, die unter Verwendung der kürzeren  $\Delta\lambda$ -Bereiche durchgeführt wurden, erfolgte mittels der für  $c_{\text{KCl}} = 18\text{mM}$  und  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$  gemessenen CD-Spektren ein Vergleich der Helixwerte  $X_{\text{hel}}$  für  $\Delta\lambda = 240\text{--}190\text{nm}$  bzw.  $240\text{--}199\text{nm}$ . Die berechneten helikalen Faltungsanteile unterschieden sich jeweils um maximal 0,5% voneinander. In Abbildung 4.24 sind die erhaltenen prozentualen  $X_{\text{hel}}$  von  $\alpha\text{S}$  für die drei Temperaturbereiche ( $T < T_m$ ,  $T_m < T < T_d$ ,  $T_d < T$ ) als Balkendiagramm dargestellt.

Da bei  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 200$  ein größerer Teil der Proteinmenge ungebunden in Lösung vorliegt, kann aus dem errechneten  $X_{\text{hel}}$  nicht geschlussfolgert werden, dass für dieses  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}}$ -Verhältnis die Faltung eines Membran-gebundenen  $\alpha\text{S}$ -Moleküls geringer sei als bei  $n_{\text{Lip}/\alpha\text{S}} = 400$ . Die für  $T \geq 54^\circ\text{C}$  bestimmte 3%-ige Helixfaltung ist auf eine statistisch auftretende kurzzeitige partiell helikale Proteinstruktur zurückzuführen, wie sie mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit während der Diffusionsbewegung eines strukturlosen Knäuels in Lösung entsteht.

Die über einen großen Bereich von  $[\Theta_r]_{222}$  berechneten Helixanteile der Sekundärstruktur von  $\alpha\text{S}$  erlauben einen Fit der Funktion  $X_{\text{hel}}([\Theta_r]_{222})$ , mittels derer beispielsweise auch die helikale Faltung von  $\alpha\text{S}$  in Gegenwart anderer Vesikel bestimmt werden kann. Dies ist insbesondere von Nutzen, wenn eine erhöhte Salzkonzentration den auswertbaren Spektrenbereich beispielsweise auf  $\lambda > 210\text{nm}$  beschränkt.

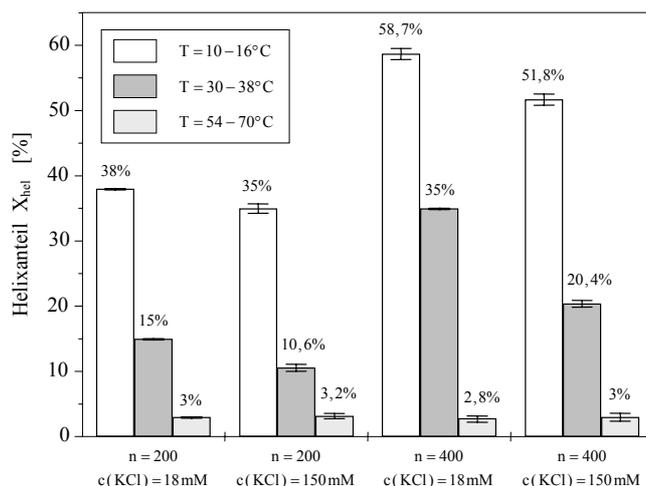


Abbildung 4.24: Mittels CDSSTR (s. Kap. 2.2.7) errechnete prozentuale Helixanteile der Sekundärstruktur von  $\alpha$ S in Gegenwart von DMPC-SUV für verschiedene Temperaturbereiche (vgl. Abb. 4.19). Die Fehlerbalken kennzeichnen die Schwankungen der Helixwerte innerhalb der einzelnen Temperaturplateaus um den Mittelwert.

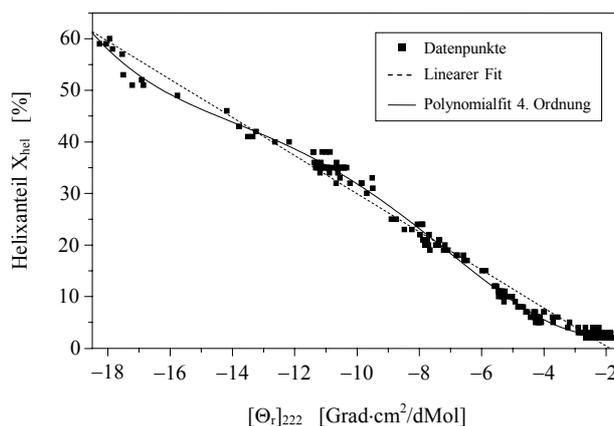


Abbildung 4.25: Berechnete Helixfaltung pro  $\alpha$ S-Molekül in Abhängigkeit von dem gemessenen  $[\Theta_r]_{222}$ , sowie Darstellung der gefitteten  $X_{hel}([\Theta_r]_{222})$ -Graphen.  $X_{hel}$  ist jeweils der über die gebundene und ungebundene Proteinmenge gemittelte Faltungsanteil.

Die aus sämtlichen Temperatur-Scans von  $\alpha$ S mit DMPC-SUV zur Verfügung stehende Datenmenge beläuft sich auf 164 Punkte (Abb. 4.25). In Abb. 4.25 ist erkennbar, dass in erster Näherung ein linearer Zusammenhang zwischen  $X_{\text{hel}}$  und dem gemessenen  $[\Theta_r]_{222}$  existiert. Da allerdings die Streuung der Datenpunkte pro  $[\Theta_r]_{222}$ -Wert klein ist, erscheint ein Polynomialfit gerechtfertigt, der den Nicht-Linearitäten der  $X_{\text{hel}}([\Theta_r]_{222})$ -Verteilung Rechnung trägt. Tab. 4.5 enthält die Parameterwerte sowie deren Unsicherheiten für den linearen Fit und den Polynomialfit 4. Ordnung. Bei Polynomialfits höherer Ordnung sind die Unsicherheiten der höheren Glieder größer als deren kalkulierte Werte.

Lineare Regression		Polynomiale Regression 4. Ordnung	
$y = a + b \cdot x$		$y = a + b \cdot x + c \cdot x^2 + d \cdot x^3 + e \cdot x^4$	
a	$(-6,966 \pm 0,2690) \cdot 10^{-2}$	a	$(1,057 \pm 0,0882) \cdot 10^{-1}$
b	$(-3,695 \pm 0,0348) \cdot 10^{-5}$	b	$(7,554 \pm 0,5882) \cdot 10^{-5}$
		c	$(2,123 \pm 0,1230) \cdot 10^{-8}$
		d	$(1,516 \pm 0,0993) \cdot 10^{-12}$
		e	$(3,617 \pm 0,2671) \cdot 10^{-17}$
$\sigma$	0,02067	$\sigma$	0,01063

Tabelle 4.5: Erhaltene Parameterwerte nebst deren Unsicherheiten für den linearen und den Polynomialfit 4. Ordnung der Funktion  $X_{\text{hel}}([\Theta_r]_{222})$ . Ferner sind die Standardabweichungen  $\sigma$  zwischen den Datenpunkten  $X_{\text{hel}}([\Theta_r]_{222})$  und den gefitteten Funktionsverläufen angegeben.

#### 4.1.4 Diskussion

Reine DMPC-SUV ohne  $\alpha$ S zeigen oberhalb von  $T_m$  bei 20–46°C keine Temperaturabhängigkeit ihres Radius. Aus diesem Grund muss die Zunahme von  $R_H$  in Lösungen mit  $\alpha$ S (Abb. 4.21) in diesem Temperaturbereich auf eine Umfaltung des Proteins zurückgeführt werden.

Den in Abb. 4.20 enthaltenen  $[\Theta_r]_{222}$ -Werten für die verschiedenen Temperaturbereiche (unterhalb wie oberhalb von  $T_m$  bzw.  $T_d$  – vgl. Abb. 4.19) ist für sämtliche Proben eine Verringerung der Helixfaltung bei Überschreitung von  $T_m$  zu entnehmen. Somit geht die Vergrößerung von  $R_H$  für  $T_m < T < T_d$  mit einer partiellen Entfaltung der Helixstruktur und einer damit verbundenen Verlängerung des bereits in die Flüssigkeitshülle des Vesikels hineintauchenden C-terminalen Proteinschwanzes einher. Unklar ist allerdings, ob sich ein Teil der zuvor gebundenen Proteine während des

Überschreitens von  $T_m$  ablöst und ob der Grad der Entfaltung vom Bindungsgrad  $n_b$  oder vom Lipid/Protein-Verhältnis  $n_{Lip/\alpha S}$  abhängt.

Zudem könnte die beobachtete molare residuale Restelliptizität bei den Temperaturabhängigen Untersuchungen der Faltung von  $\alpha S$  mit DLPC- bzw. DMPC-SUV auch auf ein, zumindest teilweises, Ablösen des  $\alpha S$  von der Vesikeloberfläche unter Beibehaltung einer Restfaltung hindeuten. Dagegen spricht allerdings die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit von  $[\Theta_r]_{222}$  für Lösungen mit DLPC- bzw. DMPC-SUV, weshalb sehr wahrscheinlich ein sich ablösendes Protein von der Vesikelmembran nahezu vollständig entfaltet in Lösung geht.

Bei den DMPC-Systemen mit  $n_{Lip/\alpha S} = 200$  zeigt sich gegenüber denjenigen mit  $n_{Lip/\alpha S} = 400$  für den intermediären  $[\Theta_r]_{222}$ -Plateaubereich eine auf  $[\Theta_r]_{222}(T = 12^\circ C)$  bezogene stärkere relative Verringerung der Gesamtfaltung beim Übergang in die  $L_\alpha$ -Phase. Das heißt, jedes unterhalb von  $T_m$  gebundene  $\alpha S$  erfährt bei  $n_{Lip/\alpha S} = 200$  einen größeren Helixverlust als bei  $n_{Lip/\alpha S} = 400$ , wenn  $T$  über  $T_m$  steigt.

Testberechnungen der Ablösungsrate sowie der helikalen Verlustrate unter Verwendung von Gl. (4.1), die hierzu um einen Term zur Erfassung der Ablösungsrate erweitert wurde, legen den Schluss nahe, dass  $\xi_{hel}$ , der Faltungsgrad eines Membran-gebundenen Proteins, eine Funktion von  $n_{Lip/\alpha S}$  ist. Dies würde erklären, warum bei ITC-Experimenten, bei denen einmal eine Gelphasenvesikel-Lösung zu  $\alpha S$  bzw. umgekehrt  $\alpha S$  zu Phospholipidvesikeln unterhalb von  $T_m$  titriert wurde, für letzteres eine um 25–30% höhere molare Enthalpie erhalten wurde.<sup>[137]</sup> Aus diesen beiden Befunden lässt sich folgendes Bild entwerfen:

Bei der Bindung von  $\alpha S$  an Vesikel in Gegenwart hoher Proteinkonzentrationen tritt an der Membranoberfläche eine Synuclein-Sättigung auf, was zu einer Kompetition zwischen den einzelnen  $\alpha S$ -Molekülen bzgl. der Bindung führt. Dadurch kann nicht der gesamte Sequenzteil, der unter optimalen Bedingungen an die Vesikel adsorbieren und sich falten würde, eine helikale Struktur ausbilden.

Im Zusammenhang damit ist auch auf den von Bussell und Eliezer<sup>[134,158]</sup> ebenso wie von Davidson et al.<sup>[130]</sup> in Proteolyse-Experimenten gefundenen Gleichgewichtszustand zwischen gebundenem und ungebundenem  $\alpha S$  in Gegenwart *kleiner, negativ geladener, flüssig-kristalliner Vesikel* einzugehen. In diesen Experimenten wurde für verschiedene Lipidmischungen die Zeitabhängigkeit der Spaltung von  $\alpha S$  durch Proteasen protokolliert. Bereits nach einer Stunde war bei allen Systemen über 80% der ursprünglichen Synuclein-Menge abgebaut worden. Das heißt, innerhalb dieses Zeitrahmens lösten sich mindestens  $\frac{3}{4}$  aller zu Beginn gebundenen Proteine wenigstens einmal wieder von der Vesikeloberfläche ab.

Da bei den Temperaturmessserien mit  $\alpha S$  plus DLPC- bzw. DMPC-Vesikel – wie bereits erwähnt – die ungebundenen Proteine entfaltet vorliegen, spiegelt die zeitliche Entwicklung von  $[\Theta_r]_{222}$  oberhalb von  $T_m$  die Stabilität der Restbindung von  $\alpha S$  an die Membranoberfläche wider, die sich während einer Stunde praktisch nicht ändert. Dies, zusammen mit der beobachteten Hysterese, stärkt die Hypothese, nach der

einige Seitenketten des Proteins mit geordneten Membranbereichen interdigitieren. Dadurch bleiben die Proteine offenbar stabil an die Vesikel gebunden, selbst wenn die Temperatur über  $T_m$  geht und die nicht mit dem Protein verknüpften Membranregionen in einen weitgehend ungeordneten Zustand aufschmelzen. Sind die  $\alpha$ S-Moleküle einmal von den Vesikeln abgelöst, können sie hingegen nicht wieder an die fluiden Membranen binden. Schließlich legt ein Vergleich dieses Resultats mit den Ergebnissen der oben erwähnten Proteolyse-Experimente den Schluss nahe, dass negativ geladene, flüssig-kristalline Lipide zwar die Protein-Vesikel-Erkennung sowie die Helixausbildung begünstigen, im Vergleich zu den Gelphasenvesikeln jedoch nur einen geringen Beitrag zu Bindungsstabilität liefern.

Die thermische Faltungs-Degradation, die sich bei den DMPC-SUV über einen Temperaturbereich von 16°C und bei den DLPC-SUV sogar über ca. 30°C hin erstreckt, sollte demnach mit einer schrittweisen Auffaltung der  $\alpha$ S-Helix einhergehen. Sie ist überdies ein Zeichen für die hohe Stabilität der Bindung und/oder der helikalen Proteinstruktur. Die Helixentfaltung ist somit kein kooperativer Prozess, bei dem sich beispielsweise zuerst die in der Nähe des C-Terminus befindliche Helix (s. Abb. 4.16) abrupt vollständig auflöst und sich danach oder nahezu zeitgleich auch die andere Helix entfaltet.

Die bei physiologischen Salzkonzentrationen gefundenen Helikalitäten fallen gegenüber salzarmen Lösungen stets etwas kleiner aus. Diese Tatsache lässt sich möglicherweise auf eine gewisse polare Abschirmung der Lipiddipolfelder durch Ionen zurückführen, was sich auch bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Titrationsexperimenten mit Vesikeln, die ausschließlich aus zwitterionischen Lipiden aufgebaut waren, während der ersten Titration zeigte (s. Kap. 4.1.1).

#### 4.1.5 Spontane Faltung

Die bei der Wechselwirkung von  $\alpha$ S mit DMPC- bzw. DLPC-SUV in Erscheinung getretene Restfaltung oberhalb von  $T_m$  wirft ungeachtet dessen, dass die durchgeführten DLS-Messungen eine lockere Bindung des Proteins zwischen  $T_m$  und  $T_d$  an die Vesikel enthüllten, die Frage auf, inwieweit  $\alpha$ -Synuclein imstande ist ohne Membranen als „Faltungskatalysator“ eine helikale Struktur auszubilden. Aus diesem Grund wurde die Faltung des Proteins über mehrere Tage hin beobachtet. Da Voruntersuchungen darauf hindeuteten, dass spontane Faltung bevorzugt bei niedrigen Synuclein-Konzentrationen auftritt, wurde ein Konzentrationsarray unter physiologischer Ionenstärke ( $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ ) bestehend aus fünf Proben angelegt, mit  $c_{\alpha\text{S}}(\text{Probe1}) = 17,3\mu\text{M}$ ,  $c_{\alpha\text{S}}(\text{Probe2}) = 10\mu\text{M}$ ,  $c_{\alpha\text{S}}(\text{Probe3}) = 5\mu\text{M}$ ,  $c_{\alpha\text{S}}(\text{Probe4}) = 2,5\mu\text{M}$  und  $c_{\alpha\text{S}}(\text{Probe5}) = 1,0\mu\text{M}$ . Beispielhaft sind in Abb. 4.26 die CD-Spektren dreier Proben in Abhängigkeit von der Standzeit gezeigt.

Die gesamte Beobachtungsdauer betrug 9 Tage. Erkennbar sind zwei unterschiedliche Kinetiken. Einerseits sinkt im Laufe der Zeit offensichtlich die Proteinkonzentration in den Lösungen, da die Amplituden in den Spektren kontinuierlich abnehmen.

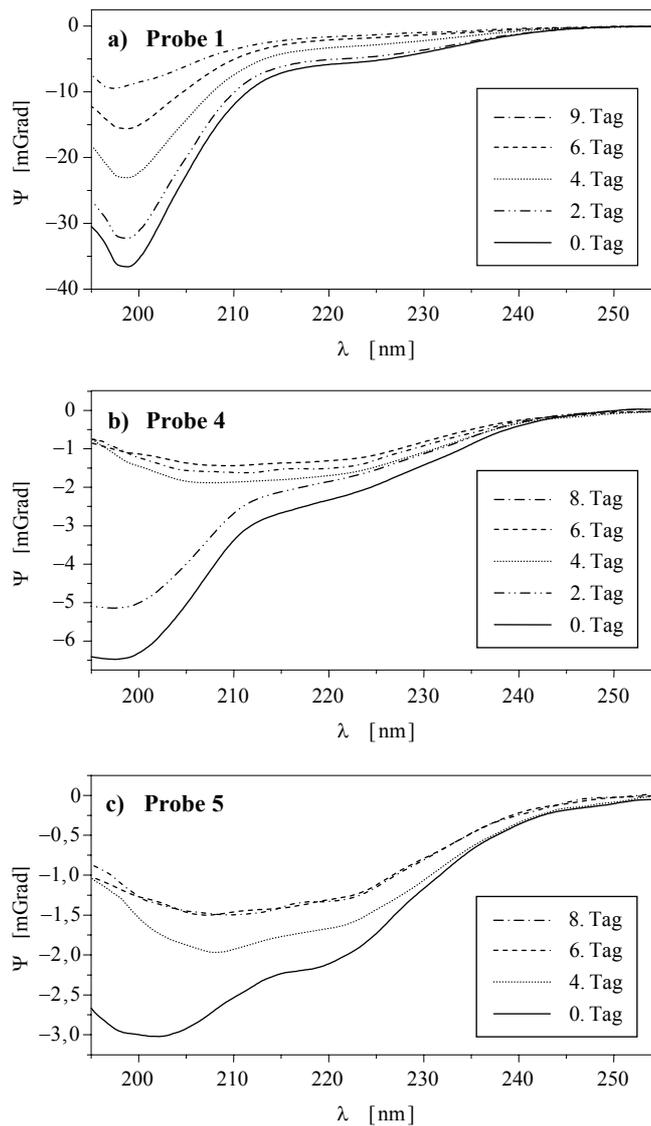


Abbildung 4.26: Zeitliche Änderung der CD-Spektrenverläufe von reinen  $\alpha$ S-Proben mit a)  $c_{\alpha S} = 17,3\mu\text{M}$ , b)  $c_{\alpha S} = 2,5\mu\text{M}$  und c)  $c_{\alpha S} = 1,0\mu\text{M}$ . Die Spektren wurden 12-fach akkumuliert und sodann mittels des Savitzky-Golay-Verfahrens<sup>[278]</sup> geglättet (mit variabler *convolution width*).  
 Messbedingungen:  $T = 20^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{KCl}} = 150\text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 7,8\text{mM}$ ,  $\text{pH} = 7,2$ .

Abgesehen von dem dadurch verursachten Einfluss auf die Spektrenskalierung offenkundigen die CD-Messungen einen Erhalt des *random coil*-Charakters der  $\alpha$ S-Struktur bei Probe 1, ebenso wie bei Probe 2 (Daten nicht abgebildet), über die gesamten 9 Tage hinweg.

Dagegen konnte bei den drei Proben geringerer Proteinkonzentration ( $c_{\alpha S} < 10\mu\text{M}$ ) als zweite Kinetik nach einer Konzentrations-abhängigen Latenzzeit von einigen Tagen eine signifikante Änderung im Verlauf der CD-Spektren beobachtet werden (vgl. Abb. 4.26b) und 4.26c)). Erkennbar ist dabei ein breites von ca. 205nm bis 225nm reichendes Minimum, in dem sich als Substruktur die für eine Helixfaltung typischen  $\pi\pi^*$ - und  $n\pi^*$ -Übergänge bei ca. 205nm und 222nm abzeichnen (s. Kap. 2.2.6). Die Ausbildung eines  $\beta$ -Faltblatts kann hierbei ausgeschlossen werden, da  $c_{\alpha S}$  für jede Probe weit unterhalb der Aggregations-Grenzkonzentration liegt (s. Kap. 1.4 & 4.1.7), die ungefähr  $65\mu\text{M}$  beträgt,<sup>[313]</sup> und da bisher nur in den  $\alpha$ S-Aggregaten Faltblätter nachgewiesen werden konnten. Es ist somit davon auszugehen, dass eine reine partielle *coil*-Helix-Umfaltung stattfindet, wobei ein größerer Teil der Sekundärstruktur nach wie vor ungefaltet vorliegt.

Die Bestimmung des Helixanteils  $\zeta_{\text{hel}}$  der Proteinstruktur stößt insoweit auf gewisse Schwierigkeiten, als offensichtlich  $c_{\alpha S}$  während der Inkubationszeit, vermutlich durch Ausfällung, sinkt (vgl. insbesondere Abb. 4.26a)), und damit  $c_{\alpha S}$ , außer am Tag 0, bei sämtlichen Messungen unbekannt ist. Dennoch kann unter der Annahme einer zwei-komponentigen Sekundärstruktur (Helix und *random coil*)  $\zeta_{\text{hel}}$ , d.h. die Helixfaltung eines nicht-gebundenen Proteins, näherungsweise aus dem Verhältnis der Elliptizität  $\Psi$  bei zwei verschiedenen Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  berechnet werden.

Für die Ableitung der entsprechenden Gleichung wird zunächst die Extinktionskoeffizienten-Differenz  $\Delta\varepsilon_\lambda$  bei einer beliebigen Wellenlänge als Linearkombination von  $\Delta\varepsilon_\lambda^{\text{hel}}$  einer reinen Helixstruktur und  $\Delta\varepsilon_\lambda^{\text{rc}}$  einer komplett entfalteten Aminosäuresequenz angesetzt

$$\Delta\varepsilon_\lambda = \zeta_{\text{hel}}\Delta\varepsilon_\lambda^{\text{hel}} + (1 - \zeta_{\text{hel}})\Delta\varepsilon_\lambda^{\text{rc}} . \quad (4.3)$$

$\zeta_{\text{hel}}$  ist der Bruchteil der Sekundärstruktur, der in einer helikalen Konformation vorliegt. Das heißt, für das betrachtete Zweikomponentensystem gilt  $\zeta_{\text{hel}} + \zeta_{\text{rc}} = 1$ , mit  $\zeta_{\text{rc}}$  als dem *random coil*-Anteil der Proteinstruktur. Für die Wahl von  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  wurde der in Abb. 4.27 gezeigte Spektrenarray aus den berechneten theoretischen CD-Spektren reiner Helixfaltung bzw. *random coil*-Struktur (vgl. Kap.3.6.2) erstellt mit sukzessiv wachsendem  $\zeta_{\text{hel}}$ . Kennzeichnend für den Grad der Helizität ist  $\Delta\varepsilon_{220}$ , d.h. der bei  $\lambda = 220\text{nm}$  gemessene Circular Dichroismus. Ferner ist Abb. 4.27 zu entnehmen, dass sich mit zunehmendem  $\zeta_{\text{hel}}$  der  $\pi\pi^*$ -Übergang und damit das *random coil*-typische Minimum unterhalb von 200nm langsam nach 205nm verschiebt. Die Wahl für  $\lambda_2$  fiel damit auf 200nm, als mittlere Wellenlänge zwischen beiden Minimumpositionen.  $\zeta_{\text{hel}}$  lässt sich so unter Verwendung von Gl. (4.3) folgendermaßen als Funktion des Verhältnisses  $\mathbf{r} = \Delta\varepsilon_{220}/\Delta\varepsilon_{200}$  ausdrücken

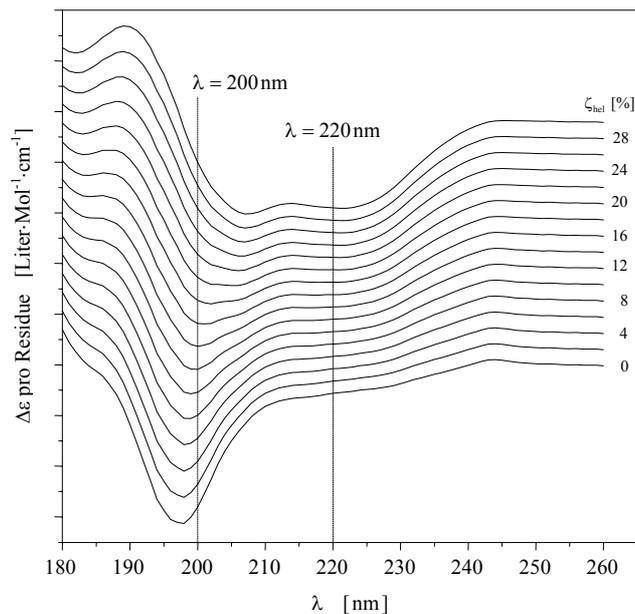


Abbildung 4.27: Aus den theoretischen CD-Spektren reiner Helix- bzw. *random coil*-Struktur (vgl. Abb. 2.15a) und 2.16b)) superponierte Spektren für verschiedene helikale Sekundärstrukturanteile  $\zeta_{\text{hel}}$ .

$$\zeta_{\text{hel}} = \frac{-\Delta\epsilon_{220}^{\text{rc}} + \Delta\epsilon_{200}^{\text{rc}} \mathbf{r}}{(\Delta\epsilon_{220}^{\text{hel}} - \Delta\epsilon_{220}^{\text{rc}}) - (\Delta\epsilon_{200}^{\text{hel}} - \Delta\epsilon_{200}^{\text{rc}}) \mathbf{r}} \quad (4.4)$$

Da zwischen der messbaren Elliptizität  $\Psi_\lambda$  und  $\Delta\epsilon_\lambda$  nach Gl. (2.48) und (2.49) eine lineare Proportionalität besteht, kann  $\mathbf{r}$  auch geschrieben werden als  $\mathbf{r} = \Psi_{220}/\Psi_{200}$ , wodurch die Proteinkonzentration der Lösung in der Bestimmungsgleichung (4.4) für  $\zeta_{\text{hel}}$  eliminiert ist. Die auf diese Weise berechnete zeitlichen Entwicklung von  $\zeta_{\text{hel}}$  ist in Abb. 4.28 für alle 5 Proben zusammengefasst.

Für die 3 Proben mit  $c_{\alpha\text{S}} = 2,5\text{--}10\mu\text{M}$  zeigt  $\zeta_{\text{hel}}(t)$  nicht nur eine Konzentrationsabhängige Latenzzeit bis zur Ausbildung einer helikalen Partialstruktur sondern enthüllt gleichzeitig, dass der Zeitbereich, in dem die Umfaltung stattfindet mit wachsendem  $c_{\alpha\text{S}}$  immer ausgedehnter wird. Ferner ist eine Konvergenz von  $\zeta_{\text{hel}}(t)$  gegen einen Maximalwert von etwa 23–25% erkennbar. Das bedeutet möglicherweise, dass sich ohne Gegenwart gekrümmter Membranoberflächen lediglich eine der beiden Helices unter Einschluss von ca. 35 Aminosäuren ausbildet.

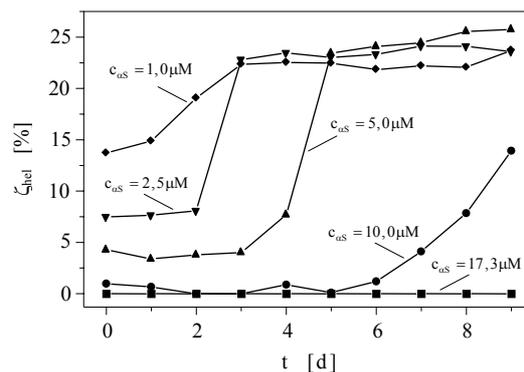


Abbildung 4.28: Aus den gemessenen CD-Spektren der 5  $\alpha S$ -Proben (s. Text) nach Gl. (4.4) berechnete helikale Faltung  $\zeta_{\text{hel}}$  des freien, ungebundenen  $\alpha S$  in Abhängigkeit von der Zeit.

#### 4.1.6 Diskussion

Die Experimente betreffend der spontanen Selbstfaltung von  $\alpha S$  zeigen, dass die Ausbildung einer helikalen Struktur bereits eine intrinsische Eigenschaft des Proteins darstellt. Allerdings erfolgt dies auf einer Zeitskala, die sich über mehrere Tage erstreckt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Eigenfaltung nicht in Lösungen hoher Proteinkonzentration beobachtet werden kann (s. Abb. 4.26a)), erscheint es nahe liegend, dass die Zwischenstufen, die das Protein bei der Helixbildung durchläuft, metastabil sind und leicht durch Kollision mit größeren Partikeln, z.B. Nachbarproteinen, wieder zerstört werden können. Inwieweit das auch für eine bereits vollständig ausgebildete Helix zutrifft, kann an dieser Stelle nicht konstatiert werden.

Merkwürdigerweise änderte sich beim Erhitzen der Proben das CD-Signal bis 80°C praktisch überhaupt nicht und selbst oberhalb dieser Temperatur nur geringfügig. Eine mögliche Erklärung für diese Erscheinung könnte die Ausbildung intramolekularer kovalenter *cross links* sein.

Um zu klären, ob der Eigenfaltungsneigung des  $\alpha S$  auch eine intrazelluläre Bedeutung zukommen kann, wäre zu prüfen, inwieweit die Latenzzeit bis zur Helixausbildung nicht nur von  $c_{\alpha S}$  sondern auch noch von der Gegenwart anderer größerer Partikel abhängt.

### 4.1.7 $\alpha$ S-Aggregation

#### Übersicht

Für die Untersuchung der Aggregationsdynamik von  $\alpha$ S musste das Protein in hoher Konzentration in Lösung vorliegen. Wood et al.<sup>[313]</sup> erhielten für  $\alpha$ S-Wild Typ eine Aggregations-Grenzkonzentration knapp unter 1mg/ml. Damit die Aggregation über einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnte, wurden daher 1,86mg des Proteins gereinigt, sodann lyophilisiert und danach in 200 $\mu$ l Puffer, mit  $c_{\text{KCl}} = 100\text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 20\text{mM}$  und  $\text{pH} = 7,2$ , der über einen 0,02 $\mu\text{m}$ -Filter von Schmutzpartikeln befreit wurde, aufgenommen ( $\rightarrow c_{\alpha\text{S}} = 9,28\text{mg/ml}$ ). Die Inkubationstemperatur betrug durchgehend 25°C. Da die Güte von DLS-Experimenten stark von der Reinheit der Probe abhängt, wurde die für die Messungen verwendete Spaltküvette, nach dem Befüllen in einer Stickstoff-beblasenen Kammer, verschlossen und während der gesamten Messperiode nicht geöffnet. Die Änderungen der Radien und der relativen

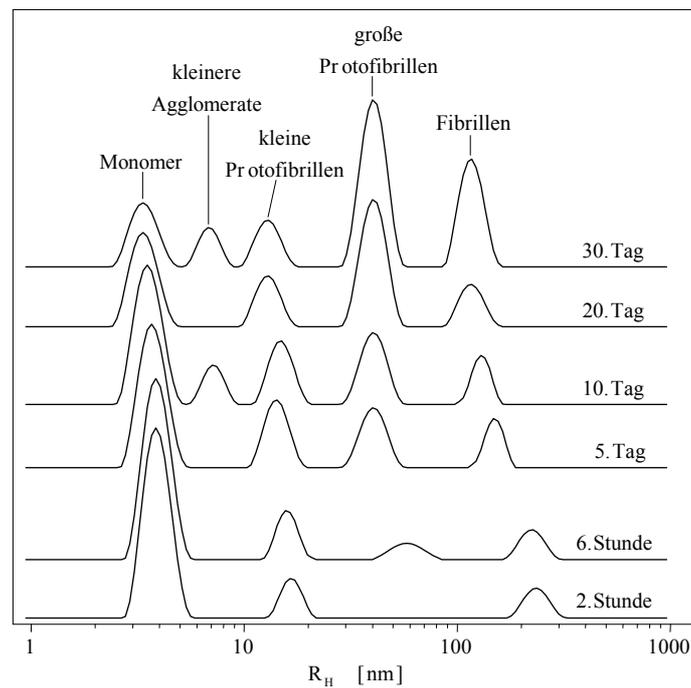


Abbildung 4.29: Zeitabhängige Entwicklung der Verteilungen des  $\alpha$ S-Monomers sowie der Aggregate bei  $T = 25^\circ\text{C}$ . Für eine bessere Illustrierung der Intensitätsänderungen der Partikelspezies wurde hier die mittlere Peakbreite einer jeden Teilchensorte zeitlich konstant gesetzt.

Gewichtungen des Monomer-Peaks sowie der Aggregate wurden täglich durch 8 zweistündige Einzelmessungen über insgesamt 32 Tage verfolgt. Am Ende dieses Zeitraums wurden die Aggregate und die restlichen Monomere über eine FPLC-Anlage separiert und die einzelnen Partikelfractionen mittels CD untersucht.

Abb. 4.29 zeigt illustrativ den zeitlichen Verlauf der Radius-abhängigen Intensitäten in den DLS-Experimenten. Klar erkennbar sind 4 Hauptpeaks, die dem Monomer, kleinen Intermediaten, großen Intermediaten und Fibrillen zugeordnet werden können. Üblicherweise werden die intermediären Aggregate als Protofibrillen bezeichnet. Ab dem Tag 7 tritt sporadisch ein fünfter Peak bei  $R_H \approx 8\text{nm}$  auf. Vermutlich umfasst er kleinere Agglomerate. Bereits in dieser Abbildung offenbart sich ein neuartiger Befund, nämlich das Auftreten zweier distinkter Protofibrillensorten. In der einschlägigen Literatur wurde bisher stets nur von Protofibrillen gesprochen, ohne nähere Spezifizierung von deren Größe.<sup>[142,314]</sup>

#### *Intensitäts-gewichtete Verteilungen*

Die aus einem Fit der gemessenen Korrelationsfunktion  $g_2(t)$  (s. Kap. 2.3.2) erhaltene Intensitäts-gewichtete Radiusverteilung wird software-technisch stets so normiert, dass das Flächenintegral über alle ermittelten Partikelspezies Eins ist. Infolge der Restverunreinigungen in der  $\alpha\text{S}$ -Lösung setzt sich die Streuintensität  $I(t)$  nicht nur aus den Einzelintensitäten der vier  $\alpha\text{S}$ -Spezies zusammen. Die Summe der Flächen  $A_i$ , mit  $i = 1, 2, 3, 4$  für die vier  $\alpha\text{S}$ -Teilchensorten, ist daher im Normalfall kleiner Eins. Für eine quantitative Bestimmung der zeitlichen Entwicklung der  $\alpha\text{S}$ -Monomer-Verteilung sowie der drei Aggregatsorten müssen deshalb die Intensitäts-gewichteten Verteilungen  $A_i$  mit der bei jeder Messung erhaltenen mittleren Gesamtstreuintensität  $I_j(t)$  multipliziert werden. Zur Unterscheidung der täglich durch-

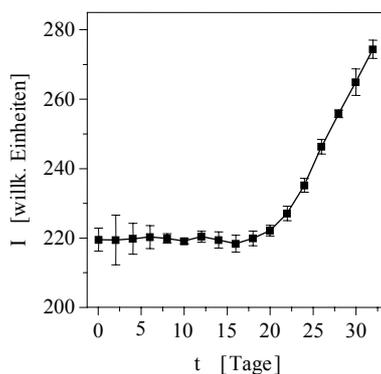


Abbildung 4.30: Über 5 Messungen gemittelte Streuintensität  $I(t)$  der  $\alpha\text{S}$ -Lösung während der Aggregation;  $T = 25^\circ\text{C}$ .

geführten 8 Einzelmessungen und der zugehörigen  $A_i$  wird der Index  $j$  eingeführt ( $A_i \rightarrow A_{ij}$ ). Gleichzeitig wird für jeden Tag eine Mittelung über die 5 verlässlichsten der 8 durchgeführten Messungen vorgenommen. Da die Streuintensität  $I(t)$  der Probe, wie in Abb. 4.30 ersichtlich, zudem zeitlich variiert, ist eine erneute Normierung der Daten bzgl.  $I(t)$  notwendig. Als Norm wird hierbei die maximale über einen Tag gemittelte Streuintensität der vier Teilchensorten ( $\rightarrow$  der Index  $i$  in Gl. (4.5) summiert über die vier Partikelspezies mit  $i = 1$  für das  $\alpha$ S-Monomer und  $i = 2, 3, 4$  für die drei fibrillären Aggregate), die während der 32 Tage auftrat, verwendet.

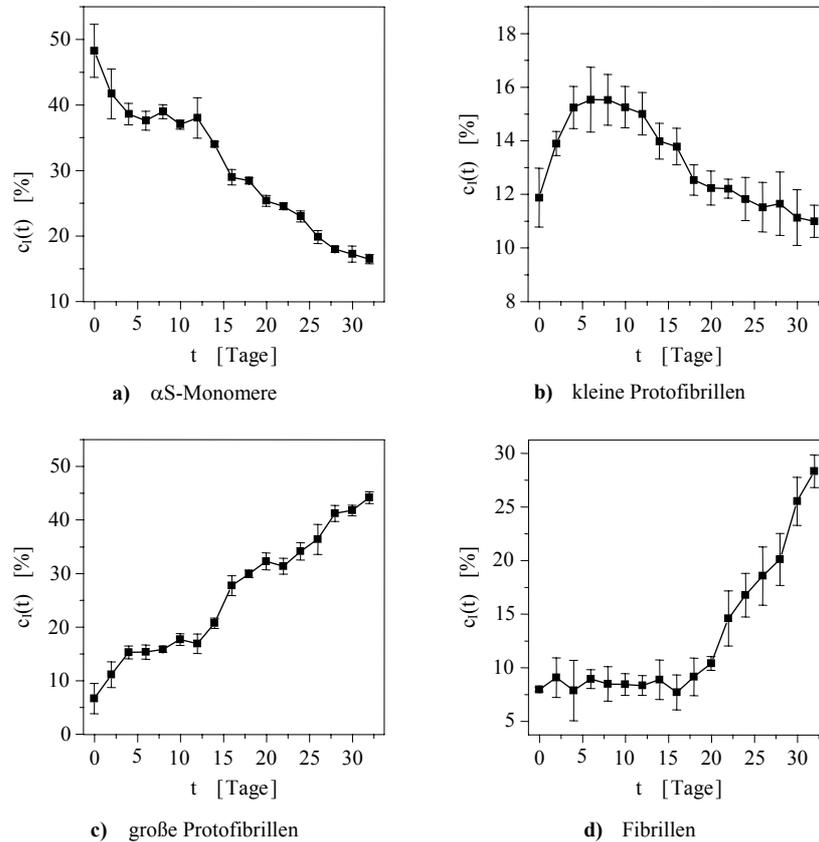


Abbildung 4.31: Die während der 32 Messtage beobachtbaren Änderungen der mittleren Intensitäts-gewichteten Verteilungen des Monomers sowie der drei fibrillären Aggregatspezies. Angabe der Wichtungen  $c_i(t)$  und Standardabweichungen durch Mittelung über 5 Einzelmessungen.

Gleichung (4.5) enthält die Formel für die Berechnung der  $c_{i,i}(t)$  mit

$$c_{i,i}(t) = \frac{\frac{1}{5} \sum_{j=1}^5 A_{ij}(t) \cdot I_j(t)}{\max \left( \frac{1}{5} \sum_{j=1}^5 \left( \sum_{i=1}^4 A_{ij}(t) \right) \cdot I_j(t) \right)} \Bigg|_{\forall t \in [0d-32d]} \quad (4.5)$$

Abb. 4.31 zeigt die auf diese Weise normierten zeitlichen Verläufe der  $c_{i,i}(t)$ . Die Kurven zeigen, dass das Aggregationsverhalten des  $\alpha$ S keiner einfachen Dynamik unterliegt, sondern verschiedene Stadien durchläuft, in denen unterschiedliche Mechanismen die Aggregationskinetik dominieren (Die detaillierte Analyse dieser Mechanismen findet sich in der anschließenden Diskussion, Kap. 4.1.8).

Schließlich sind in Abb. 4.32 noch die unmittelbar nach dem Auflösen des Proteins innerhalb der ersten Stunden gemessenen Intensitäts-Wichtungen  $c_{i,i}(t)$  der drei Aggregatzustände – kleine und große Intermediate und Fibrillen – dargestellt. Bei allen drei Verteilungen ist in den ersten 10 Stunden ein steiler Anstieg mit einer darauf folgenden Abflachung des Wichtungsverlaufs erkennbar.

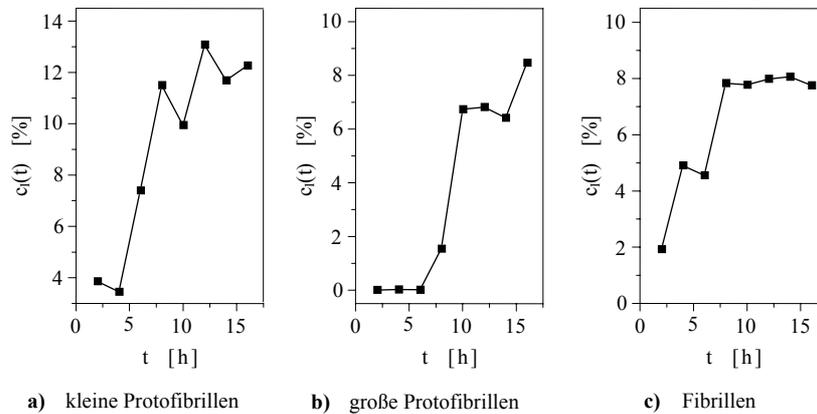


Abbildung 4.32: Zeitliche Entwicklung der Intensitäts-gewichteten Verteilungen der drei fibrillären Aggregatspezies innerhalb der ersten Stunden nach der Inkubation des  $\alpha$ S.  
Angabe der auf die Gesamtstreuintensität der Probe normierten Wichtungen, die für die einzelnen DLS-Messungen erhalten wurden. Der Shift um 2h entspricht der Dauer einer Messung.

*Radiusänderungen*

Abb. 4.33 beinhaltet die Änderungen der mittleren Radien für die  $\alpha$ S-Monomer-Verteilung sowie für die Protofibrillen und Fibrillen. Die Umrechnung der aus den gemessenen Korrelationsfunktionen zunächst erhaltenen Intensitäts-gewichteten in Anzahl-gewichtete Radiusverteilungen wird weiter unten näher ausgeführt (s. *Partikeldimensionen*).

Die Abnahme von  $R_H$  für den Monomer-Peak sowie für die Aggregate ist ad hoc nicht unmittelbar einsichtig. Verschiedene Ursachen sind hierbei denkbar, wie etwa ein Abbau des Proteins durch Spuren einer Protease in der Lösung. Allerdings ergab

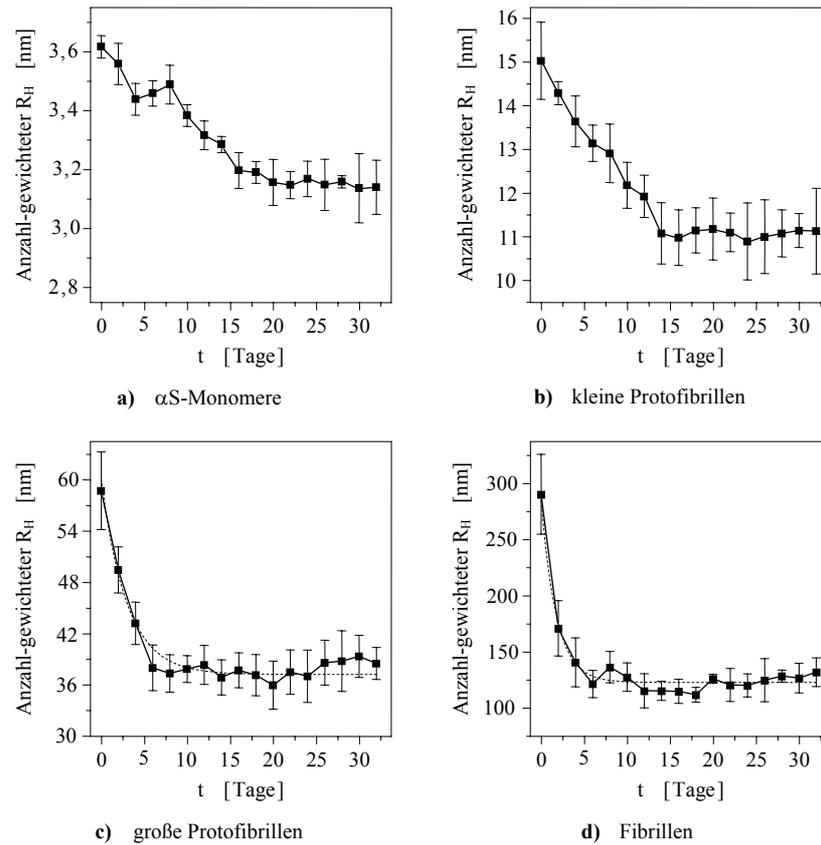


Abbildung 4.33: Zeitliche Änderungen der mittleren hydrodynamischen Radien des  $\alpha$ S-Monomers und der Aggregate.

ein am Ende der DLS-Experimente durchgeführter Western-Blot, bei dem das aggregierende Protein neben einer frischen  $\alpha$ S-Kontroll-Lösung aufgetragen wurde, keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Blots. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass der Monomerpeak zugleich auch noch zumindest Di- & Trimere einschließt, wobei deren Verlustrate, bei annähernd unveränderter Bildungsrate, mit fortschreitender Aggregationsdauer durch die erhöhte Möglichkeit der Anlagerung an größere bereits bestehende Aggregate zunimmt.

Dass die Monomer-Verteilung innerhalb der gemessenen mittleren Peakbreite durchaus auch kleinere Multimere beinhalten kann, soll im folgenden kurz dargelegt werden:

Der hydrodynamische Radius  $R_H$  eines globulären bzw. ungefalteten Proteins kann mit dessen Molmasse  $M$  in Relation gesetzt werden durch die beiden empirisch gefundenen Gleichungen <sup>[private Mitteilung von K. Mattison]</sup>

$$M [\text{kDa}] = \left(1,68 \cdot (R_H[\text{nm}] - 0,28)\right)^{2,3389}, \quad \text{globulär}; \quad (4.6)$$

$$M [\text{kDa}] = \left(1,478 \cdot (R_H[\text{nm}] - 0,28)\right)^{1,8136}, \quad \text{ungefaltet}. \quad (4.7)$$

Der Subtrahend in den Gleichungen (4.6) und (4.7) entspricht der effektiven Vergrößerung eines Partikels durch die es umgebende Hydrathülle. Diese Wasserschale bedingt im Fall von *stick boundary conditions* (Kap. 2.3.3, S. 84) eine etwas geringere Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle in Lösung. Setzt man für  $M$  Vielfache der Molmasse des  $\alpha$ S ( $M_{\alpha S} = 14,44 \cdot 10^3 \text{ g/Mol}$ ) in (4.6) und (4.7), ergeben sich für das Monomer und die ersten neun Oligomere die in Tab. 4.6 zusammengefassten Radien für eine globuläre bzw. ungeordnete Sekundärstruktur.

Da diese kleinen Aggregate sicher noch keine kompakte innere Struktur aufweisen, aber auch nicht mehr – wie für das Monomer gültig – als ein entfaltetes Protein angesehen werden können, grenzen die in Werte Tab. 4.6 lediglich den Bereich der tatsächlichen Partikelgrößen dieser Multimere ein. Ein Vergleich der Radien aus Tab. 4.6 mit den in Tab. 4.7 spezifizierten Verteilungsbreiten des Monomer-Peaks macht deutlich, dass zumindest Oligomere bis einschließlich dem Tetramer in selbigem beinhaltet sein können.

Die Verringerung des mittleren  $R_H$  der beiden Protofibrillen sowie der Fibrillen innerhalb der ersten Tage (Abb. 4.33) ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich zu Beginn der Messserie infolge der hohen Proteinkonzentration rasch eine gewisse Population größerer Partikel bildet, wobei sich allerdings erst im Laufe der Zeit die eher locker aneinandergelagerten Untereinheiten, aus denen die Agglomerate bestehen, durch sukzessive Umfaltung der  $\alpha$ S-Moleküle verdichten und damit die Aggregate eine kompakte Struktur erhalten (s. auch Kap. 4.1.8 – *Intrinsische Struktur- und Dynamik der Aggregate*).

	$R_H$ [nm]	
	globulär	ungefaltet
Monomer	2,14	3,23
Dimer	2,79	4,60
Trimer	3,26	5,69
Tetramer	3,65	6,61
Pentamer	3,99	7,44
Hexamer	4,29	8,20
Heptamer	4,56	8,90
Oktamer	4,82	9,56
Nonamer	5,05	10,2
Decamer	5,27	10,8

Tabelle 4.6: Nach Gl. (4.6) und (4.7) berechnete hydrodynamische Radien des  $\alpha$ S-Monomers sowie der ersten neun Oligomere für eine kompakte globuläre Struktur bzw. für einen annähernd ungefalteten, locker agglomerierten Molekül-Verbund.

$R_H$ [nm]	minimaler Verteilungswert	maximaler Verteilungswert	mittlere Verteilungsbreite
Monomer	2,56±0,099	5,32±0,17	2,77±0,21
kleine Agglomerate	5,33±0,21	8,53±0,69	4,21±0,50
kleine Protofibrillen	9,42±0,88	20,0±2,1	11,5±1,5
große Protofibrillen	25,4±2,8	69,3±3,8	43,9±4,5
Fibrillen	95,5±12,5	180±17	84,7±10,05

Tabelle 4.7: Über den gesamten Messzeitraum (Tag 0–32) gemittelte Peakverteilungen mit Angabe von  $\sigma$  für das  $\alpha$ S-Monomer und die Aggregate. Die Mittelung erfolgte über alle Einzelmessungen, die der weiteren Auswertung zugeführt wurden (s. Text). Die Variation der angegebenen Werte durch die in Abb. 4.33 ersichtlichen Radiusänderungen liegt stets – selbst für die beiden größeren Aggregate – für alle Zeiten innerhalb der angegebenen Standardabweichungen.

### Strukturfaktoren

Der sich im weiteren anschließende Teil der Arbeit befasst sich mit der Renormierung der Intensitäts-gewichteten Verteilungen  $c_I(t)$  in die Anzahl-gewichteten  $c_N(t)$  gemäß Gl. (2.102). Dabei ist die Kenntnis des Strukturfaktors  $P(q, R_H)$  erforderlich.  $P(q, R_H)$  berücksichtigt die durch die Geometrie eines Partikels bedingte anisotrope Streulichtausbreitung in verschiedene Raumrichtungen. Daher wird  $P(q, R_H)$  in den weiteren Ausführungen als *geometrischer Strukturfaktor* bezeichnet.

Da die (in den Gleichungen (2.70)–(2.72) angegebenen) geometrischen Strukturfaktoren  $P(q, R_H)$  eine homogene Massenverteilung in den Partikeln annehmen, hängt die Streuintensität eines Teilchens noch von einem weiteren Parameter ab, der als *atomarer Strukturfaktor* bezeichnet werden soll. In diesen geht sowohl die Anzahl der Atome, ihre Elementzugehörigkeit als auch die räumliche Verteilung der Atome innerhalb des Partikels ein.

### Partikeldimensionen

Die Berechnung der Anzahl-gewichteten Radiusverteilung  $c_N(t)$  setzt die Kenntnis der Partikelgeometrien voraus:

Nicht-aggregierte  $\alpha$ S-Moleküle zeigen in Lösungen mit mittlerer bzw. hoher Teilchenkonzentration (vgl. Kap. 4.1.6) eine *random coil*-Struktur (Abbildung 4.2). Dagegen ist aus AFM- (*atomic force microscopy*) und elektronenmikroskopischen Aufnahmen<sup>[314,315]</sup> bekannt, dass die fibrillären Aggregate – die Protofibrillen und die Fibrillen – als langgestreckte Stäbchen vorliegen.<sup>[314,315]</sup> Somit sind für die Berechnungen der  $c_N(t)$  (s. Gl. (4.8) & (4.9)) die *geometrischen Strukturfaktoren* aus Gl. (2.72) bzw. (2.71) in Gl. (2.102) einzusetzen.

Da die Ursachen der zeitlichen Radiusänderung des  $\alpha$ S-Monomerpeaks nicht mit Sicherheit identifiziert werden können, wird  $R_H(\alpha S)$  für die Bestimmung der  $c_N(t)$  über Gl. (4.7) berechnet. Der so erhaltene Wert –  $R_H = 3,23\text{nm}$  – kann ungefähr als Mittelwert des  $R_H(t)$ -Graphen aus Abb. 4.33a) angesehen werden. Die Bestimmung des Gyrationradius  $R_G$  aus  $R_H$  erfolgt mit Hilfe der für entfaltete Proteine gültigen Relation  $R_G/R_H = 1,51$ .<sup>[284]</sup>

Das hydrodynamische Volumen eines  $\alpha$ S-Moleküls wird durch eine Sphären-Näherung mit  $V_H \cong 4\pi/3 \cdot R_H^3$  erhalten. Für die Monomer-Verteilung lautet damit die Gleichung zur Renormierung der  $c_I(t)$  in die Anzahl-gewichteten Amplituden  $c_N(t)$  in Abhängigkeit von  $R_H$  nach (2.102) mit  $q$  als dem sich über Gl. (2.66) definierenden Streuvektor

$$c_N(t, R_H) = \frac{c_I(t, R_H)}{2 \left[ \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{(R_H \cdot 1,51)^3}{q^2} \right]^2 \left[ \exp\left(- (qR_H \cdot 1,51)^2\right) + (qR_H \cdot 1,51)^2 - 1 \right]} \quad (4.8)$$

Die Bestimmungsgleichung der  $c_N(t)$  für die fibrillären Aggregate setzt die Kenntnis von deren Dicke  $d$  und Länge  $L$  voraus.  $d$  kann für die kleinen Protofibrillen und für die Fibrillen den AFM- und EM-Aufnahmen von Lashuel et al. [314] bzw. von Rochet et al. [315] entnommen werden, aufgrund der guten Auflösung dieser Abbildungen (vgl. Abb. 4.34 & 4.35). Da die in der vorliegenden Arbeit erstmals gefundene zweite Intermediatspezies, die großen Protofibrillen, bisher nicht als solche identifiziert und untersucht wurden, muss deren Dicke abgeschätzt werden (vgl. auch Kap. 4.1.8 – *Geometrie der großen Protofibrillen*). Die verwendeten Dicken- und Längenangaben die bei der Renormierung der  $c_i(t)$  in die  $c_N(t)$  verwendet wurden, sind für sämtliche fibrillären Aggregate in Tab. 4.8 zusammengefasst.

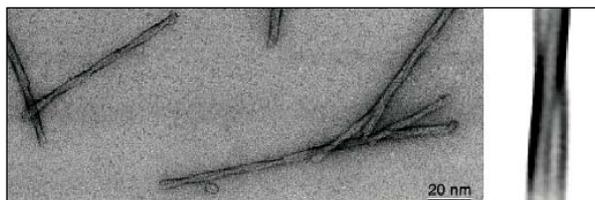


Abbildung 4.34: Elektronenmikroskopische Aufnahme der  $\alpha$ S-Protofibrillen nach [314]. Rechts ist der gewundene Verlauf einer Protofibrille vergrößert dargestellt.

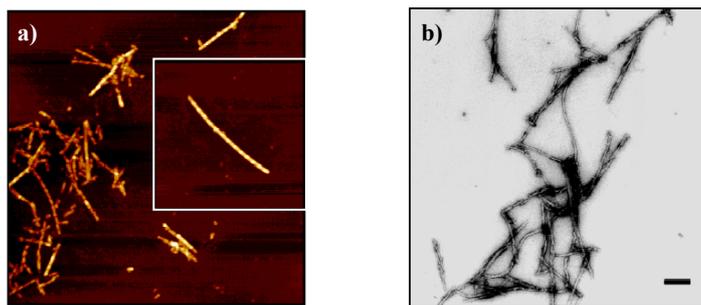


Abbildung 4.35: a) AFM-Bild von  $\alpha$ S-Maus-Fibrillen nach [315]. Das Hauptfenster besitzt die Dimensionen  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ ; das darin vergrößerte Bild  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ .  
 b) EM-Bild von  $\alpha$ S-Maus-Fibrillen nach [315]. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 200nm.  
 Reprinted with permission from [315]. Copyright (2000) American Chemical Society.

	$\bar{R}_H$ [nm]	d [nm]	$\bar{L}$ [nm]	$L_{\min}$ [nm]	$L_{\max}$ [nm]
Monomer	3,23	–	–	–	–
kleine Agglomerate	7,4	–	–	–	–
kleine Protofibrillen	10,9	4±0,5	80,9±4	56,3±3,1	180±6
große Protofibrillen	37,7	11±1	302±9	177±7	665±16
Fibrillen	122,9	30±2,5	1040±28	747±22	1706±37

Tabelle 4.8: Größenspezifikation der während der  $\alpha$ S-Aggregation auftretenden Partikel. Neben dem mittleren hydrodynamischen Radius  $\bar{R}_H$  der Teilchen sind für die fibrillären Aggregate deren Dicke d, die teilweise der Literatur entnommen wurde,<sup>[314,315]</sup> und die mittlere Länge  $\bar{L}$  angegeben. Die minimalen und maximalen Längen  $L_{\min}$ ,  $L_{\max}$  ergeben sich aus den in Tab. 4.7 spezifizierten Verteilungsbreiten unter Annahme einer invarianten Dicke pro Aggregat-spezies. Die Unsicherheiten der Längen bestimmen sich aus denen der Dicken.

Unter der Annahme, dass ein langes dünnes Stäbchen näherungsweise als langgestreckter prolater Ellipsoid behandelt werden kann, ist bei bekannter Dicke durch iteratives Lösen von Gl. (2.95) für jedes  $R_H$  die entsprechende Länge der Teilchen ermittelbar.<sup>38)</sup> Für die Stäbchenstruktur mit  $V \cong \frac{1}{4} \cdot d^2 L$ , (für einen axialsymmetrischen Ellipsoid betrüge  $V = (1/6) \cdot \pi d^2 L$ ) lautet damit die Renormierungsgleichung (2.102)

$$c_N(t, R_H, d, L) = \frac{c_1(t, R_H)}{\left(\frac{d^2 \pi}{2q}\right)^2 \left[ \frac{qL}{2} \int_0^{qL} \frac{\sin x}{x} dx - \sin^2\left(\frac{qL}{2}\right) \right]}. \quad (4.9)$$

Illustrativ zeigt Abb. 4.36 für verschiedene Partikelgeometrien die sich aus einer Intensitäts-gewichteten Radiusverteilung ergebenden Anzahl-gewichteten Verteilungen mit Angabe der jeweiligen mittleren Radien. Anhand der Abbildungen 4.36 und 4.37a) wird bereits anschaulich ersichtlich, dass eine einheitliche Näherung für alle vier Partikelsorten durch eine sphärische Geometrie zu stark verfälschten Ergebnissen führen muss. Auf der Grundlage der Gleichungen (4.8) und (4.9) erfolgte die

<sup>38)</sup> Es ist dabei darauf zu achten, dass für die in Gl. (2.92) einzusetzenden ellipsoidalen Halbachsen gilt:  $a = \frac{1}{2} \cdot L$ ;  $b = \frac{1}{2} \cdot d$ .

Kalkulation der Anzahl-gewichteten Radiusverteilungen, aus denen die in Abb. 4.33 gezeigten mittleren Radien der einzelnen Teilchenspezies berechnet wurden.

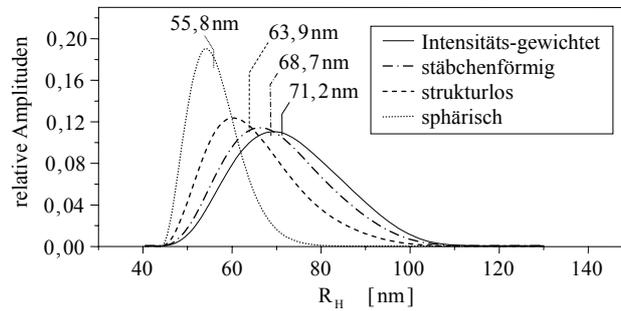


Abbildung 4.36: Intensitäts-gewichtete Radiusverteilung nebst den sich daraus ergebenden Anzahl-gewichteten Verteilungen für verschiedene Teilchengometrien. Die Fläche unter den Peaks ist jeweils auf Eins normiert!

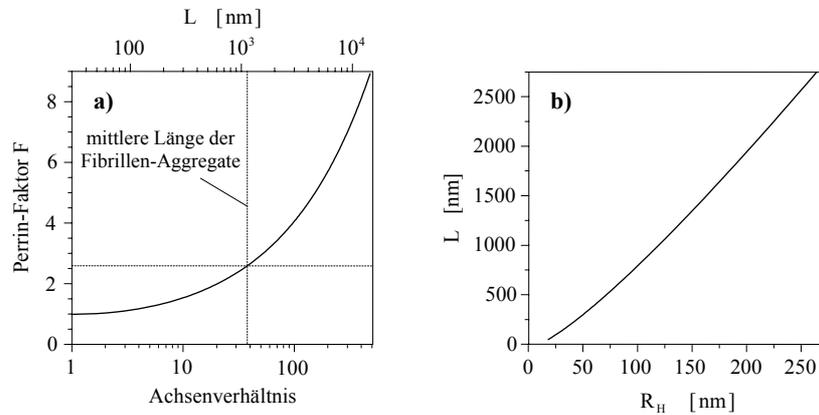


Abbildung 4.37: a) Perrin-Faktor  $F$  in Abhängigkeit vom Achsenverhältnis, bzw. speziell für Fibrillen mit  $d = 30\text{nm}$  von deren Länge  $L$ .  
b) Länge  $L$  der Fibrillen in Abhängigkeit von  $R_H$ .

Für die Bestimmung der in Tab. 4.8 angegebenen, zeitlich gemittelten Radien wurden nur die  $R_H(t)$  verwendet, bei denen sich  $R_H$  nicht mehr signifikant ändert (vgl.

Abb. 4.33); für die kleinen Protofibrillen heißt das:  $14d \leq t \leq 32d$  und für die großen Protofibrillen, ebenso wie für die Fibrillen:  $6d \leq t \leq 32d$ . Zur iterativen Berechnung der Längen bei gegebenem  $d$  und  $R_H$  wurde eine Excel-VBA-Routine geschrieben. Gleiches gilt für die Berechnung der fibrillären Anzahl-gewichteten Verteilungen  $c_N(R_H, d, L)$ , insbesondere der sich daraus ergebenden Mittelwerte für  $R_H$  bzw.  $L$ . Zur Ermittlung des Integralsinus in Gleichung (4.9) wurde dabei der Romberg-Algorithmus<sup>[316]</sup> implementiert.

#### Zahl der $\alpha$ S-Monomere pro Aggregat

Auf der Grundlage der in Tab. 4.8 und 4.7 angegebenen geometrischen Dimensionen der Aggregate ist eine Abschätzung der mittleren Zahl von  $\alpha$ S-Molekülen pro Aggregat möglich. Da die Dichte globulärer Proteine zwischen  $0,95\text{--}1,5\text{g/cm}^3$  variiert,<sup>[317]</sup> und die Sekundärstruktur der  $\alpha$ S-Aggregate durch einen hohen Grad an antiparallelem  $\beta$ -Faltblatt charakterisiert ist,<sup>[154]</sup> wurde eine mittlere Dichte von ca.  $1,3\pm 1\text{g/cm}^3$  angenommen. Für die kleinen Agglomerate wurde eine näherungsweise sphärische Gestalt gewählt, so dass  $V \approx 4/3 \cdot \pi R_H^3$  gilt, und für alle fibrillären Partikel eine stäbchenförmige Geometrie mit  $V \cong 1/4 \pi d^2 L$ .

In Tab. 4.9 sind die sauf diese Weise bestimmten Monomerzahlen  $N_{\text{Mon}}$  für die verschiedenen Aggregate zusammengefasst. Die Angabe der Bereiche für  $N_{\text{Mon}}$  berücksichtigt sowohl die Unsicherheiten in der Bestimmung von  $d$  und  $L$ , als auch Dichteschwankungen um  $\pm 0,1\text{g/cm}^3$  sowie die Breiten der einzelnen Radiusverteilungen (vgl. Tab. 4.7).

	<b>wahrscheinliche Monomerzahl pro Aggregat</b>	
	häufigster Wert $\bar{N}_{\text{Mon}}$	Bereich für $N_{\text{Mon}}$
Monomerpeak	–	1 – 4
kleinere Agglomerate	8	5 – 30
kleine Protofibrillen	$65\pm 5$	55 – 75
große Protofibrillen	$1600\pm 100$	1100 – 2100
Fibrillen	$40000\pm 3000$	30000 – 50000

Tabelle 4.9: Anzahl an Monomeren  $N_{\text{Mon}}$ , die in den bei der Aggregation des Proteins  $\alpha$ S auftretenden Aggregaten enthalten sind. Die Angabe des häufigsten Wertes für  $N_{\text{Mon}}$  bezieht sich auf die in Tab. 4.8 spezifizierten Werte von  $\bar{R}_H$  und  $\bar{L}$  unter Verwendung der Dichte  $\rho_{\text{Aggregat}} = 1,3\text{g/cm}^3$ .

Die in den kleineren Agglomeraten enthaltene Zahl an Monomeren  $N_{\text{Mon}}$  kann zudem für den Fall einer kompakten inneren Struktur bzw. einer eher lockeren Zusammenlagerung mittels Gl. (4.6) bzw. (4.7) näherungsweise bestimmt werden. Für eine dichte Packung bestehen diese Aggregate aus 10–33  $\alpha$ S-Molekülen und für eine leicht agglomerierte Geometrie lediglich aus 3–6 Monomeren.

Aus den in Tab. 4.9 angegebenen mittleren Monomerzahlen der protofibrillären und fibrillären Aggregate ergibt sich, dass die Vereinigung von ca. 25 kleineren Protofibrillen eine große Protofibrille bilden, und durch die Zusammenlagerung von etwa ebenso vielen dieser Partikelspezies eine Fibrille entsteht.

Die Glaubwürdigkeit der in Tab. 4.9 angegebenen Zahlen wurde anhand der verfügbaren Literatur geprüft:

In *site-directed spin labeling*-Untersuchungen<sup>[154]</sup> konnte eine leiterartige Anordnung der in einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur vorliegenden  $\alpha$ S-Moleküle in den beiden Windungen der kleinen Protofibrillen (vgl. Abb. 4.34) gefunden werden, so wie in Abb. 4.44 (S. 180 links oben) schematisch dargestellt. Die Ausdehnung eines  $\alpha$ S-Monomers parallel zur Aggregat-Längsachse beträgt 25–28 Å.<sup>[154]</sup> Da jede kleine Protofibrille aus *zwei* sich schraubenförmig umwindenden Aggregatsträngen besteht, ergibt sich unter Verwendung der aus den DLS-Messungen erhaltenen mittleren Länge von ca. 80 nm, eine durchschnittliche Monomerzahl von 57–64. Die von Lashuel et al.<sup>[314]</sup> für die beiden Mutanten A30P und A53T bestimmten Massen eines Aggregatstrangs liegen im Bereich von 400–600 kDa. Eine Protofibrille sollte somit etwa aus 55–83 Monomeren bestehen ( $M_{\alpha S} \approx 14,4$  kDa).

Diese Werte stimmen mit der in Tab. 4.9 spezifizierten Monomerzahl für die kleinen Protofibrillen sehr gut überein. Es ist daher anzunehmen, dass auch die übrigen errechneten  $N_{\text{Mon}}$ -Werte verlässliche Angaben darstellen.

#### *Anzahl-gewichtete Verteilungen*

Damit aus den mittels Gl. (4.8) und (4.9) berechneten Anzahl-gewichteten Verteilungen Aussagen über die zeitliche Zu- bzw. Abnahme der Teilchenzahlen bzw. Konzentrationen für das Monomer sowie die fibrillären Aggregate erhalten werden können, ist die Kenntnis der Streuintensität pro Partikel nötig. Die Abhängigkeit der Streuintensität von der Partikelgeometrie ist in den Anzahl-Verteilungen  $c_N(t)$  bereits nicht mehr vorhanden. Allerdings enthalten die  $c_N(t)$  dennoch eine Abhängigkeit von der Streuintensität infolge des noch nicht eliminierten *atomaren Strukturfaktors* (vgl. Abschnitt weiter oben: *Strukturfaktoren*). Der atomare Strukturfaktor kann jedoch für keine der Teilchensorten spezifiziert werden.

Um trotzdem die zeitliche Entwicklung der molaren Konzentrationen für das Monomer und die gefundenen Aggregate in einen quantitativen Rahmen gießen zu können, wird wie folgt vorgegangen:

Aufgrund der eingangs erwähnten experimentellen Bedingung  $m_{\alpha S} = 1,86\text{mg}$  bestimmt sich die Gesamtzahl der  $\alpha S$ -Moleküle, die sich in der Lösung befinden, zu  $N_{\alpha S} \cong 7,74 \cdot 10^{16}$ . Unabhängig von der Aggregationskinetik muss  $N_{\alpha S}$  während der gesamten 32-tägigen Beobachtungsdauer stets konstant bleiben und ist folglich zeitunabhängig ( $N_{\alpha S} \neq N_{\alpha S}(t)!$ ). Es kann somit eine Erhaltungsgleichung für  $N_{\alpha S}$  aufgestellt werden

$$N_{\alpha S} = \sum_{i=1}^4 N_{\text{Mon}}^i N_i(t). \quad (4.10)$$

In (4.10) wird über die vier Partikelsorten summiert. Die mittlere, ebenfalls zeitunabhängige Anzahl an Monomeren, aus denen ein einzelnes Partikel einer Teilchenspezies besteht, wird durch  $N_{\text{Mon}}^i$  festgelegt (s. Tab. 4.9); mit  $N_{\text{Mon}}^1 = 1$ .  $N_i(t)$  gibt die Zahl der zum Zeitpunkt  $t$  in Lösung befindlichen Teilchen der Sorte  $i$  an ( $i = 1-4$ ). Aufgrund der Renormierung der Intensitäts-gewichteten Radiusverteilungen in die Anzahl-gewichtete ist die Fläche  $A_{N,i}$  unter jeder Verteilung proportional zur Zahl der Partikel, die in dieser Verteilung zusammengefasst sind

$$N_i(t) = \chi_i A_{N,i}(t), \quad i = 1, 2, 3, 4. \quad (4.11)$$

Die  $\chi_i$  in Gl. (4.11) sind die vier Partikelsorten-spezifischen Proportionalitätskonstanten. Eine weitere Folge der Normierung der Intensitäts-gewichteten  $c_{i,j}(R_H, t)$  mittels Gl. (2.102) in Anzahl-gewichtete Verteilungen ist die Eliminierung der intrinsischen Radiusabhängigkeit aus den Wichtungen  $c_{N,i}(R_H, t)$  (vgl. Kap. 2.3.4) und damit auch aus den  $A_{N,i}(t)$ . Da die  $N_i(t)$  gleichfalls keine  $R_H$ -Abhängigkeit besitzen, muss Gl. (4.11) unabhängig von  $R_H$  sein. Als Konsequenz ergibt sich, dass die Proportionalitätskonstanten  $\chi_i$ , deren Inverse ein Maß für die Streuintensität  $I_{\text{Part},i}$  pro Partikel der Spezies  $i$  ( $i = 1-4$ ) sind, ebenfalls keine Radiusabhängigkeit enthalten.

Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass die  $A_{N,i}(t)$  trotz der Renormierung der Intensitäts-gewichteten  $c_{i,j}(R_H, t)$  in Anzahl-gewichtete Verteilungen  $c_{N,i}(R_H, t)$  nach wie vor von der mittleren Streuintensität  $I_{\text{Part},i}$  abhängen. Denn beim Übergang  $c_{i,j}(R_H, t) \rightarrow c_{N,i}(R_H, t)$  wurde lediglich der *geometrische Strukturfaktor* nicht jedoch der *atomare* (s. Abschnitt weiter oben: *Strukturfaktoren*) berücksichtigt.

Grundsätzlich bedeutet das für die drei Aggregatspezies: mit zunehmendem  $N_{\text{Mon}}^i$  erhöht sich gleichfalls  $A_{N,i}(t)$ , da dann in einem Partikel mehr Monomere enthalten sind, die das Licht streuen können; ferner muss gleichzeitig  $\chi_i$  kleiner werden, denn durch die Vergrößerung von  $N_{\text{Mon}}^i$  bzw. von  $A_{N,i}$  wurde die Zahl  $N_i(t)$  der Aggregate in keiner Weise berührt (beachte Gl. (4.11)).

Einsetzen von Gl. (4.11) in (4.10) ergibt

$$N_{\alpha S} = \sum_{i=1}^4 N_{\text{Mon}}^i \chi_i A_{N,i}(t) \quad (4.12)$$

Infolge der in Gl. (4.12) enthaltenen Zeitabhängigkeit kann (4.12), für die Gesamtheit der 32 Messtage plus Tag Null, als überbestimmtes lineares Gleichungssystem für die Determinierung der Koeffizienten  $\chi_i$  aufgefasst werden – es sind vier Parameter, die  $\chi_i$ , zu bestimmen, und es existieren 33 Gleichungen, für jeden Tag (auch für Tag Null)! Ein Fit dieses Gleichungssystems liefert somit die  $\chi_i$ . Der entsprechend notwendige Algorithmus wurde in eine Excel-VBA-Routine implementiert mit dem Konvergenzkriterium

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_{t=0d}^{32d} (N_{\alpha S} - N_{\alpha S}(t))^2}}{N_{\alpha S}} = \min, \quad \text{mit } N_{\alpha S} = \frac{\sum_{t=0d}^{32d} N_{\alpha S}(t)}{33} = 7,735 \cdot 10^{16}. \quad (4.13)$$

Die Konvergenz des Selbstkonsistenz-Verfahrens (SCF-Verfahren – *self consistent field*) wurde als erreicht angesehen, wenn  $|\sigma_{j+1} - \sigma_j| < 10^{-5}$  galt, mit j als dem Laufindex für die einzelnen Iterationsschritte. Abb. 4.38 zeigt den so erhaltenen Verlauf von  $N_{\alpha S}(t)$ .

Da keine Korrelation zwischen dem Graphen von  $N_{\alpha S}(t)$  und einer der vier Wichtungen  $c_{N,i}(t)$  der einzelnen Teilchensorten erkennbar ist, kann eine Scheinkonvergenz infolge des Dominierens der  $c_{N,i}(t)$  von einer Partikelsorte ausgeschlossen werden. Als finaler Test wurde schließlich noch nach bereits erreichter Konvergenz sukzessiv jeder der vier gefitteten Parameter  $\chi_i$  stark verändert und ein erneutes SCF-Verfahren angeschlossen. Hierbei wurde stets der ursprüngliche Parameterwert wieder erhalten.

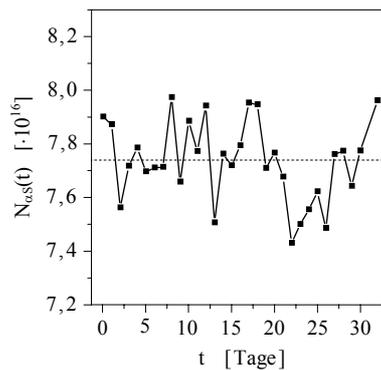


Abbildung 4.38: Sich nach Gl. (4.12) ergebende Gesamtzahl  $N_{\alpha S}(t)$  aller  $\alpha$ S-Moleküle bei Konvergenz des SCF-Verfahrens zur Berechnung der Parameter  $\chi_i$ , mit  $i = 1, 2, 3, 4$  im *Modell mit zeitlich invariantem Radius* (s. nächste Seite). Zusätzlich ist der Mittelwert  $N_{\alpha S}$  (gemittelt über die Zeit) als gestrichelte Linie eingezeichnet.

Bisher nicht erwähnt wurde, dass für die Durchführbarkeit des SCF-Verfahrens prinzipiell zwei Voraussetzungen erfüllt sein müssen. Sowohl die  $N_{\text{Mon}}^i$  als auch die  $\chi_i$  müssen zeitlich invariant sein. Inwieweit beide Annahmen gerechtfertigt sind, wird in der Diskussion in Kap. 4.1.8 – *Intrinsische Struktur­dynamik der Aggregate* – näher ausgeführt.

Da nicht mit letzter Gewissheit angegeben werden kann, ob die Streuintensität und eng damit zusammenhängend die Zahl der Monomere pro Aggregat für die ersten Tage und die sich daran anschließende Periode der DLS-Messserie in etwa gleich ist, wurden die  $A_{N,i}(t)$  auf zwei verschiedene Arten berechnet und sodann je ein SCF-Verfahren durchgeführt:

- **Modell mit zeitlich invariantem Radius**

Als erste Näherung kann die Renormierung der  $c_{i,i}(R_H, t)$  in die  $c_{N,i}(R_H, t)$  bei festgehaltenen Radiusverteilungen vorgenommen werden. Das heißt, in die Bestimmungsgleichungen der  $A_{N,i}(t)$  wird für alle  $t$  der in den letzten 10 Tagen jeweils messbare mittlere hydrodynamische Radius (Abb. 4.33) als  $R_H$ -Wert eingesetzt.

Dieses Modell liefert verlässliche Ergebnisse, wenn die mittlere Monomernzahl  $N_{\text{Mon}}^i$  pro Aggregat für jede der drei fibrillären Teilchenspezies sowohl in den ersten als auch in den folgenden Tagen etwa gleich ist, und wenn die Streuintensität in erster Näherung von den  $N_{\text{Mon}}^i$  abhängt und nur eine geringe Abhängigkeit vom Aufbau der Aggregate besitzt.

- **Modell mit zeitlich variablem Radius**

Falls dagegen die Dichte der Aggregate stets nahezu konstant ist, muss sich die Zahl der Monomere  $N_{\text{Mon}}^i$  pro Aggregat ( $i = 2, 3, 4$ ) während der Anfangszeit der  $\alpha$ S-Aggregation ändern. Für diesen Fall wurde die Renormierung der  $c_{i,i}(R_H, t)$  in die  $c_{N,i}(R_H, t)$  für die Verteilungen der Aggregate unter Verwendung zeitabhängiger mittlerer Radien durchgeführt.

Der Zeitverlauf des  $R_H$  der kleinen Protofibrillen wurde dabei durch zwei lineare Graphen entsprechend der in Abb. 4.33b) ersichtlichen Trajektorie genähert. Die  $R_H$ -Verläufe der anderen beiden großen Aggregatspezies wurden durch eine Exponentialfunktion gefittet, die auch in den Abbildungen 4.33c) & 4.33d) dargestellt sind. Für die Berechnung der  $c_{N,i}(t)$ , das heißt der Wichtungen für die Monomer-Verteilung wurde dagegen wiederum der mittels Gl. (4.7) erhaltene Radius eingesetzt.

Die Komplexität dieses Modells ist ferner gegenüber dem ersteren durch die Notwendigkeit der Anwendung zeitlich veränderlicher  $N_{\text{Mon}}^i$  erhöht. Für die Berechnung der  $N_{\text{Mon}}^i(t)$  ( $i = 2, 3, 4$ ) wurde erneut eine Aggregatdichte von  $\rho_{\text{Aggr}} = 1,3\text{g/cm}^3$  verwendet. Die Dicken  $d_i$  der fibrillären Aggregate wurden, wie stets, als konstant angenommen. Aus den gefitteten  $R_H$ -Verläufen konnten mittels Gleichung (2.95) die zeitlich veränderlichen Längen  $L_i(t)$  der Aggregate iterativ berechnet. Die Bestimmungsgleichung der  $N_{\text{Mon}}^i(t)$  lautet somit

$$N_{\text{Mon}}^i(t) = \frac{\rho_{\text{Aggr}} \cdot \pi d_i^2 L_i(t)}{4 M_{\alpha\text{S}} / N_A}, \quad i = 2, 3, 4. \quad (4.14)$$

Der Quotient  $M_{\alpha\text{S}}/N_A$  in Gl. (4.14) ergibt die Masse eines  $\alpha\text{S}$ -Moleküls. Allerdings muss die weiter oben erwähnte Abhängigkeit der  $\chi_i$  von  $N_{\text{Mon}}^i$  und damit auch von der Zeit nach wie vor unberücksichtigt bleiben.

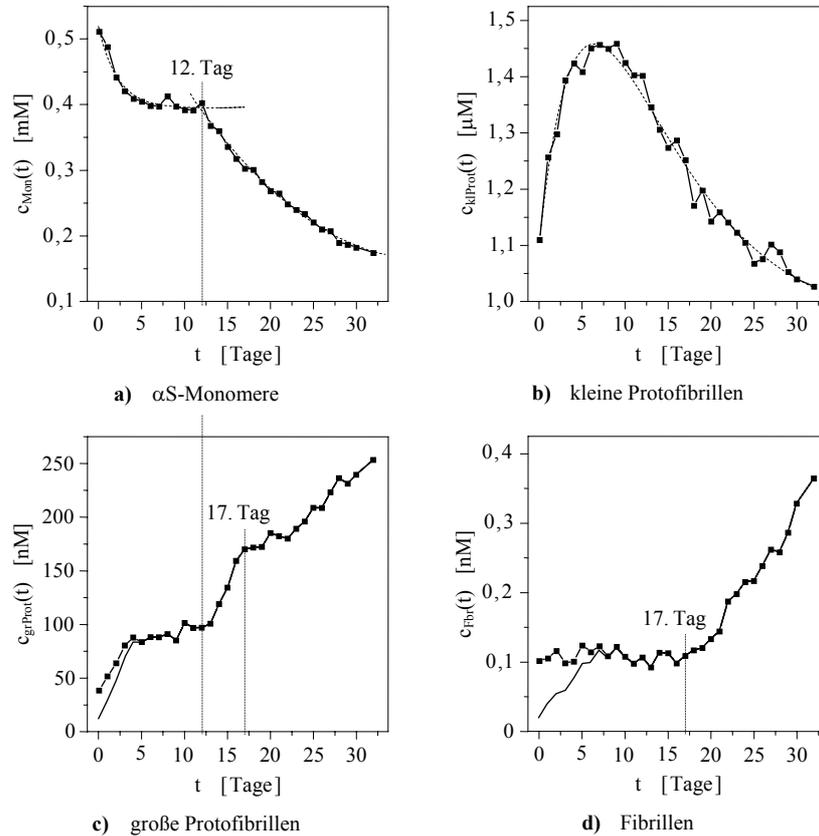


Abbildung 4.39: Zeitverlauf der molaren Konzentrationen der  $\alpha\text{S}$ -Monomer- sowie der 3 Aggregatspezies; berechnet unter der Annahme zeitlich konstanter Radien. In b) ist zudem der Fit von  $c_{\text{kilProt}}(t)$  entsprechend Gl. (4.23) dargestellt (s. Kap. 4.1.8). c) und d) enthalten zusätzlich die  $c_{\text{Aggr}}(t)$ -Verläufe bei Verwendung eines zeitlich variierenden  $R_H(t)$ .

In Abb. 4.39 sind die im *Modell mit zeitlich invariantem Radius* erhaltenen Konzentrationen des Monomers und der 3 Hauptaggregate gezeigt. Für die großen Protofibrillen sowie für die Fibrillen wurden darüber hinaus auch noch die unter Verwendung des *Modells mit zeitlich variablem Radius* bestimmten Konzentrationsverläufe dargestellt. Die angegebenen Werte für die 3 Aggregatspezies beziehen sich auf die Zahl  $N_i(t)$  ( $i = 2, 3, 4$ ) der vorhandenen Aggregatpartikel und nicht auf die Gesamtzahl der  $\alpha$ S-Monomere  $N_{\text{Mon}}^i \cdot N_i$ , die in einer Aggregatspezies integriert sind.

#### Bestimmung der Sekundärstruktur des $\alpha$ -Synucleins und der fibrillären Aggregate

Am Ende der 32-tägigen DLS-Messserie wurde ein CD-Spektrum der Probe gemessen (Abb. 4.40). In Übereinstimmung mit dem nach wie vor großen Anteil an freiem  $\alpha$ S (vgl. Abb. 4.39) und der Tatsache, dass der C-Terminus des Proteins in den fibrillären Aggregaten weitgehend ungefaltet ist, zeigt das CD-Spektrum Abb. 4.40 zeugt einen hohen *random coil*-Anteil der mittleren Sekundärstruktur aller in Lösung

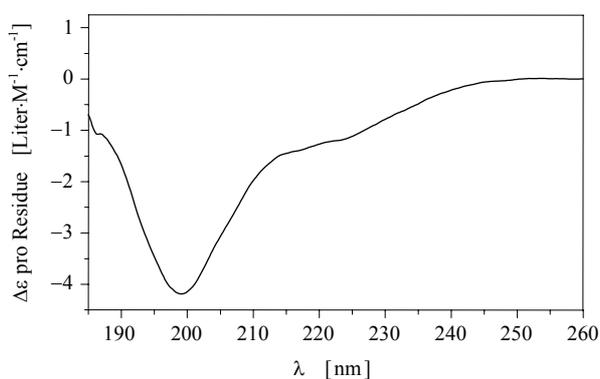


Abbildung 4.40: CD-Spektrum der aggregierten  $\alpha$ S-Lösung (1:100 mit Wasser verdünnt  $\rightarrow c_{\text{Protein}} = 6,42\mu\text{M}$ ) direkt nach der DLS-Messserie.

X [%]	Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Turn	<i>random coil</i>
$\alpha$ S-Lösung	4,0	15,0	11,0	70,0

Tabelle 4.10: Mit CDSSTR und Basissatz 7 von CDPro (s. Kap. 2.2.7) berechnete Sekundärstruktur-Anteile X aus dem in Abb. 4.40 gezeigten CD-Spektrum der gesamten aggregierten  $\alpha$ S-Lösung direkt vor der Separierung der Aggregate von den  $\alpha$ S-Monomeren über eine FPLC-Anlage.

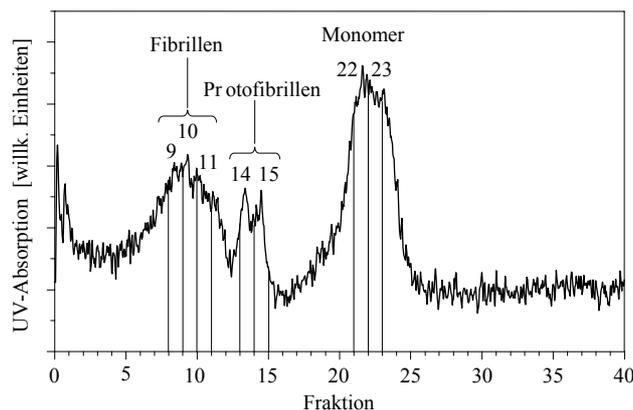


Abbildung 4.41: UV-Spektrum des Eluats der FPLC-Anlage bei der Trennung der 4 Partikelspezies, die in der aggregierten  $\alpha$ S-Lösung am Ende der DLS-Messserie enthalten waren. Zusammensetzung des Fließmittels:  $c_{\text{KCl}} = 100\text{mM}$ ,  $c_{\text{Phosphat}} = 20\text{mM}$  und  $\text{pH} = 7,2$ .

befindlicher Proteine (sowohl frei als auch aggregiert). Ein Fit dieses Spektrums quantifiziert die Strukturmerkmale des  $\alpha$ S durch die in Tab. 4.10 enthaltenen Werte.

Für eine detailliertere Analyse der Proteinfaltung der einzelnen Aggregatspezies wurden die 4 in den DLS-Experimenten gefundenen Partikelsorten in einer FPLC-Anlage voneinander separiert. Abb. 4.41 zeigt das UV-Spektrum des Eluats. Das Spektrum verifiziert die Trennung der  $\alpha$ S-Monomere, der Intermediate und der Fibrillen. Mit sämtlichen in Abb.4.41 deklarierten Fraktionen wurden CD-Messungen unmittelbar nach dem Säulenlauf sowie 5 Tage später durchgeführt. Die Abbildungen 4.42 & 4.43 enthalten für jede Partikelsorte je ein repräsentatives Spektrum. Die Analyse der Spektren erfolgte wiederum mittels CDPro<sup>[240,241]</sup> (Kap. 2.2.7). Die Tabellen 4.11 & 4.12 enthalten die von CDSSTR unter Benutzung des Basissatzes 7 von CDPro errechneten gemittelten Sekundärstrukturanteile. Die Mittelung fand, entsprechend der getroffenen Partikelklassifizierung (Abb. 4.40), für die Monomere über Fraktion 22 und 23 und für die Fibrillen über die 9–11 statt.

In Übereinstimmung mit Abb. 4.40 liegt das nicht-aggregierte Protein nach der FPLC-Separation nahezu ungefaltet in Lösung vor. Sämtliche Aggregatfraktionen dagegen enthalten ausgeprägte  $\beta$ -Faltblattanteile. Interessant in diesem Zusammenhang ist der Befund, dass die Fibrillen gegenüber den Intermediaten ca. 10% mehr Faltblattstruktur aufweisen. Dieser Befund kann auf die Kooperativität des Umfaltungsprozesses der einzelnen Proteine von einem eher ungeordneten in einen hoch geordneten Faltblatt-reichen Zustand zurückgeführt werden. Je mehr Monomere in einem Aggregat enthalten sind, desto stärker ist ihr gegenseitiger Einfluss aufeinander, was zu einer Erhöhung der Ordnung der inneren Aggregatstruktur führt. Durch

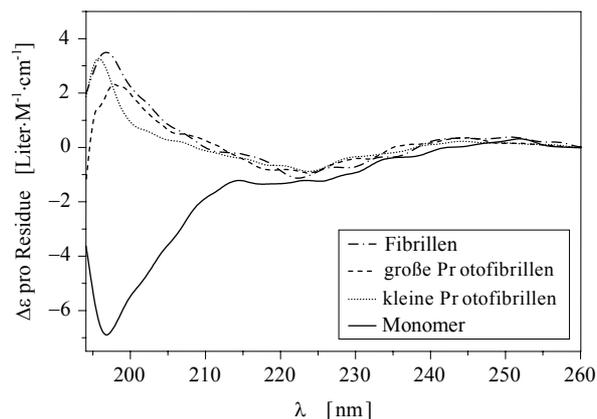


Abbildung 4.42: CD-Spektren des  $\alpha$ S-Monomers und der drei fibrillären Aggregate unmittelbar nach der Separierung der vier Partikelarten über eine FPLC-Anlage. Es wurden jeweils die in Abb. 4.41 näher gekennzeichneten Fraktionen gemessen und eine Spektrenmittelung entsprechend der getroffenen Partikelklassifizierung vorgenommen.  $c_{\alpha S}$  variierte zwischen 1,14 $\mu$ M und 1,26 $\mu$ M.

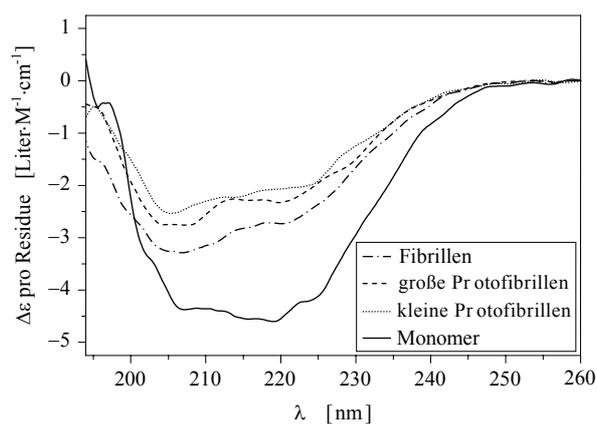


Abbildung 4.43: 5 Tage nach der Separierung des  $\alpha$ S-Monomers und der 3 fibrillären Aggregate aufgenommene CD-Spektren der 4 Partikelarten. Es wurden jeweils die in Abb. 4.41 näher gekennzeichneten Fraktionen gemessen und eine Spektrenmittelung entsprechend der getroffenen Partikelklassifizierung vorgenommen.  $c_{\alpha S}$  variierte zwischen 1,26 $\mu$ M und 1,48 $\mu$ M.

X [%]	Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Turn	<i>random coil</i>
Monomer	1,0	6,5	5,0	87,5
kleine Protofibrillen	3,0	34,0	22,0	41,0
große Protofibrillen	5,0	34,4	17,0	43,6
Fibrillen	2,3	46,5	20,5	30,7

Tabelle 4.11: Mit CDSSTR und Basissatz 7 von CDPro (s. Kap. 2.2.7) berechnete Sekundärstruktur-Anteile X des  $\alpha$ S-Monomers und der fibrillären Aggregate aus den CD-Spektren (Abb. 4.42), die unmittelbar nach dem FPLC-Säulenlauf (s. Text) gemessen wurden. Angabe der Mittelwerte für die in Abb. 4.41 jeweils einer Teilchenspezies zugeordneten Fraktionen.

X [%]	Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Turn	<i>random coil</i>
Monomer	26,0	9,5	13,0	51,5
kleine Protofibrillen	22,0	15,0	14,0	49,0
große Protofibrillen	23,0	14,0	15,0	48,0
Fibrillen	21,0	16,5	19,0	43,5

Tabelle 4.12: Mit CDSSTR und Basissatz 7 von CDPro (s. Kap. 2.2.7) berechnete Sekundärstruktur-Anteile X des  $\alpha$ S-Monomers und der fibrillären Aggregate aus den CD-Spektren (Abb. 4.43), die 5 Tage nach dem FPLC-Säulenlauf (s. Text) gemessen wurden. Angabe der Mittelwerte für die in Abb. 4.41 jeweils einer Teilchensorte zugeordneten Fraktionen.

die parallele Aneinanderlagerung der gefalteten Monomere werden die intermolekularen Anziehungskräfte zwischen den Monomeren verstärkt. Die damit verbundene Energieerniedrigung überwiegt die gleichzeitig stattfindende Verringerung der Entropie.

Überraschend ist die sich in den CD-Spektren widerspiegelnde Umfaltung des Proteins bei sämtlichen Fraktionen, die binnen 5 Tagen nach der Aggregatseparation stattfand. Am stärksten ist die helikale Ausbildung der Sekundärstruktur bei den beiden Monomer-Fraktionen ausgeprägt. Dagegen zeigen alle Aggregat-Lösungen eine Verringerung des Faltblattanteils zugunsten der Helixbildung und einer leichten Zunahme an *random coil*-Struktur.

### 4.1.8 Aggregations-Diskussion

#### *Strukturelle Änderungen der Aggregate*

Für die Berechnung der zeitabhängigen molaren Konzentrationen der vier Partikel-spezies: Monomer, kleine und große Protofibrillen sowie Fibrillen wurde angenommen, dass der Umrechnungsfaktor  $\chi_i$  zwischen der Fläche  $A_{N,i}$  unter einer Partikelverteilung und der zugehörigen Teilchenzahl  $N_i$  (vgl. Gl. (4.11)) für alle Messungen konstant ist. Das Inverse von  $\chi_i$  berücksichtigt die Abhängigkeit der Streuintensität vom inneren Aufbau eines Partikels.

Im *Modell mit zeitlich invariantem Radius* ( $N_{\text{Mon}}^i = \text{konst.}$ ; s. S. 166) bedeutet die Konstanz von  $\chi_i$ , dass die Aggregatstruktur, die sowohl durch die atomare Zusammensetzung als auch durch die Sekundär- und Tertiärstruktur der fibrillären Teilchen bestimmt wird, nur einen untergeordneten Einfluss auf  $\chi_i$  hat, während dieser Parameter in erster Linie durch die Zahl der Monomere, aus denen ein Partikel aufgebaut ist, bestimmt wird.

Das *Modell mit zeitlich veränderlichem Radius* setzt dagegen eine weitgehend konstante Dichte  $\rho_i$  – d.h. zeitlich invariante Sekundär- und Tertiärstruktur – für die einzelnen Aggregatspezies voraus und variiert stattdessen die Zahl  $N_{\text{Mon}}^i$  der Monomere pro Aggregat.<sup>39)</sup> In diesem Modell ist  $\chi_i$  in erster Näherung abhängig von  $\rho_i$ . Einflüsse von  $N_{\text{Mon}}^i$  auf  $\chi_i$  können hierbei nicht berücksichtigt werden. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass für hohe  $N_{\text{Mon}}^i$ -Werte das mittels des zweiten Modells bestimmte, zeitlich gemittelte  $\chi_i$  zu klein ist, und daher für die ersten Beobachtungstage der Aggregationskinetik zu niedrige  $N_i$  erhalten werden.

Die Frage, inwieweit sich die in beiden Modellen getroffenen Annahmen rechtfertigen lassen, soll im folgenden näher betrachtet werden:

- Einleitend sei festgestellt, dass zwischen der zeitlichen Entwicklung der Radien  $R_{H,i}(t)$  bzw. der Intensitätswichtungen  $c_{I,i}(t)$  für die vier Partikelspezies ( $i = 1, 2, 3, 4$ ) offenbar keine Korrelation existiert. Dies sollte daher, zumindest näherungsweise, auch für die Anzahl-gewichteten Verteilungen gelten.
- Aufgrund der zeitliche Konstanz der  $R_{H,i}(t)$  für die drei Aggregatspezies (mit  $i = 2, 3, 4$ ) nach den ersten 5–15 Tagen kann man annehmen, dass nach der anfänglichen strukturellen Äquilibration nicht nur die Größe der Teilchen sondern auch ihre mittlere Dichte  $\rho_i$  während des weiteren Fortgangs der DSL-Messserie etwa konstant bleibt. (Wäre dies nicht der Fall, müssten deutlichere Schwankungen in den Radiusverläufen beobachtet werden. Denn es ist als unwahrscheinlich anzusehen, dass sich exakt korreliert mit der Anlagerung bzw. Ablösung von Aggregat-Untereinheiten an ein fibrilläres Par-

<sup>39)</sup> Wenn die Dichte eines aus mehreren Untereinheiten, z.B. aus Proteinen, zusammengesetzten Teilchens konstant ist, sich jedoch seine Größe ändert, muss folglich die Zahl der Untereinheiten gleichfalls zu- bzw. abnehmen.

tikel gleichzeitig  $\rho_i$  gerade um soviel erhöht bzw. verringert, dass die mittlere Partikelgröße stets konstant bleibt.)

- Damit bleibt allerdings weiter die Frage bestehen, was innerhalb der ersten Tage der Aggregation passiert. Auffallend an den Intensitäts-gewichteten Verteilungsspektren in Abb. 4.29 & Abb. 4.31 ist die nahezu unmittelbar nach dem Auflösen des Proteins im Puffer vorliegende Population der drei Aggregatspezies. Am langsamsten bevölkert wird dabei die Spezies der großen Protofibrillen.

Die rasche Entwicklung dieser Initialpopulationen findet einerseits sicherlich ihren Ursprung in der Bildung kleinerer Oligomere und größere lockere Agglomerate während des Lyophilisierens des gereinigten Proteins vor Beginn der DLS-Serie. Diese Gebilde besitzen damit einen stark unstrukturierten Aufbau. Andererseits dürfte die anfänglich sehr hohe Proteinkonzentration ebenfalls ein treibender Faktor für die sich schnell bildende Grundpopulation der Aggregate sein. Besonders die Entwicklung der  $c_{i,i}(t)$  der Aggregate innerhalb der ersten 8–10 Stunden (s. Abb. 4.32) legt diese Annahme nahe.

Nach den Berechnungen der Partikelzahlen (Tab. 4.9) beinhaltet beispielsweise eine Fibrille  $30\text{--}50 \cdot 10^3$  Monomere, die vor der Aggregation ungefaltet in Lösung diffundieren, während sie in den Aggregaten zu 30–50% in einer antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegen (Tab. 4.11).<sup>[154]</sup> Die spontane, nicht-enzymatisch unterstützte, kooperative Umfaltung mehrerer zehntausend Proteine in weniger als zwei Stunden erscheint unwahrscheinlich.

- Ferner spiegelt die zeitliche Entwicklung der  $c_{N,i}(t)$  der „kleinen Protofibrillen“-Population im Fall eines *zeitlich veränderlichen Radius* nahezu exakt die  $R_H$ -Entwicklung dieser Spezies wider (Graph nicht abgebildet), mit einem linearen Anstieg innerhalb der ersten 13–14 Tage (vgl. Abb. 4.33) und einem nachfolgenden linearen Rückgang der Anzahl-gewichteten  $c_{klProf}(t)$ . Das deutet darauf hin, dass wenigstens eine der Grundannahmen, auf denen das Modell des *zeitlich veränderlichen Radius* basiert, fehlerhaft ist.

Resümierend legt die Summe der Befunde den Schluss nahe, dass die initialgebildeten Aggregate etwa die gleiche Monomerzahl  $N_{Mon}^i$  ( $i = 2, 3, 4$ ; für die drei Aggregatspezies) besitzen wie die nach dem Tag 15 vorliegenden Partikel. Die initiale  $R_H$ -Entwicklung geht demnach sehr wahrscheinlich auf eine Art Reifeprozess zurück, bei dem eine sukzessive Umfaltung der zunächst eher ungeordneten Aggregatuntereinheiten in eine kompakte, hoch geordnete Faltblatt-reiche Sekundärstruktur stattfindet.

Als interessante Konsequenz ergibt sich daraus, dass das Gleichgewicht zwischen Anlagerungs- und Ablösungsrate der Monomere an bereits gebildete Aggregate im Fall der  $\alpha$ S-Aggregation weniger von der Sekundär- und Tertiärstruktur der Aggregate als vielmehr von der Zahl der in ein Aggregat integrierten Monomere abhängen sollte. Berücksichtigt man, dass der C-Terminus der  $\alpha$ S-Moleküle selbst in den dicht

gepackten fibrillären Aggregaten weitgehend ungefaltet bleibt,<sup>[154]</sup> erscheint diese Feststellung durchaus verständlich. Dass dieses Gleichgewicht tatsächlich existiert, zeigt sich u.a. in der Konstanz der Radien ab Tag 5–15 (abhängig von der Aggregat-spezies). Würde ein solches Gleichgewicht nicht vorherrschen, sollte der Radius zumindest von der Fibrillenspezies stetig anwachsen. Dies wird jedoch nicht beobachtet.

#### *Aggregatzerfall & spontane Helixfaltung*

Die Existenz des Gleichgewichts zwischen Anlagerung und Ablösung von Monomeren bzw. kleineren Agglomeraten von den größeren Aggregaten zeigt sich gleichfalls in den CD-Spektren, die am Ende der Aggregationsbeobachtung durchgeführt wurden (Abb. 4.42 & 4.43, sowie Tab. 4.11 & 4.12). Bei diesen ist ein partieller Zerfall der Aggregate im Lauf von 5 Tagen nach der Säulentrennung der verschiedenen Teilchenspezies zu beobachten, der sich durch eine Erhöhung des Anteils an helikaler und *random coil*-Struktur bei gleichzeitiger Verringerung von  $\beta$ -Faltblatt bemerkbar macht.

Da bisher in den  $\alpha$ S-Aggregaten keine Helixfaltung gefunden wurde,<sup>[318-321]</sup> und das Protein im nicht-aggregierten, ungebundenen Zustand ungefaltet vorliegt, bzw., gemäß den Ausführungen in Kap. 4.1.5 (*Spontane Faltung*), in einer partiellen helikalen Konformation auftreten kann, lässt sich die binnen 5 Tagen erfolgte Änderung in der Sekundärstruktur nur auf eine teilweise Auflösung der Aggregate zurückführen.

Verstanden werden kann dieser Befund durch Berücksichtigung der Entleerung des  $\alpha$ S-Monomerpools in den Aggregatfraktionen während der Säulentrennung. Dadurch wurde das Gleichgewicht zwischen Anlagerung und Ablösung gestört, weshalb zur Wiederherstellung desselben die Aggregate teilweise zerfallen sind. Die Experimente bestätigen überdies erneut die in Kap. 4.1.5 (*Spontane Faltung*) dargelegten Beobachtungen bzgl. der spontanen Ausbildung einer helikalen Partialstruktur in hoch verdünnten  $\alpha$ S-Lösungen.

#### *Geometrie der großen Protofibrillen*

Die bei der Aggregation des  $\alpha$ S sich entwickelnden fibrillären Aggregate können aufgrund ihrer prolaten Geometrie<sup>[314,315]</sup> nicht mehr als Sphären behandelt werden (vgl. Abb. 4.34 & 4.35). Man benötigt daher mindestens zwei voneinander unabhängige Dimensionsvariablen, um die stäbchenförmige Struktur der Teilchen in einer realistischen Weise beschreiben zu können. Da allerdings DLS nur eine Größendimension, den hydrodynamischen Radius  $R_H$ , gelöster Teilchen bestimmen kann, muss einer der beiden Parameter als bekannt in die Auswertung der Messdaten eingehen. In der Literatur finden sich Angaben über die Dicken kleiner Protofibrillen<sup>[314]</sup> sowie der Fibrillen.<sup>[315]</sup> Über die großen Protofibrillen existieren jedoch keine Daten. Um dennoch eine detaillierte quantitative Auswertung durchführen zu können, musste die Dicke der großen Intermediate abgeschätzt werden.

Aus den in Tab. 4.8 angegebenen Dicken und Längen der Aggregate ergibt sich für die kleinen Protofibrillen ein Achsenverhältnis von  $p = 20$  bzw. für die Fibrillen von  $p = 35$ . Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass sich  $p$  für die großen Intermediate im gleichen Bereich bewegt. Prinzipiell sind allerdings 3 Arten des Fibrillenwachstums denkbar:

1. Die großen Protofibrillen entstehen hauptsächlich durch eine End-zu-End-Anlagerung der kleinen Intermediate, wodurch sehr lange dünne Gebilde entstehen. Im dritten Aggregationsschritt lagern sich diese fadenförmigen Partikel parallel aneinander und bilden so Fibrillen. Die Stabilität der großen Protofibrillen würde in diesem Fall das Längenwachstum limitieren. Berücksichtigt man die in Abb. 4.34 gezeigte Struktur der kleinen Protofibrillen, erscheint allerdings eine End-zu-End-Adsorption der teilweise aufgespleisten kleinen Intermediate als unwahrscheinlich.
2. Es herrscht ein gleichmäßiges Dicken- und Längenwachstum vor, sowohl bei der Bildung der großen Protofibrillen als auch der Fibrillen.
3. Die großen Protofibrillen werden in erster Linie durch eine parallele Nebeneinanderlagerung der kleinen Intermediate gebildet, das heißt, das Dickenwachstum ist in diesem Aggregationsschritt dominierend. Bei der anschließenden Bildung von Fibrillen dominiert dagegen das Längenwachstum. Es ist allerdings nicht verständlich, warum zunächst kaum eine Verlängerung der Aggregate stattfinden sollte, die im Anschluss daran die Aggregatbildung sogar dominieren würde.

Zusammenfassend erscheint die simultane Dicken- und Längenvergrößerung für beide Prozesse, die Bildung der großen Protofibrillen, ebenso wie diejenige der Fibrillen am wahrscheinlichsten. Unter dieser Voraussetzung ergibt sich die Dicke der großen Intermediate zu  $d_{\text{grProt}} = 11 \pm 1 \text{ nm}$ .<sup>40)</sup>

#### *Quantitatives Aggregationsmodell*

Die Behandlung der Aggregationskinetik des  $\alpha$ S erfolgt unter der Annahme, dass die Aggregationsraten  $k_{i \rightarrow f}$  unabhängig von der momentan vorherrschenden Teilchenzahl in den Partikelspezies  $i$  und  $f$  sind. Daraus ergibt sich eine Zeitunabhängigkeit der Aggregationsraten.  $k_{i \rightarrow f}$  bestimmt den Prozentsatz aller in der Spezies  $i$  aktuell vorhandenen Teilchen, der pro Tag durch Aggregation zu Partikeln der Spezies  $f$  verloren geht.

<sup>40)</sup> Im Fall eines gleichmäßigen Dicken- und Längenwachstums lässt sich die Dicke einer großen Protofibrille schreiben als  $\eta \cdot d_{\text{klProt}} = d_{\text{grProt}}$ , mit  $\eta$  als Proportionalitätsfaktor. Für die Dicke einer Fibrille gilt dann ebenso  $\eta \cdot d_{\text{grProt}} = d_{\text{Fbr}}$ . Das Einsetzen beider Gleichungen ineinander liefert:

$$\eta^2 \cdot d_{\text{klProt}} = \eta \cdot d_{\text{grProt}} = d_{\text{Fbr}}$$

Da  $d_{\text{klProt}}$  und  $d_{\text{Fbr}}$  bekannt sind, lässt sich  $\eta$  bestimmen und nachfolgend  $d_{\text{grProt}}$  berechnen.

Die effektive, durch Aggregationsprozesse hervorgerufene Verlustrate einer Spezies  $i$  lautet somit

$$k_{\text{eff},i} = \sum_{j>i}^4 k_{i\#j} \quad (4.15)$$

Grundsätzlich sind bei Aggregationskinetiken stets auch die Zerfallsraten der Aggregate in die Prozess-beschreibenden Differentialgleichungen einzubeziehen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Aggregate zumindest über einen Zeitraum von etwa einem Tag weitgehend stabil sind, und so die Aggregationsraten deutlich größer sind als die Zerfallsraten, weshalb diese im weiteren nicht mit berücksichtigt werden.

In einer ersten Näherung wird angenommen, dass die  $\alpha$ S-Monomere ausschließlich zu kleinen Protofibrillen aggregieren, diese wiederum alleinig zu großen Intermediaten und nur letzt-genannte sich weiter zu Fibrillen zusammenlagern. Außerdem sollen in den Differentialgleichungen (DGL) Grenzkonzentrationen  $c_{\text{cr}}^i$  für die einzelnen Aggregationsschritte mit berücksichtigt werden, unterhalb derer keine weitere Aggregation der jeweiligen Spezies  $i$  stattfindet. Für die  $\alpha$ S-Monomerspezies wurde  $c_{\text{cr}}$  bereits experimentell zu knapp 1mg/ml ermittelt.[322]. Für die Bestimmung der Teilchenzahlen  $N_i(t)$  in den Partikelpools 1 bis 4 sind somit 4 gekoppelte partielle DGL zu lösen

$$\frac{\partial N_1(t)}{\partial t} = -k_{1\#2} (N_1(t) - N_{1/2,\text{cr}}), \quad (4.16)$$

$$\frac{\partial N_2(t)}{\partial t} = -k_{2\#3} (N_2(t) - N_{2/3,\text{cr}}) + \frac{1}{N_{1\#2}} \frac{\partial N_1(t)}{\partial t}, \quad (4.17)$$

$$\frac{\partial N_3(t)}{\partial t} = -k_{3\#4} (N_3(t) - N_{3/4,\text{cr}}) + \frac{1}{N_{2\#3}} \frac{\partial N_2(t)}{\partial t}, \quad (4.18)$$

$$\frac{\partial N_4(t)}{\partial t} = \frac{1}{N_{3\#4}} \frac{\partial N_3(t)}{\partial t}, \quad (4.19)$$

wobei die kleinen Protofibrillen durchschnittlich aus  $N_{1\#2}$  Monomeren bestehen, die größeren aus  $N_{2\#3}$  kleinen Intermediaten und die Fibrillen letztlich aus  $N_{3\#4}$  großen Protofibrillen gebildet werden.  $N_{i/k,\text{cr}}$  – mit  $i = 1, 2, 3$  und  $k = 2, 3, 4$  – definiert die für eine Aggregation der Spezies  $i$  zur Spezies  $k$  notwendige kritische Partikelzahl der Spezies  $i$ . Die 4 DLG können mittels der Randbedingungen

$$N_i(t=0) = N_{i,0}, \quad \text{mit } i = 1, 2, 3, 4 \quad (4.20)$$

und

$$N_i(t \rightarrow \infty) = N_{i/i+1,\text{cr}}, \quad \text{mit } i = 1, 2, 3 \quad (4.21)$$

geschlossen gelöst werden. Man erhält **für den Monomerpool**

$$\begin{aligned} N_1(t) &= (N_{1,0} - N_{1/2,cr}) \cdot e^{-k_{1\#2} \cdot t} + N_{1/2,cr} \\ &= N_{1,0}^{red} \cdot e^{-k_{1\#2} \cdot t} + N_{1/2,cr} \end{aligned} \quad , \quad \text{mit } N_{1,0}^{red} = N_{1,0} - N_{1/2,cr}; \quad (4.22)$$

**für die kleinen Protofibrillen**

$$N_2(t) = \underbrace{(N_{2,0}^{red} + k_{1,eff}^{(2)}) e^{-k_{2\#3} \cdot t}}_{\text{Verlustterm}} - \underbrace{k_{1,eff}^{(2)} e^{-k_{1\#2} \cdot t}}_{\text{Bildungsterm}} + N_{2/3,cr} \quad , \quad (4.23)$$

mit 
$$k_{1,eff}^{(2)} = \frac{k_{1\#2}}{k_{2\#3} - k_{1\#2}} \frac{N_{1,0}^{red}}{N_{2\#3}};$$

**für die großen Protofibrillen**

$$N_3(t) = \left[ N_{3,0}^{red} + (k_{2,eff}^{(3)} - k_{1,eff}^{(3)}) \right] e^{-k_{3\#4} \cdot t} - \left( k_{2,eff}^{(3)} e^{-k_{2\#3} \cdot t} - k_{1,eff}^{(3)} e^{-k_{1\#2} \cdot t} \right) + N_{3/4,cr} \quad , \quad (4.24)$$

mit 
$$k_{1,eff}^{(3)} = \frac{k_{1\#2}}{k_{3\#4} - k_{1\#2}} \frac{k_{1,eff}^{(2)}}{N_{2\#3}} \quad \text{und} \quad k_{2,eff}^{(3)} = \frac{k_{2\#3}}{k_{3\#4} - k_{2\#3}} \frac{N_{2,0}^{red} + k_{1,eff}^{(2)}}{N_{2\#3}};$$

**und für die Fibrillen**

$$N_4(t) = N_{4,0} + \left[ k_{3,eff}^{(4)} e^{-k_{3\#4} \cdot t} - \left( k_{2,eff}^{(3)} e^{-k_{2\#3} \cdot t} - k_{1,eff}^{(3)} e^{-k_{1\#2} \cdot t} \right) \right], \quad (4.25)$$

mit 
$$k_{3,eff}^{(4)} = \frac{N_{3,0}^{red} + (k_{2,eff}^{(3)} - k_{1,eff}^{(3)})}{N_{2\#3}}.$$

$N_{i,0}^{red}$  gibt die reduzierte Partikelzahl an, das heißt die tatsächlich für eine Aggregation zur Verfügung stehenden Teilchen (s. Gl. (4.22)). Die Parameter  $k_{i,eff}^{(i)}$  sind effektive Zerfalls- bzw. Bildungsraten. (Beachte: Die  $k_{i,eff}^{(i)}$  sind nicht mit den in Gl. (4.15) angegebenen  $k_{eff,i}$  identisch!)

Gl. (4.23) erfasst auch die beiden Grenzfälle  $k_{1\#2} = 0$  bzw.  $k_{2\#3} = 0$ , das heißt, wenn keine kleinen Protofibrillen mehr gebildet werden, bzw. diese sich nicht weiter zu größeren Aggregaten formieren. Die Termbezeichnungen in Gl. (4.23) kennzeichnen die Funktionsstruktur der  $N_i(t)$ . Der *Bildungsterm* spezifiziert die Zahl der durch Aggregation der jeweils kleineren Spezies täglich entstehenden Partikel, weshalb  $N_1(t)$  keinen Bildungsterm enthält. Der *Verlustterm* gibt die Zahl der Teilchen an, die durch eine weitere Aggregation aus dem Partikelpool einer Spezies verloren gehen.

Der entsprechend Gl. (4.23) durchgeführte Fit für die Konzentration der kleinen Protofibrillen  $c_{klPro}(t)$  mittels des Marquadt-Levenberg-Algorithmus<sup>[323,324]</sup> ist in Abb. 4.39b) mit gezeigt. Abb. (4.39b) zeigt die Dominanz des *Bildungsterms* innerhalb der ersten 5 Tage. Ab Tag 10 überwiegt dann allerdings der *Verlustterm* aufgrund der Verringerung von  $N_1(t)$  und der Zunahme von  $N_2(t)$ .

Betrachtet man den in Abb. 4.39a) gezeigten Verlauf von  $c_{Mon}(t)$ , ist ein exponentieller Zerfall, wie ihn Gl. (4.22) vorgibt, nur innerhalb der ersten 12 Tage erkennbar. Für die gesamte weitere Aggregationsdauer schließt sich jedoch eine eher lineare Degression von  $c_{Mon}(t)$  an. Korreliert damit beginnt zeitgleich die Population der großen Intermediate stark zuzunehmen. Es scheint daher zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der Aggregationskinetik stattzufinden, die zunächst primär nicht durch die kleinen Protofibrillen oder die Fibrillen beeinflusst wird sondern einer Kopplung des  $\alpha$ S-Monomerpool mit den großen Protofibrillen entspringt. Da ungefähr ab dem 12. Tag  $c_{grProt}(t)$ , korreliert mit einer stärkeren Verringerung von  $c_{Mon}(t)$ , signifikant wächst, ist ab diesem Zeitpunkt auf eine Anlagerungsaggregation von Monomeren an bereits gebildete kleinere Intermediate zu schließen. Dass es sich hierbei in der Tat um eine Monomer-Aggregat-Adsorption handeln muss, wird klar, wenn man bedenkt, dass eine Monomer-Monomer-Aggregation nach wie vor zur Bildung kleiner Intermediate führen würde. Es ist wahrscheinlich, dass nicht nur große Protofibrillen durch eine Anlagerungsaggregation entstehen sondern ebenso auch Fibrillen. Die DGL (4.22), des Monomerpool, wird daher folgendermaßen erweitert:

$$\begin{aligned} \frac{\partial N_1(t)}{\partial t} = & -k_{1\#2} (N_1(t) - N_{1/2,cr}) \\ & + \begin{cases} -k_{1\#3} N_3(t), & \text{für } N_1(t) > N_{1/3,cr} \\ 0, & \text{für } N_1(t) \leq N_{1/3,cr} \end{cases} \\ & + \begin{cases} -k_{1\#4} N_4(t), & \text{für } N_1(t) > N_{1/4,cr} \\ 0, & \text{für } N_1(t) \leq N_{1/4,cr} \end{cases} \end{aligned} \quad (4.26)$$

Da ad hoc keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die für eine Aggregation notwendige kritische Grenzpartikelzahl für die Monomer-Monomer-Aggregation gleich derjenigen für die Monomer-Aggregat-Adsorption ist, wurden in Gl. (4.26) unterschiedliche  $N_{1/k,cr}$  eingeführt. Die beiden DGL (4.24) und (4.25) der zwei großen Partikelspezies erweitern sich für  $N_1(t) > N_{1/3,cr}$  bzw.  $N_1(t) > N_{1/4,cr}$  somit zu

$$\frac{\partial N_3(t)}{\partial t} = -k_{3\#4} (N_3(t) - N_{3/4,cr}) + \frac{1}{N_{2\#3}} \frac{\partial N_2(t)}{\partial t} + \frac{1}{N_{1\#3}} k_{1\#3} N_3(t); \quad (4.27)$$

$$\frac{\partial N_4(t)}{\partial t} = \frac{1}{N_{3\#4}} \frac{\partial N_3(t)}{\partial t} + \frac{1}{N_{1\#4}} k_{1\#4} N_4(t). \quad (4.28)$$

Das so aufgestellte partielle Differentialgleichungssystem bestehend aus den Gleichungen (4.26)–(4.28) sowie (4.17) ist nicht mehr geschlossen lösbar, da  $N_3(t)$ , ebenso wie  $N_4(t)$  indirekt über  $N_2(t)$  von  $N_1(t)$  abhängen. Änderungen von  $N_1(t)$  werden allerdings gleichzeitig auch wieder von  $N_3(t)$  und  $N_4(t)$  bedingt.

#### *Diskussion der Aggregationsdynamik*

Der in Abb. 4.39b) dargestellte Konzentrationsverlauf  $c_{klProt}(t)$  weist keine sprunghaften Änderungen wie die anderen drei Verläufe auf. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Komplettierung von *Fibrillen* durch Adsorption kleiner Protofibrillen an größere Intermediate für die gesamte Beobachtungsdauer vernachlässigbar gegenüber  $k_{2\#3}$  ist. Das liegt wahrscheinlich an der niedrigen, im Vergleich zu  $c_{Mon}(t)$  um einen Faktor 500 geringeren Konzentration der kleinen Intermediate, womit während der gesamten DLS-Serie gelten dürfte:  $N_2(t) < N_{2/4,cr}$ .

Die sprunghafte Änderung im Verlauf von  $c_{Mon}(t)$  am 12. Tag korreliert mit einer drastischen Zunahme von  $c_{grProt}(t)$ , während  $c_{Fibr}(t)$  weiterhin konstant bleibt. Demnach wird im Zeitintervall von Tag 12–17 die Aggregation des  $\alpha$ S hauptsächlich durch eine Monomer-Aggregat-Adsorption bestimmt, die zu dem starken Anstieg von  $c_{grProt}(t)$  führt. Bei diesem Aggregationsprozess dient die *Aggregation der kleineren Protofibrillen* vermutlich als *Keimbildung*, und die daraufhin stattfindende Anlagerung der Monomere an die *initialen Agglomerate* liefert sodann den Hauptbeitrag zur Reifung der größeren Intermediate. Ab Tag 17 ist offenbar die für die Grenzkonzentration  $c_{3,cr}$  bzw. die Mindestpartikelzahl  $N_{3/4,cr}$  für die weiterführende Aggregation der großen Protofibrillen erreicht. Infolge des jetzt zeitgleich stattfindenden, durch  $k_{3\#4}$  bestimmten Aggregationsprozesses verlangsamt sich die Zunahme von  $c_{grProt}(t)$ . Möglicherweise deutet sich im Anstieg der Fibrillen-Konzentration (Abb. 4.39d)) zwischen dem 17. und 32. Tag eine exponentielle Zunahme von  $c_{Fibr}(t)$  an. Die Güte der Daten erlaubt allerdings keine verlässliche Aussage diesbezüglich.

Es sei noch bemerkt, dass die hier gefundenen absoluten Werte der Zeitabhängigkeiten sicher nicht allgemein-gültig für jede  $\alpha$ S-Aggregation sind, da sowohl der zeitliche Beginn als auch die Längen der verschiedenen Zeitabschnitte von der Anfangskonzentration  $c_{\alpha S}(t=0)$  abhängen dürften. Diese bestimmt, ob im Lauf der Aggregation eine Anlagerungs-Aggregation stattfindet, und inwieweit sich größere Aggregate bilden können.

Aus der mittleren Zahl der Monomere pro Aggregat, sowie aus den Längen der drei Aggregatformen kann für die großen Protofibrillen und für die Fibrillen die mittlere Zahl der Subaggregate bestimmt werden, die sich nebeneinander lagern und so eine *Untereinheit* des jeweils größeren Partikels bilden, wie in Abb. 4.44 dargestellt. Als Subaggregate sind dabei die Teilchen der nächst-kleineren Aggregatform zu verstehen; für Fibrillen wären dies also die großen Intermediate.

Der Grund für die Anwendung dieses Modell geht auf die Annahme zurück, dass die Aggregate nach Ausbildung der Falblattstruktur in Richtung der Fibrillenachse na-

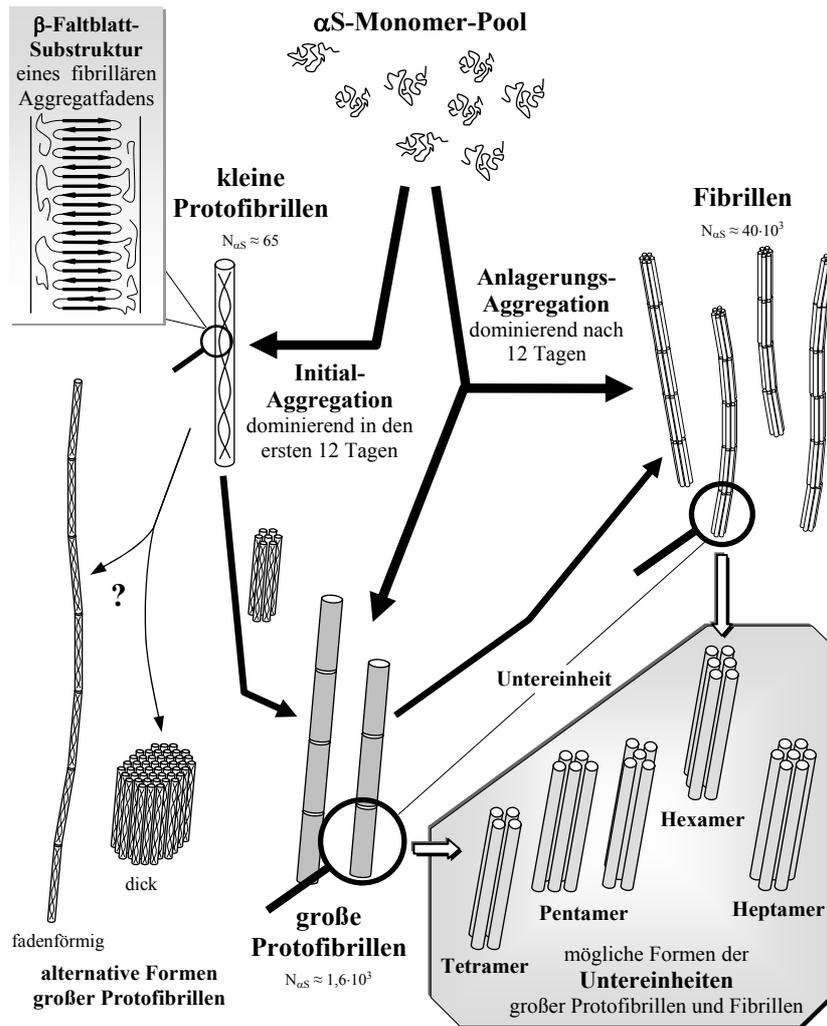


Abbildung 4.44: Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Synuclein-Aggregationskinetik. Die kleinen Protofibrillen bestehen aus zwei umeinander gewundenen dünnen Aggregatfäden (vgl. Abb. 4.34),<sup>[154]</sup> deren intrinsischer Aufbau nach [154] links oben vergrößert dargestellt ist. Links unten sind die beiden möglichen, jedoch unwahrscheinlichen Grenzformen der großen Protofibrillen gezeigt (s. Text); rechts daneben mögliche Strukturen der Fibrillenschichten. Die vom  $\alpha$ S-Monomerpool ausgehenden dicken Pfeile symbolisieren die Aggregationswege des freien Monomers.

hezu inkompressibel sind. Das Längenwachstum lässt sich dann bei Anlagerung mehrerer Subaggregate sehr genau vorhersagen. Demgegenüber ist die Abschätzung des Dickenwachstums deutlich schwieriger. Der Grund hierfür liegt darin, dass auch in den Aggregaten ein Teil der Proteinsequenz ungefaltet vorliegt. Die Kompressibilität dieser neben den Faltblättern befindlichen Randbereiche ist nicht abschätzbar.

Aus den in Tab. 4.8 zusammengefassten mittleren Längen der drei Aggregatspezies nebst den in Tab. 4.9 spezifizierten Monomerzahlen pro Aggregat ergibt sich eine Zusammensetzung der beiden großen Aggregatspezies aus jeweils 3–4 *Untereinheiten*, die wiederum aus ca. 7 *Subaggregaten* bestehen. Abb. 4.44 fasst das Aggregationsmodell von  $\alpha$ S noch einmal schematisch zusammen.

#### *Aggregations-Grenzkonzentration*

Nach der eben geführten Diskussion der Aggregationsdynamik beruht die Bildung der fibrillären Aggregate offenbar auf 2 verschiedenen Mechanismen, der initialen Monomer-Monomer-Adsorption und der später dominierenden Monomer-Aggregat-Anlagerung. Die zeitliche Entwicklung von  $c_{\text{Mon}}(t)$  erlaubt für beide Prozesse eine Abschätzung der Grenzkonzentrationen  $c_{\alpha\text{S},\text{cr}}$  unterhalb derer die  $\alpha$ S-Aggregation über den jeweiligen Mechanismus nicht mehr stattfindet, d.h. zum Stillstand kommt.

Während der ersten 12 Tage wird  $c_{\text{Mon}}(t)$  durch die zu kleinen Protofibrillen führende Monomer-Monomer-Aggregation bestimmt (vgl. Abb. 4.39). Dabei beschreibt Gl. (4.24) die zeitliche Entwicklung von  $c_{\text{Mon}}(t)$ . Als Grenzkonzentration liefert ein Exponentialfit von  $c_{\text{Mon}}(t)$  für  $t \in [0\text{d}, 12\text{d}]$   $c_{\alpha\text{S},\text{cr}} = 5,7\text{mg/ml}$ .

Zur Ermittlung von  $c_{\alpha\text{S},\text{cr}}$  für die Monomer-Aggregat-Anlagerung wird zunächst der Verlauf von  $c_{\text{grProt}}(t)$  und  $c_{\text{Fbr}}(t)$  betrachtet (s. Abb. 4.39), der bei beiden Aggregatzuständen nach dem Tag 21 nahezu linear erscheint. Unter der Voraussetzung, dass in diesem Zeitbereich – Tag 22–32 – die Monomer-Aggregat-Adsorption tatsächlich den Aggregationsprozess dominiert, lässt sich die Kinetik von  $N_{\text{Mon}}(t)$  auf die beiden letzten Terme in (4.28) reduzieren. Da  $c_{\alpha\text{S}}(t)$  für den Gleichgewichtszustand zwischen Anlagerung und Ablösung von Monomeren an bzw. von Aggregatpartikeln bestimmt werden soll, sind die Zerfallsraten der Aggregate nicht länger vernachlässigbar. Man erhält daher näherungsweise folgende Differentialgleichung für  $N_{\text{Mon}}(t)$

$$\begin{aligned} \frac{\partial N_{\text{Mon}}(t)}{\partial t} &\cong -k_{\text{Mon}\#\text{grProt}} N_{\text{grProt}}(t) - k_{\text{Mon}\#\text{Fbr}} N_{\text{Fbr}}(t) \\ &\quad + k_{\text{grProt}\#\text{Mon}} N_{\text{grProt}}(t) + k_{\text{Fbr}\#\text{Mon}} N_{\text{Fbr}}(t) \quad \text{mit } t \in [22\text{d} - 32\text{d}], \quad (4.31) \\ &= a + b \cdot t \end{aligned}$$

deren Lösung

$$N_{\text{Mon}}(t) = N_{\text{Mon},\text{cr}} + a \cdot t + \frac{1}{2} b \cdot t^2, \quad t \in [22\text{d} - 32\text{d}] \quad (4.32)$$

die kritische Grenzpartikelzahl  $N_{\text{Mon,cr}}$  enthält. Das Fitten von  $c_{\text{Mon}}(t)$  innerhalb des Zeitbereichs von Tag 22–32 mittels einer Polynomfunktion 2. Ordnung liefert als Grenzkonzentration  $c_{\alpha\text{S,cr}} = 75\mu\text{M} = 1,1\text{mg/ml}$ , die nach 61 Tagen erreicht sein sollte. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem von Wood et al. [322] erhaltenen überein ( $c_{\alpha\text{S,cr}} \approx 0,9\text{mg/ml}$ ). Bei Variation des Fitbereichs für  $c_{\text{Mon}}(t)$  zwischen Tag 12 und 22 ergaben sich stets Werte von 1,5–2,9mg/ml. Unter Berücksichtigung der in diesem Zeitfenster erkennbaren Diskontinuitäten in den Konzentrationsverläufen  $c_{\text{grProt}}(t)$  und  $c_{\text{Fbr}}(t)$  sind diese Schwankungen als eher gering einzustufen.

Es ist nicht zu erwarten, dass die Aggregation der Intermediate zu Fibrillen zeitgleich mit dem Erreichen der Grenzkonzentration  $c_{\alpha\text{S,cr}}$  zum Erliegen kommt. Vielmehr wird diese vermutlich noch über einen gewissen Zeitraum weiter stattfinden.

Die für den Anlagerungsprozess ermittelte kritische Grenzkonzentration, die deutlich größer als Null ist, stützt die Existenz eines Gleichgewichts zwischen der Anlagerung und Ablösung einzelner Proteine an bzw. von bereits bestehenden Aggregaten. Andernfalls wären nach einer gewissen Zeit schließlich mehr oder weniger sämtliche Monomere in die vorhandenen Aggregate integriert.

Schlussfolgernd bedeutet das gleichzeitig, dass bei Unterschreiten der kritischen Anlagerungs-Grenzkonzentration die Aggregate langsam wieder zerfallen, bis  $c_{\alpha\text{S,cr}}$  wieder erreicht ist; was sich auch am Ende der DLS-Messerie in den CD-Messungen bestätigte (vgl. Abb. 4.42 & 4.43). Mit welcher Gleichgewichtskonstante ein solcher bisher nicht beobachteter Prozess stattfindet, lässt sich allerdings nicht abschätzen. Immerhin dient dieser Befund als Hinweis, dass die in [146] beschriebene Stabilität der *in vivo* gefundenen Fibrillen durch kovalente Verknüpfungen der Monomere bzw. durch Einlagerungen anderer Substanzen hervorgerufen wird.

#### *Mögliche Parkinson-Prävention*

Die abschließende Betrachtung soll einer möglichen Prävention des Ausbruchs der Parkinson-Krankheit, das heißt der Entstehung der *lewy bodies* gelten. Die Substantia nigra, in deren Neuronen die Ablagerungen vornehmlich auftreten, spielt eine indirekte Rolle bei der Bewegungskontrolle. [100, S. 556] Signaltransduktionen finden zwischen diesen Nervenzellen finden somit *in hohem Maß* vor allem bei körperlicher Bewegung statt. Man kann deshalb annehmen, dass die mittlere Dauer des Vesikel-Zyklus (vgl. Kap. 1.3.2) umso länger ist, je geringer der Bewegungsgrad ist. Da intrazellulär ein Gleichgewicht zwischen Vesikel-gebundenem und freiem  $\alpha\text{S}$  existiert, [325-327] und unter der Annahme, dass der Kreislauf des  $\alpha\text{S}$  von der Proteinbiosynthese bis hin zum proteolytischen Abbau eng mit dem Vesikel-Zyklus gekoppelt ist, liegt die Wahrscheinlichkeit der Aggregatbildung umso höher, je langsamer der synaptische Vesikel-Zyklus stattfindet. Innerhalb dieses Modells lässt sich auch der frühe Ausbruch der Parkinson Krankheit bei den Mutanten A30P und A53T erklären. Da beide eine geringere Bindungsaffinität an Vesikel besitzen, verschiebt sich gegenüber dem Wild Typ das Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem  $\alpha\text{S}$  zugunsten des nicht-adsorbierten, und die Aggregationswahrscheinlichkeit steigt.

## 4.2 Sphingomyelin – Eine NMR-Studie

In Kap. 1.2.1 & 1.2.3 wurde auf die physiologische Relevanz des Sphingomyelins (SM) hingewiesen. Trotz seiner Bedeutung bei der Domänenbildung in Membranen existieren bis heute aufgrund der Flexibilität des Lipids und der damit verbundenen Schwierigkeit hochreine SM-Kristalle zu züchten keine Röntgenstrukturdaten.<sup>[328]</sup> Dabei besitzen spezifisch zusammengesetzte Domänen nicht nur als „Spezialarbeitsbank“ für bestimmte Proteine große Bedeutung: entlang der zwischen verschiedenen Membranbereichen existierenden Defektlinien ist gleichfalls die Diffusion kleiner Substratmoleküle an der Membranoberfläche teilweise um Größenordnungen beschleunigt,<sup>[28]</sup> weshalb Defektzonen den Zellen auch hinsichtlich enzymatischer Prozesse ein großes Potential bieten.

Durch Kooperation mit Prof. R. Bittman von der City University of New York (CUNY) und mittels mehrerer von ihm hergestellter spezifisch deuterierter N-Palmitoyl-Sphingomyeline (s. Kap. 3.1.2) war es erstmals möglich mit <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie eine Strukturanalyse des N-Acylkettenbereichs von SM in einer lamellaren Membranmatrix durchzuführen. Im einzelnen wurden reines N-Palmitoyl-SM (PSM) sowie orientierte binäre Systeme mit Cholesterol bzw. POPC untersucht. Zu Vergleichszwecken erfolgte ferner eine <sup>2</sup>H-NMR-Analyse von Mischungen, bei denen PSM gegen DPPC ersetzt wurde.

DPPC besitzt die gleiche Kopfgruppe wie PSM und weist zwei gesättigte Acylketten auf. Beide Lipide unterscheiden sich vornehmlich im Interface voneinander (vgl. auch Abb. 1.4). DPPC bietet sich deshalb als Vergleichslipid an, da viele Eigenschaften, die dem SM eigen sind, dessen besonderer Interface-Struktur zugeschrieben werden<sup>[18,21]</sup> mit der Möglichkeit sowohl als H-Brücken-Akzeptor als auch als Donor zu agieren.<sup>[41,42,287,307]</sup>

Für die Bestimmung der Membran-Hydratation  $n_w$  (s. Kap. 3.4.5, Gl. (3.15)) ist die Verwendung von D<sub>2</sub>O notwendig. Da jedoch bei 100%igem D<sub>2</sub>O vielfach die Methylgruppen-Signale mit dem Wassersignal koaleszieren, wurde bei sämtlichen Experimenten eine H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Mischung von 95:5Mol/Mol benutzt. Die Wahl einer solchen Mischung besitzt darüber hinaus noch zwei weitere Vorteile:

1. Bei Hydratisierung mit 100%igem D<sub>2</sub>O tauscht ein Teil des D<sub>2</sub>O rasch gegen in der Luft befindliches H<sub>2</sub>O aus. Der dadurch verursachte Verlust an D<sub>2</sub>O kann bis zu 30% betragen und bringt eine entsprechende Unsicherheit in der Bestimmung von  $n_w$  mit sich.
2. Speziell beim SM existieren labile Protonen in der Amid- sowie in der Hydroxylgruppe. Mit FTIR konnte gezeigt werden, dass diese chemischen Gruppen nach einem Austausch von H<sub>2</sub>O gegen D<sub>2</sub>O in weniger als einer Stunde ebenfalls vollständig deuteriert waren.<sup>[329]</sup> Bei Einsatz von SM träten daher die ND- und OD-Resonanzen als Störsignale in den <sup>2</sup>H-NMR-Spektren auf. Durch Wahl des obigen H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O-Mischungsverhältnisses besitzen diese Resonanzen vernachlässigbare Intensitäten.

### 4.2.1 Reines Sphingomyelin

Zunächst sollen die in  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren ersichtlichen Unterschiede der reinen PSM- und DPPC-Membranen (Abb. 4.45) aufgezeigt werden. PSMd<sub>31</sub> liefert ein

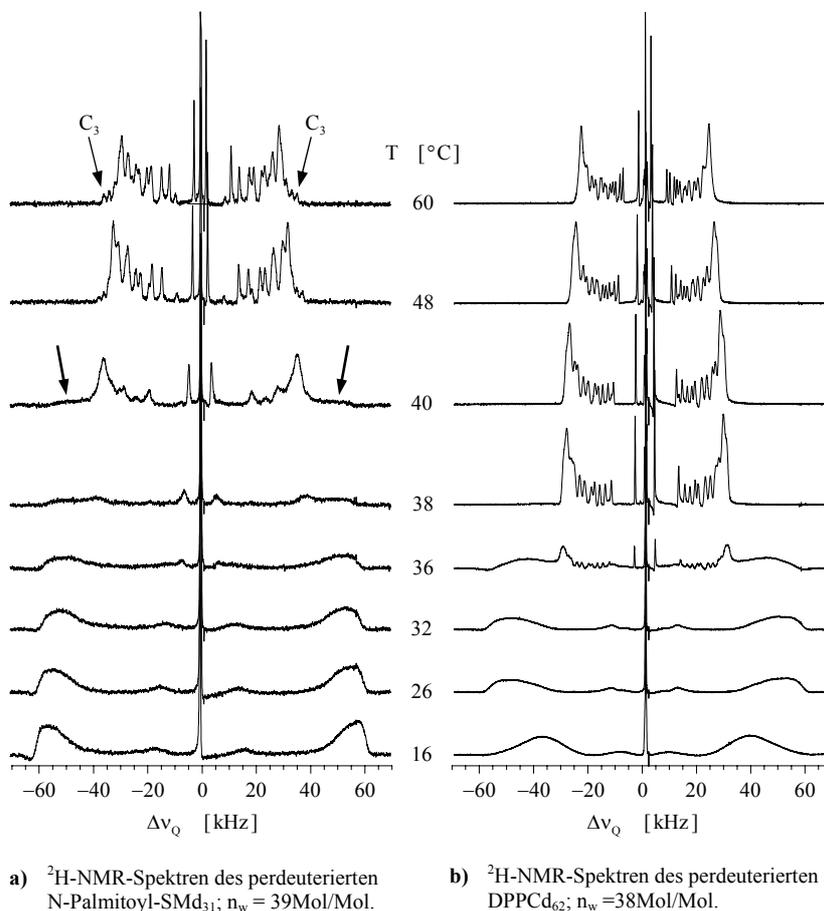


Abbildung 4.45: Festkörper- $^2\text{H}$ -NMR-Spektren lamellarer Membranen bei verschiedenen Temperaturen, aufgenommen bei einer Resonanzfrequenz von 61,40MHz mit einer Quadrupolar-Echo-Pulssequenz. In a) ist durch die Pfeile bei 40°C das beginnende Auftauchen des Gelphasenteils in den  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren gekennzeichnet!

ähnliches Spektrum in der  $L_{\alpha}$ -Phase wie das DPPCd<sub>62</sub> mit einer separaten Auflösbarkeit der terminalen Methylengruppen-Signale und einem partiell koaleszierten Plateaubereich für die Kettensegmente C<sub>3</sub> bis C<sub>10</sub>. Die Quadrupolaufspaltung ist beim PSM für die gleichen Segmentglieder stets etwas größer als beim DPPC, wobei der Unterschied mit abnehmender Nummerierung der Segmente<sup>41)</sup> stetig wächst.

Die Linienbreiten sind beim reinen PSM grundsätzlich etwas breiter als beim DPPC, was auf eine etwas eingeschränkte Beweglichkeit der SM-Lipide hindeutet.<sup>42)</sup> Hierbei gilt ferner bei beiden Lipiden: ausgehend vom Kettenanfang bei der Carbonylgruppe tritt eine stetige Verschmälerung der Linienbreiten bis zur  $\omega$ -endständigen Methylgruppe auf, die durch eine zunehmende Beweglichkeit der einzelnen Kettenglieder verursacht wird – *extreme motional narrowing*-Effekt.

Beim Übergang in die Gelphase steigt  $\Delta\nu_Q$  der einzelnen <sup>2</sup>H-Resonanzen erwartungsgemäß durch das Einfrieren der Kettenbeweglichkeit stark an, die Signale werden extrem breit, wodurch keine Einzelsignale mehr aufgelöst werden können. Bei beiden Lipiden ist in den abgebildeten Spektren eine Koexistenz von Gel und fluider Phase – für das PSMd<sub>31</sub> bei 40°C und für das DPPCd<sub>62</sub> bei 36°C – zu erkennen.

### Spektralmomente

In Abb. 4.45b) ist bei 16°C, gegenüber dem <sup>2</sup>H-Spektrum bei 26°C, eine erneute Verschmälerung der Quadrupolaufspaltung der beiden, alle Methylengruppen in sich einschließenden, breiten Resonanzen zu erkennen. Diese Verschmälerung tritt beim PSMd<sub>31</sub> nicht auf. Die lamellaren DPPCd<sub>62</sub>-Bilayer scheinen somit mindestens 2 Phasenübergänge während der Abkühlung des Systems zu durchlaufen. Diese Vermutung bestätigt sich bei der Berechnung der ersten beiden Spektralmomente M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub>, die für PSMd<sub>31</sub> und DPPCd<sub>62</sub> in Abb. 4.46 dargestellt sind.

M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub> zeigen für das DPPCd<sub>62</sub> einen komplexen Verlauf, der jedoch mit Hilfe des für dieses Lipid verfügbaren Phasendiagramms<sup>[75 Kap. 8]</sup> (s. Abb. 4.47) (weitgehend) verstanden werden kann:

Der leichte Anstieg der Spektralmomente zwischen 46°C und 48°C ist möglicherweise auf die Separierung der  $L_{\alpha}$ -Phase in eine Lipid- und eine Wasserphase zurückzuführen (vgl. Abb. 4.47). Bei 38±1°C findet der Übergang von der fluiden  $L_{\alpha}$ - zur Ripple-Phase P<sub>β'</sub> (vgl. Kap. 1.2.7) statt. Nach dem Übergang in den sich anschließende L<sub>β'</sub>-Zustand wechselt das System zwischen 22°C und 26°C in die lamellare kristalline L<sub>c</sub>-Phase. Ungewöhnlich, insofern als unerwartet, ist die Beobachtung des in weniger als einer Stunde stattfindenden Übergangs von L<sub>β'</sub> zu L<sub>c</sub>, da bisher für diesen Übergang sehr viel längere Äquilibrierungszeiten beobachtet wurden. Die hier auftretende kurze Übergangsdauer mag mit dem spezifischen Probenaufbau zu-

<sup>41)</sup> Die Indizierung beginnt mit dem Esterkohlenstoff C<sub>1</sub> und endet mit dem Methylkohlenstoff C<sub>n</sub>.

<sup>42)</sup> Aussagen über einen möglichen Einfluss unterschiedlicher Relaxationen bzw. spezifischer Bewegungsmoden auf die Linienbreite können an dieser Stelle nicht getroffen werden.

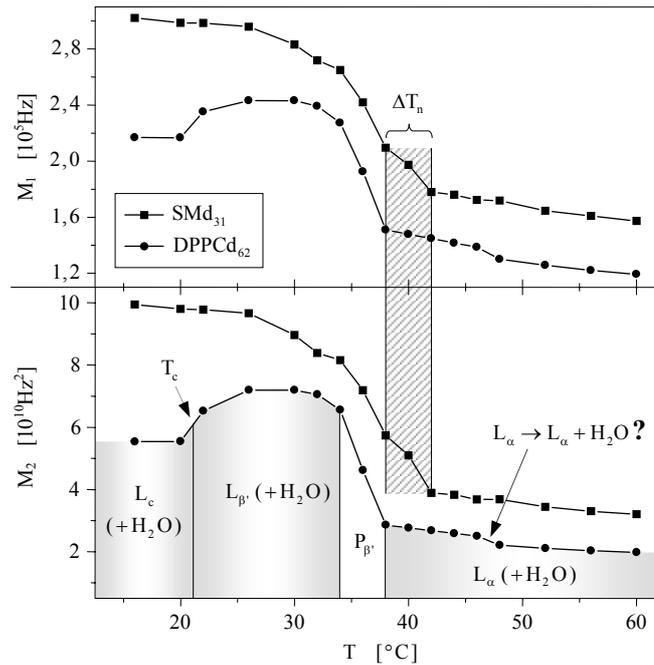


Abbildung 4.46: Temperaturabhängigkeit der ersten beiden Spektralmomente  $M_1$  und  $M_2$  reiner lamellarer DPPCd<sub>62</sub>- und PSMd<sub>31</sub>-Bilayer. Die Systeme befanden sich im voll hydratisierten Zustand;  $26 \leq n_w \leq 29$ .

sammenhängen, bei dem beispielsweise durch die Glasplättchen als Probenträger sonst auftretende Oberflächenundulationen evtl. unterdrückt werden.

Die Phasenübergangstemperatur lamellarer Doppellipidschichten vom fluiden in den geordneten Zustand liegt für das voll hydratisierte ( $n_w \geq 25$ ), protonierte DPPC bei  $41,25^\circ\text{C}$ <sup>[73]</sup> und für das Acylketten-perdeuterierte DPPCd<sub>62</sub> bei  $37,75^\circ\text{C}$ ,<sup>[73]</sup> was mit den vorliegenden Messdaten übereinstimmt. Durch Deuterierung verschiebt sich der Phasenübergang gegenüber den protonierten Lipiden üblicherweise um  $2\text{--}3^\circ\text{C}$  hin zu tieferen Temperaturen.

PSMd<sub>31</sub> zeigt einen wesentlich breiteren Phasenübergang als das DPPCd<sub>62</sub> mit einer bei  $\Delta T_n$  (Abb. 4.46) erscheinenden Stufe in den Spektralmomenten, die beim DPPCd<sub>62</sub> nicht auftritt. Die mittlere Phasenübergangstemperatur  $T_m$  beträgt  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  (Angabe der mittleren Temperatur der steilen  $M_1$ - bzw.  $M_2$ -Flanken in Abb. 4.46). Welchen Zustand SM unterhalb von  $T_m$  einnimmt, ist bis heute unklar.

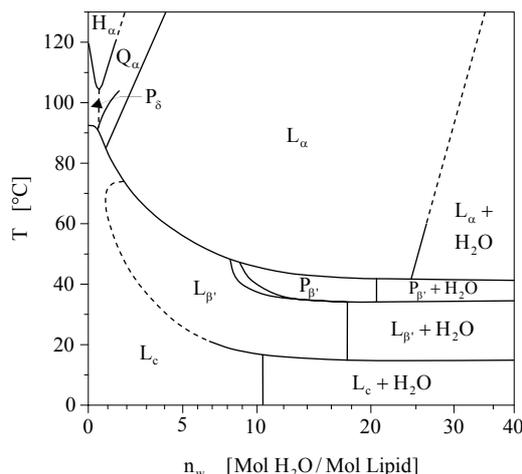


Abbildung 4.47: Illustratives Phasendiagramm hydratisierter protonierter DPPC-Membranen nach [78 Kap. 8] – teilweise basierend auf den Arbeiten von Jürgens et al.<sup>[330]</sup> und Kodama et al.<sup>[331]</sup>

#### Spezifisch deuteriertes Sphingomyelin

Auffallend an den in Abb. 4.45 gezeigten <sup>2</sup>H-NMR-Spektren des PSMd<sub>31</sub> sind die in der  $L_{\alpha}$ -Phase außerhalb des Plateaubereichs auftauchenden <sup>2</sup>H-Resonanzen, die nicht beim DPPCd<sub>62</sub> auftreten. Gemäß der Annahme, dass die Quadrupolaufspaltung  $\Delta\nu_Q$  der <sup>2</sup>H-Kerne entlang der Alkylkette kontinuierlich abnimmt,<sup>[53]</sup> ergibt sich eine Zuordnung dieser Signale zu <sup>2</sup>H(sn-2-C<sub>3</sub>). Zur Verifizierung dieser Zuordnung wurden lamellare Bilayer des partiell deuterierten 3,3-Dideutero-N-Palmitoyl-SM-d<sub>2</sub> (PSMd<sub>2</sub>(C<sub>3</sub>)) (Darstellung der Struktur in Abb. 3.2) hergestellt und mittels <sup>2</sup>H-NMR untersucht. Die bei verschiedenen Temperaturen gemessenen Spektren sind in Abb. 4.48b) enthalten.

In PC-Bilayern fand man unterschiedliche Orientierungen der sn-1- und sn-2-Kettenanfänge bzgl. der Direktorachse (vgl. Abb. 1.4a)). Während die sn-1-Kette nahezu parallel zur Bilayernormalen ausgerichtet ist, besitzt die sn-2-Kette im Bereich der Carbonylgruppe einen Knick, wodurch die C<sub>2</sub>-Deuteronen nicht – wie dies für die weiteren Kettensegmente der Fall ist – äquivalent sind. Damit führen die beiden <sup>2</sup>H(sn-2-C<sub>2</sub>) -Signale zu zwei verschiedenen Quadrupolaufspaltungen,<sup>[60,332]</sup> die zudem kleiner sind als  $\Delta\nu_Q$  der <sup>2</sup>H(sn-2-C<sub>3</sub>)-Kerne. Bei den <sup>2</sup>H-Atomen des sn-1-C<sub>2</sub>-Kettenglieds koaleszieren dagegen die Signale und folgen der von Seelig et al.<sup>[53]</sup> postulierten Annahme. Eine analoge Betrachtung ist für das PSMd<sub>31</sub> gültig.

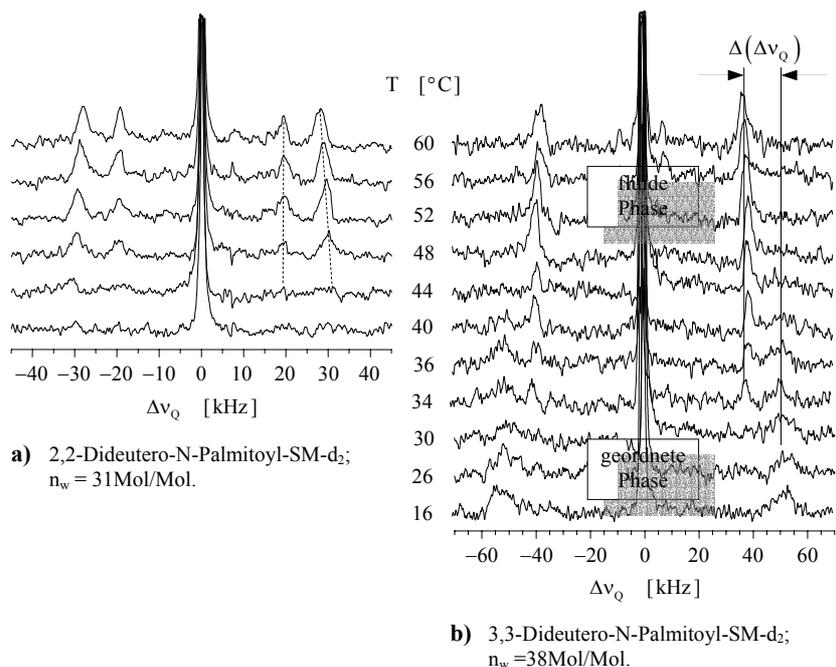


Abbildung 4.48:  $^2\text{H}$ -NMR-Spektrenarray lamellarer Membranen aus spezifisch an einer Position der N-Acylkette deuterierten PSM-Lipiden.

Da die  $^2\text{H}$ -NMR-Signale der  $^2\text{H}(\text{sn-2-C}_2)$  vom restlichen Acylketten-Spektrum überlagert sind, und deren Positionen nur schwer, mit teilweise großen Unsicherheiten, identifizierbar sind, wurde ebenfalls das reine 2,2-Dideutero-N-Palmitoyl-SM-d<sub>2</sub> (PSMd<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>)) eingesetzt. Abb. 4.48a) zeigt repräsentative Spektren der präparierten lamellaren Membranen.

Entgegen dem sonst beschriebenen kooperativen Schmelzen der Kettensegmente von Lipiden zeigen diese Spektren bereits bei 48°C eine deutliche Linienverbreiterung. Unterhalb von 44°C sind die  $^2\text{H}(\text{sn-2-C}_2)$ -Resonanzen nicht mehr erkennbar. Interessanterweise beginnt gleichfalls bei 44–48°C ein Subspektrum in den  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren des PSMd<sub>2</sub>(C<sub>3</sub>) aufzutauchen, das auf eine neben der fluiden Phase koexistierende geordnete Lipidphase hinweist. Ab 30°C ist der fluide Anteil im Spektrum des PSMd<sub>2</sub>(C<sub>3</sub>) vollständig verschwunden.

## 4.2.2 Diskussion

### *Interlamellare Wasserstoffverbrückung*

Das thermotrope Phasenverhalten des Sphingomyelins unterscheidet sich deutlich von anderen physiologischen Phospholipiden. Der Hauptgrund hierfür liegt in dem spezifischen Interface-Konstrukt, der dem SM erlaubt, nicht nur als H-Brückenakzeptor sondern auch als Donor zu agieren. So wurde gezeigt,<sup>[41,333-336]</sup> dass sich am Phasenübergang vor allem die Eigenschaften der Cholin-Kopfgruppe des SM ändern: ihre Beweglichkeit nimmt mit sinkender Temperatur stärker ab als bei vergleichbaren PC-Membranen. Aus dem Circular Dichroismus des Interface-Bereichs von SM<sup>[41]</sup> wurde die Ursache der geringen Kopfgruppen-Beweglichkeit in einer Wasserstoffverbrückung der Phosphatgruppe mit der Amid- bzw. der Hydroxylgruppe abgeleitet. Wie aus <sup>1</sup>H- und <sup>31</sup>P-NMR-Messungen<sup>[328]</sup> gefolgert wurde, sind die H-Brücken zwischen dem Sphingosin-Hydroxyl (vgl. Abb. 1.4, S. 7) und dem Phosphatester-Sauerstoff in der Kopfgruppe vornehmlich intramolekular. Dagegen ist die Amidgruppe sowohl intra- als auch intermolekular Wasserstoff-verbrückt.

Bedingt durch ihren Aufbau benötigen Glycerophospholipide dagegen eingelagerte Wassermoleküle als Mediator zur Ausbildung interlamellarer H-Brücken,<sup>[337]</sup> was sowohl eine höhere Membranfluidität als auch eine größere Fläche pro Molekül mit sich bringt. Die vergleichsweise dichtere Packung der SM-Membranen konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. So wurde für das PSMd<sub>31</sub> in der fluiden Phase eine um etwa 1Å<sup>2</sup> kleinere Acylkettenflächen  $A_{C,Int}$  im Interface-Bereich gegenüber dem DPPCd<sub>62</sub> gefunden (s. Abb. 4.57 & 4.58 in Kap. 4.2.3).

Das ausgeprägte H-Brückennetzwerk in SM-Membranen macht sich darüber hinaus auch noch anderweitig bemerkbar. Wie in [97,338] beobachtet wurde, ist die Wasserorientierung für  $T > T_m$  beim BBSM<sup>43)</sup> beispielsweise im Vergleich mit POPC-Membranen trotz der gleichen Cholin-Kopfgruppe geringer und zeigt auch eine schwächere Temperaturabhängigkeit. In [97] wird vermutet, dass dies eine Folge der inhomogenen Kettenzusammensetzung des BBSM ist. Da jedoch die Beweglichkeit des Wassers im Kopfgruppenbereich stark mit der Ordnung im Bilayer korreliert ist und sich bei Verkleinerung der Fläche pro Lipid ebenfalls verringert, ist auch eine andere Erklärung denkbar: Infolge der in SM-Membranen existierenden Selbstvernetzung durch H-Brücken sind Donatoren und Akzeptoren der Lipide bereits weitgehend gesättigt. Das Wasser findet daher wenig Möglichkeiten zur Wechselwirkung mit den Lipiden, kann nur in geringerem Maß in den Kopfgruppenbereich eindringen und sich über H-Brücken an das Sphingomyelin orientieren.

### *Phasenübergang*

Wie anhand von Abb. 4.46 ersichtlich, erfolgt der Übergang in die flüssig-kristalline Phase kontinuierlich über einen breiten Temperaturbereich. Entsprechend den Spekt-

---

<sup>43)</sup> Die zusammengefasste Nomenklatur findet sich auf S. X–XII.

ralmomentkurven kann dieser für  $\text{PSMd}_{31}$  auf etwa 26–44°C mit einem Maximum bei  $T_m = 34\text{--}38^\circ\text{C}$  konstatiert werden.  $T_m$  von  $\text{PSMd}_{31}$  fällt damit nahezu mit dem des  $\text{DPPCd}_{62}$  zusammen. Der gesamte thermotrope Übergangsbereich des  $\text{PSMd}_{31}$  ist jedoch ungefähr 3–4mal so breit wie für das  $\text{DPPCd}_{62}$ . Diese Breite ist nicht auf eine unterschiedliche Kettenzusammensetzung der SM-Lipide, wie bei nativ gewonnenem BBMS oder EYSM teilweise vermutet wurde, zurückführbar, da das hier verwendete reine N-Palmitoyl-SMd<sub>31</sub> eine absolut homogene Kettenverteilung aufweist.

Gerade am Phasenübergang – speziell bei  $T = 38^\circ\text{C}$  – tritt bei den reinen  $\text{PSMd}_{31}$ -Multischichten eine sehr starke Linienverbreiterung und Signalabflachung auf, die beim DPPC lediglich in weniger ausgeprägter Weise bei ca.  $36^\circ\text{C}$  zu beobachten ist. Neben der im Bereich von  $T_m$  stattfindenden Membranversteifung durch geordnetes Ausrichten der Alkylketten ist möglicherweise ein weiterer Grund mit dafür verantwortlich:

Die am Phasenübergang auftretenden lateralen Fluktuationen der Lipidkopfgruppen erzeugen kurzlebige Kavitäten, in die Wassermoleküle bis in den Interface-Bereich eindringen können. Nach einer Simulationsstudie der H-Brücken in Lecithin-Membranen nimmt infolgedessen die durch Wassermoleküle vermittelte interlamellare H-Verbrückung zu,<sup>[339]</sup> wobei sich gleichzeitig die mittlere Zahl der H-Brücken pro  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül erhöht. Anders ausgedrückt: das interlamellare Wasser wird zäher. Lipid und Wasser können in diesem Temperaturbereich nicht mehr als separate Phasen behandelt werden.

#### *Segmentschmelzen beim Übergang in die $L_\alpha$ -Phase*

Auffallend an den ersten beiden Spektralmomenten  $M_1$  bzw.  $M_2$  des  $\text{PSMd}_{31}$  (Abb. 4.46) ist die Stufenstruktur am Beginn des Übergangsbereichs (von hohen Temperaturen kommend) zwischen der  $L_\alpha$ - und der geordneten Phase. Interessant in diesem Zusammenhang sind die  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren des an der  $\text{C}_2$ - bzw.  $\text{C}_3$ -Position deuterierten  $\text{PSMd}_2$ . In dem in Abb. 4.48a) dargestellten Spektrenarray des  $\text{PSMd}_2(\text{C}_2)$  stellt man bei  $44^\circ\text{C}$ , also deutlich über  $T_m$  ( $\approx 36^\circ\text{C}$ ) eine drastische Linienverbreiterung fest. Hingegen findet man in den Spektren der  $\text{C}_3$ -Deuteronen, in Übereinstimmung mit den Messungen am  $\text{PSMd}_{31}$ , erst ab  $T = 36^\circ\text{C}$  eine starke Verbreiterung der  $^2\text{H}$ -Resonanzen.

Die bei den Glycerophospholipiden für die sn-2-Kette auftretende Inäquivalenz der Deuteronen des  $\text{C}_2$ -Segments<sup>[42,332]</sup> konnte bereits, repräsentativ für die Sphingolipide, bei hohen Temperaturen ( $T = 90^\circ\text{C}$ ) auch für die N-Acylkette des N-Palmitoyl-Galactosylceramids gezeigt werden.<sup>[340]</sup> Die bisher jedoch nicht untersuchte Temperaturabhängigkeit dieser  $^2\text{H}$ -NMR-Resonanzen enthüllt eine schon weit vor dem eigentlichen Phasenübergang beginnende Linienverbreiterung, die auf eine frühzeitige Verfestigung des SM-Interfaces durch die vorhandenen intermolekularen H-Brücken hindeutet. Gestärkt wird diese Annahme zudem dadurch, dass die Spektralmomente des  $\text{DPPCd}_{62}$  am Übergang zur  $L_\alpha$ -Phase keinen dem  $\text{PSMd}_{31}$  adäquaten Verlauf besitzen.

### Domänenbildung

Schon in hydratisierten reinen SM-Bilayern bildet sich nach Untracht und Shipley<sup>[341]</sup> bei  $T_m$  ein feines Labyrinth von Phasengrenzen; d.h. es existieren mehr als eine Phase. Dieser Befund bestätigt sich sowohl beim  $\text{PSMd}_{31}$  (Abb. 4.45a)) als auch in den Spektren des  $\text{PSMd}_2(\text{C}_3)$  (Abb. 4.48b)). Letztere zeigen für das Kettensegment  $\text{C}_3$  einen Koexistenzbereich des flüssig-kristallinen und des Gelzustands von ca. 30°C bis 48°C.

Die Beobachtbarkeit dieser Phasenkoexistenz bedeutet, dass die Gel- bzw. Fluidodomänen groß genug sind, dass während der Messdauer von ungefähr 50 $\mu\text{s}$  ein Großteil der Lipide nicht mehr zwischen den verschiedenen Phasenbereichen austauschen kann. In [97] wurde die hierfür notwendige minimale Domänengröße auf einige  $\mu\text{m}^2$  bestimmt mit einem mittlerer Radius im Fall zirkularer Geometrie in der Größenordnung von 2 $\mu\text{m}$ .

### Phasenzustand unterhalb von $T_m$

Obwohl der Phasenübergang in den  $L_\alpha$ -Zustand beim  $\text{PSMd}_{31}$  fast mit dem  $T_m$  des  $\text{DPPCd}_{62}$  zusammenfällt, deutet sich im Verlauf der Spektralmomente beim  $\text{PSMd}_{31}$  mit sinkender Temperatur keine, wie für das  $\text{DPPCd}_{62}$  gefundene, Abnahme von  $M_1$  und  $M_2$  an. Dass SM im untersuchten Temperaturbereich folglich nicht in eine  $L_c$ -Phase übergeht, dürfte u.a. an dem unterhalb von  $T_m$  weiterhin vorherrschenden hohen Grad an Rotationsfreiheit der Alkylketten liegen,<sup>[334]</sup> von denen sich auch im Gelzustand noch 34% in einer *gauche*-Konformation befinden. Ferner verhindert die im Sphingosingerüst vorhandene ungesättigte  $\text{C}_4$ - $\text{C}_5$ -Bindung grundsätzlich einen Übergang in einen lamellar-kristallinen Zustand, wie dies für sämtliche ungesättigten Phospholipide der Fall ist. Es ist daher anzunehmen, dass sich das Sphingomyelin im geordneten Zustand in einer  $L_\beta$ - oder  $L_{\beta'}$ -Phase befindet.

Bei 32–34°C deutet sich bei  $M_1$  und  $M_2$  des  $\text{PSMd}_{31}$  eine zweite Stufe an. Inwieweit ihr eine reale Bedeutung zukommt kann nicht konstatiert werden. Möglicherweise existiert, ähnlich dem DPPC, auch beim SM zwischen Gel- und  $L_\alpha$ -Zustand eine Ripple-Phase  $P_\beta$ . Der Temperaturbereich, über den sich  $P_\beta$ -Phasen für Lipide erstrecken ist üblicherweise relativ schmal, weshalb nicht anzunehmen ist, dass sich  $P_\beta$  – falls existent – bis weit unter 30°C erstreckt. Resümierend sollte sich das PSM unterhalb von 32°C in einer  $L_\beta$  oder  $L_{\beta'}$ -Phase befinden.

### 4.2.3 SM/POPC-Membranen

Wie in Kap. 1.2.1 bereits ausgeführt, tragen die Phosphatidylcholin-Lipide (PC) wesentlich zum Aufbau von Zellmembranen bei. Darüber hinaus verschiebt sich das Verhältnis von PC zu SM mit fortschreitendem Alter mehr und mehr in Richtung SM.<sup>[41,42]</sup> Eine Untersuchung der Eigenschaftsänderungen von Membranen bei Variation des SM/PC-Verhältnisses erscheint daher für biologische Prozesse von allgemeinem Interesse. Das gilt insbesondere auch hinsichtlich der in Kap. 4.1 ausgeführten Wechselwirkung des Parkinson-assoziierten Proteins  $\alpha$ -Synuclein mit synaptischen Vesikelmembranen.

In früheren Arbeiten wurde als Beispiel für die Modifikation von SM-Membranen durch PC vor allem DPPC<sup>44)</sup> verwendet (z.B. [329,342,343]). Physiologisch relevanter ist es jedoch ungesättigte Phosphatidylcholine zu betrachten. Hierbei ist POPC ein gutes Modellsystem, da die Länge seiner Acylketten (C16:0/C18:1) ungefähr in der Mitte der natürlichen Kettenverteilung liegt.

Es wurden flüssig-kristalline Mischungen mit unterschiedlichen molaren PSM/POPC-Verhältnissen untersucht. Zu Vergleichszwecken wurden teilweise erneut <sup>2</sup>H-NMR-Spektren von DPPC/POPC-Systemen aufgenommen. Sämtliche Proben befanden sich stets im voll hydratisierten Zustand mit  $n_w \geq 25$ .<sup>45)</sup> Dieser Zustand zeichnet sich gegenüber Doppellipidschichten geringer Hydratation dadurch aus, dass sich die Membraneigenschaften durch Variation des Wassergehalts in der Probe nur mehr geringfügig ändern, während bei niedriger Hydratisierung Membraneigenschaften wie Fluidität, Phasenzustand, usw. wesentlich von  $n_w$  abhängen.

#### *Einfluss von POPC auf das PSMd<sub>31</sub>*

Abb. 4.49 zeigt repräsentative <sup>2</sup>H-NMR-Spektren für sämtliche untersuchten PSMd<sub>31</sub>/POPC-Verhältnisse bei T = 48°C und T = 26°C. Im ersteren Fall sind sowohl POPC als auch PSMd<sub>31</sub> (Perdeutero-Palmitoyl-SM-d<sub>31</sub>) im flüssig-kristallinen Zustand, während sich bei T = 26°C lediglich das POPC oberhalb seiner Hauptphasenübergangs-Temperatur T<sub>m</sub> befindet.<sup>46)</sup>

Im L<sub>α</sub>-Zustand (T = 48°C) zeigen die Spektren mit zunehmendem POPC-Anteil eine Verringerung der Ordnung. Die erhöhte Membranfluidität macht sich durch geringere Linienbreiten bemerkbar. Befinden sich die Membranen unterhalb von T<sub>m</sub> für das PSMd<sub>31</sub>, tritt der Einfluss des POPC wesentlich signifikanter zutage. Bei 67% PSM taucht bei T = 26°C das Subspektrum von Gelphasen-Domänen auf (Abb. 4.49).

<sup>44)</sup> Auf S. X–XII sind u.a. für sämtliche in der Arbeit vorkommenden Lipide die vollständigen Namen mit den dazugehörigen Kurzformen aufgelistet.

<sup>45)</sup> Die Hydratation  $n_w$  gibt die Zahl der H<sub>2</sub>O-Moleküle pro Lipid in Einheiten von Mol/Mol an (vgl. Kap. 3.4.5). Die Angabe der Einheit für  $n_w$  wird in Arbeiten vielfach weggelassen.

<sup>46)</sup> Nach Thewalt et al. besitzt das POPC den Übergang zur L<sub>α</sub>-Phase bei -5°C und das POPCd<sub>31</sub> (Perdeuterierung der sn-1-Kette) bei ca. -6°C.<sup>[344]</sup>

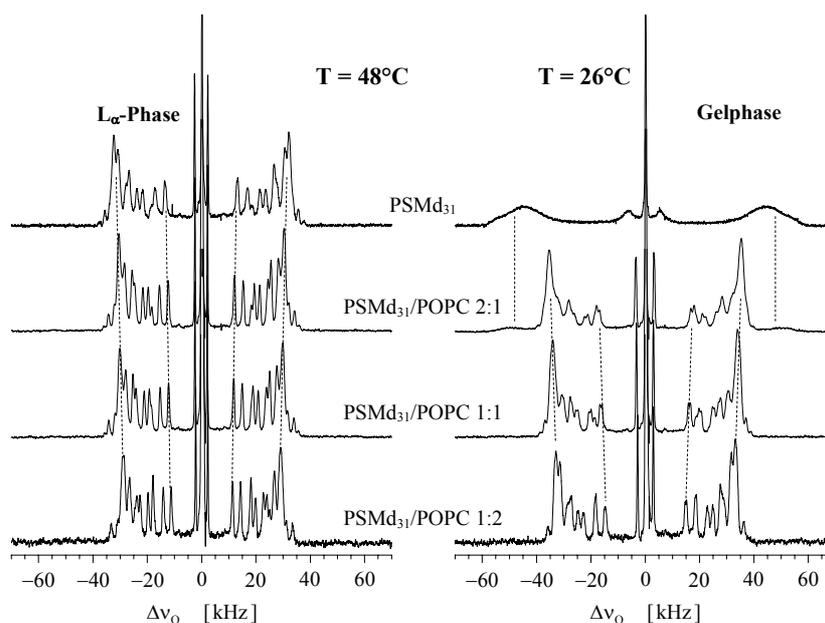


Abbildung 4.49:  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren von  $\text{PSMd}_{31}/\text{POPC}$ -Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung;  $n_w = 31\text{--}39$ .

Zur Klärung der Frage nach einer Kettenpositions-spezifischen Wechselwirkung zwischen beiden Lipiden sind in Abb. 4.50 die Quadrupolaufspaltungen des Plateaubereichs und der Methylgruppen dargestellt.

Im Plateaubereich, welcher das Verhalten des Alkylkettenanfangs widerspiegelt, nimmt das Quadrupolsplitting mit steigendem Anteil an POPC kontinuierlich ab, was auf die erhöhte Beweglichkeit der PSM-Lipide zurückzuführen ist. Für das reine  $\text{PSMd}_{31}$  ist ab  $42^\circ\text{C}$  mit sinkender Temperatur sowohl im Plateaubereich als auch bei der terminalen Methylgruppe, die sensitiv für das Zentrum des hydrophoben Bilayer-Bereichs ist, ein starker Anstieg von  $\Delta v_Q$  identifizierbar.

Interessanterweise treten in den Methylgruppen-Aufspaltungen bei sämtlichen Mischungen im Bereich des Hauptphasenübergangs von  $\text{PSMd}_{31}$  Fluktuationen von  $\Delta v_Q$  auf (in Abb. 4.50b) spezifisch gekennzeichnet). Weiterhin fallen die Aufspaltungen für die  $\text{PSMd}_{31}/\text{POPC}$ -Mischungen mit einem SM-Gehalt von 50–67% für hohe Temperaturen mit denen des reinen  $\text{PSMd}_{31}$  zusammen.

Resümierend wirkt sich der Phasenübergang des  $\text{PSMd}_{31}$  stärker auf das Alkylkettenverhalten im Inneren der Membran aus als im Bereich des Interfaces.

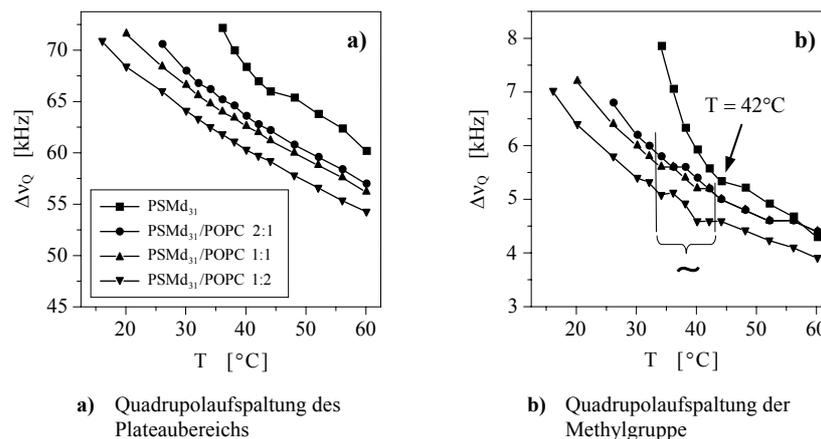


Abbildung 4.50: Vergleich der  $^2\text{H}$ -NMR-Aufspaltungen des reinen  $\text{PSMd}_{31}$  mit mehreren  $\text{PSMd}_{31}/\text{POPC}$ -Mischungen;  $n_w = 31\text{--}39$ . In b) ist ein Fluktuationbereich von  $\Delta\nu_Q$  bei  $\approx 35\text{--}45^\circ\text{C}$  erkennbar. Zur besseren Darstellung der Verläufe von  $\Delta\nu_Q$  für die Mischungen wurden die Aufspaltungen des reinen  $\text{PSMd}_{31}$  bei tiefen Temperaturen nicht abgebildet.

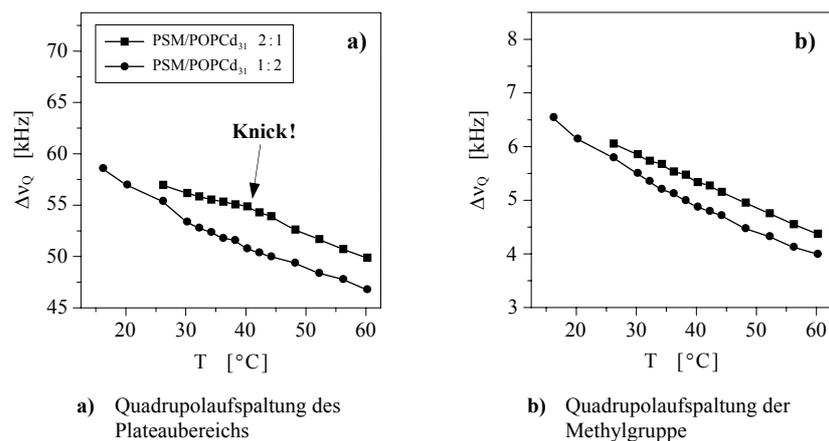


Abbildung 4.51: Vergleich der  $^2\text{H}$ -NMR-Aufspaltungen zweier  $\text{PSM}/\text{POPCd}_{31}$ -Mischungen;  $n_w = 27\text{--}36$ .

*Einfluss des PSM auf das POPCd<sub>31</sub>*

Zur Untersuchung des umgekehrten Einflusses von SM auf das POPC wurden Mischungen aus PSM und POPCd<sub>31</sub> (Deuterierung der sn-1-Kette) eingesetzt. Einige der so gemessenen <sup>2</sup>H-NMR-Spektren sind in Abb. 4.52 gezeigt. Die temperaturabhängigen Quadrupolaufspaltungen des Plateaubereichs und der terminalen Methylgruppe finden sich in Abb. 4.51.

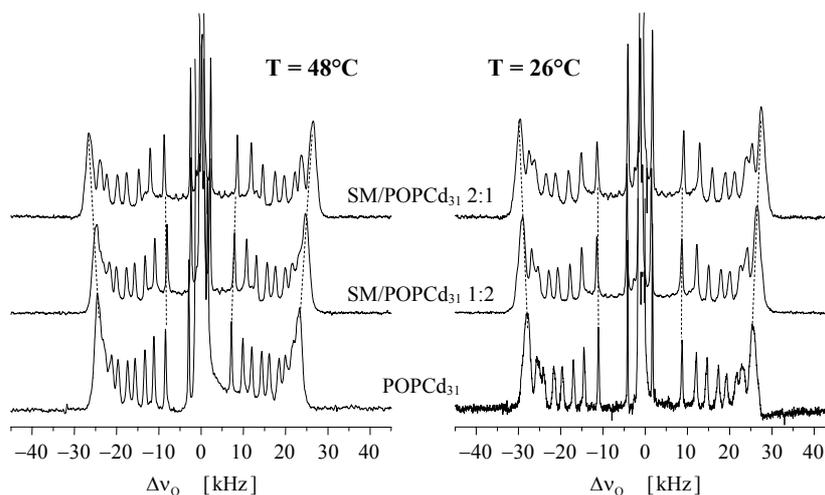


Abbildung 4.52: <sup>2</sup>H-NMR-Spektren von PSM/POPCd<sub>31</sub>-Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung;  $n_w = 27-36$ .

Bei 26°C ist mit wachsendem SM-Gehalt eine zunehmende Linienverbreiterung zu beobachten, die auf eine Einschränkung der Acylketten-Beweglichkeit beim POPC hindeutet, und die für T = 46°C kaum erkennbar ist.

In den in Abb. 4.51 dargestellten Quadrupolaufspaltungen des Plateaubereichs zeigt sich bei einem molaren PSM-Gehalt von 67% in der Nähe des Phasenübergangs für das PSM ein „Knick“ im Verlauf von  $\Delta v_Q$ . Hingegen kann bei den Methylgruppen-Aufspaltungen ein solcher nicht ausgemacht werden. Inwieweit dies mit einer Segment-abhängigen Wechselwirkung zwischen den Alkylketten des PSM und des POPCd<sub>31</sub> zusammenhängen mag, wird in der sich anschließenden Diskussion erörtert.

Illustrativ zeigt Abbildung 4.53 die <sup>2</sup>H-Spektren für das System DPPC/POPC 1:2, einmal mit Perdeuterierung der sn-1- und sn-2-Kette am DPPC und einmal mit dem

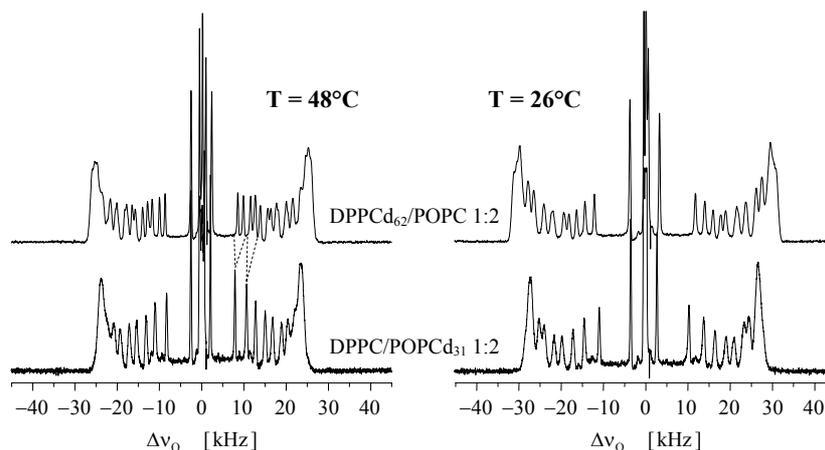


Abbildung 4.53:  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren von Membranen aus DPPC/POPC im molaren Verhältnis von 1:2, bei denen je ein Konstituent perdeuterierte sn-Ketten aufweist;  $n_w = 38\text{--}39$ . Links ist gestrichelt die Zuordnung der  $^2\text{H}(\text{C}_{14})$ - &  $^2\text{H}(\text{C}_{15})$ -Resonanzen der sn-1- & sn-2-Positionen im DPPCd<sub>62</sub> den entsprechenden Signalen der sn-1-Kette beim POPCd<sub>31</sub> angezeigt.

sn-1-Ketten-deuterierten POPCd<sub>31</sub>. Bei 48°C sind selbst in der hier gewählten Darstellung die separaten Splittings für die C<sub>15</sub>- und C<sub>14</sub>-Segmente der sn-1- und sn-2-Kette des DPPCd<sub>62</sub> zu identifizieren.

Bei den  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren mit perdeuteriertem DPPCd<sub>62</sub> können die Methylensignale der sn-1-Kette von denen der sn-2-Kette für die Positionen C<sub>8</sub> bis C<sub>15</sub> unterschieden werden. Dagegen koaleszieren die Methylgruppen-Resonanzen beider Ketten. Ferner zeigt sich, dass  $\Delta v_Q$  einer sn-1-C<sub>n</sub>-Gruppe mit dem der sn-2-C<sub>n+1</sub>-Gruppe, mit  $n = 3\text{--}15$ , desto stärker koalesziert, je näher beide Gruppen zum Interface lokalisiert sind. Analoge Beobachtungen wurden bereits für das DMPC beschrieben.<sup>[345]</sup> Erklärbar ist diese Tatsache durch die in Kap. 4.2.1 erwähnte Krümmung der sn-2-Kette im Bereich der Esterbindung, so dass sich, bezogen auf die Direktorachse, die sn-2-Methylengruppen im weiteren Verlauf der Kette um ca. eine Segmenteinheit im Vergleich zur sn-1-Kette in Richtung Interface verschieben.

#### *Koexistenz von $L_\alpha$ - und Gelphase*

In Abb. 4.42 (Kap. 4.3.1) sind die Koexistenzen der  $L_\alpha$ - sowie der Gelphase für das reine SMD<sub>31</sub> zwischen 38°C und 40°C bzw. für DPPCd<sub>62</sub> bei  $\approx 36^\circ\text{C}$  zu erkennen. Wie z.B. in [97,346] beschrieben, hängt sowohl die Breite des Koexistenzbereichs als auch die mittlere Temperatur desselben nicht nur von der Zusammensetzung der

Lipidgemische ab sondern ebenso von der Hydratation. Mit sinkender Hydratisierung verschiebt sich generell  $T_m$  hin zu höheren Temperaturen. So konnte für  $n_w = 4$  ein breiter Übergangsbereich für das reine POPCd<sub>31</sub> bereits zwischen 20°C und 30°C beobachtet werden,<sup>[97]</sup> obschon  $T_m(\text{POPC})$  im voll hydratisierten Zustand unterhalb der Gefrieretemperatur des Wassers liegt.<sup>[344]</sup>

Die Invarianz von  $T_m$  gegenüber einer weiteren Erhöhung von  $n_w$  kann damit als Kriterium für die Definition des *voll hydratisierten Zustands* herangezogen werden.

Die Abbildungen 4.54 & 4.55 stellen, von höheren Temperaturen kommend, die beginnende Phasenkoexistenz für die voll hydratisierten PSMd<sub>31</sub>/POPC-Bilayer der molaren Verhältnisse 2:1 und 1:1 dar, wie sie sich in den Methylgruppensignalen sowie im Gesamtspektrum der perdeutierten Acylkette des PSMd<sub>31</sub> widerspiegelt. Die untere Temperaturgrenze der Spektrenarrays ist Apparatur-bedingt. Für PSMd<sub>31</sub>/POPC 1:2 (Spektren nicht dargestellt) deutet sich der Beginn des Phasenübergangs und damit die Koexistenz von fluider und Gelphase erst bei  $T = 16^\circ\text{C}$  an.

Wie erwartet, sinkt die Übergangstemperatur proportional mit dem SM-Anteil. Dabei liefern die SM-reichen Domänen den Gelphasenanteil an den <sup>2</sup>H-NMR-Spektren, während die POPC-reichen Membranegebiete die fluide Spektralkomponente beitragen. Die Linienbreite steigt im Phasenübergangsbereich aufgrund einer verringerten Kettenbeweglichkeit stark an.

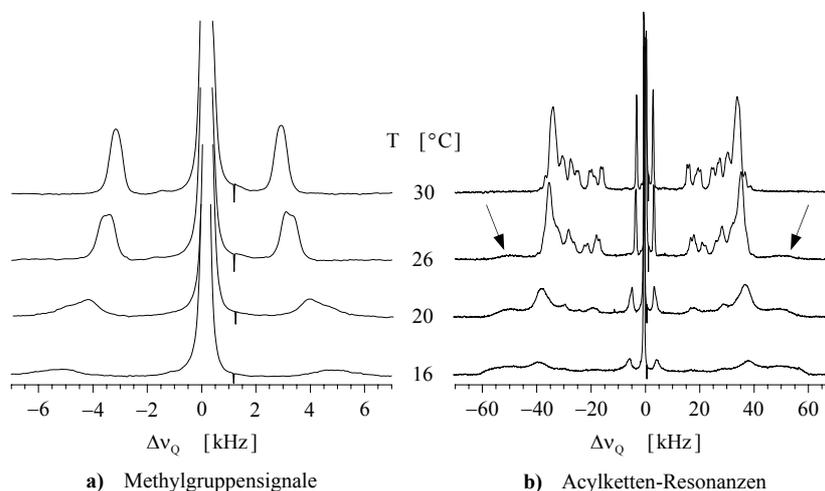


Abbildung 4.54: Koexistenz fluider und geordneter Domänen in Membranen aus PSMd<sub>31</sub>/POPC mit dem molaren Verhältnis 2:1 im voll hydratisierten Zustand;  $n_w = 33$ . Die Pfeile markieren das Auftauchen des Subspektrums für die geordneten Bereiche.

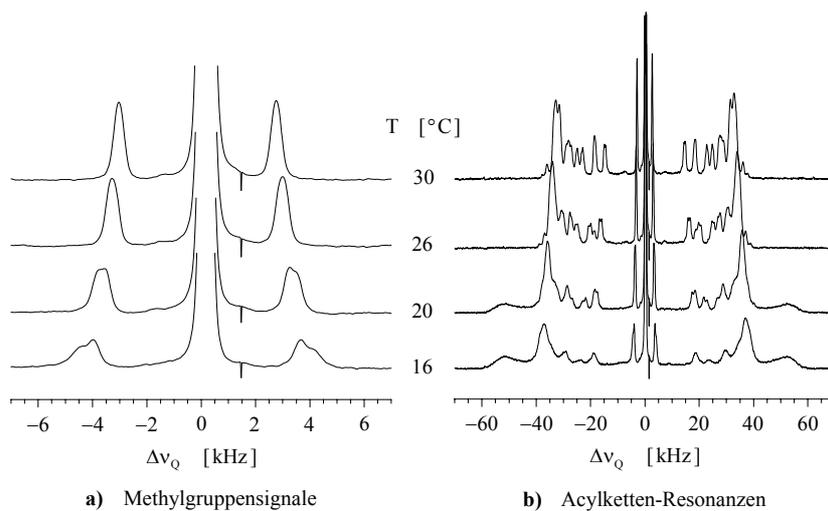


Abbildung 4.55: Koexistenz fluider und geordneter Domänen in Membranen aus PSMd<sub>31</sub>/POPC-1:1 im voll hydratisierten Zustand; n<sub>w</sub> = 31.

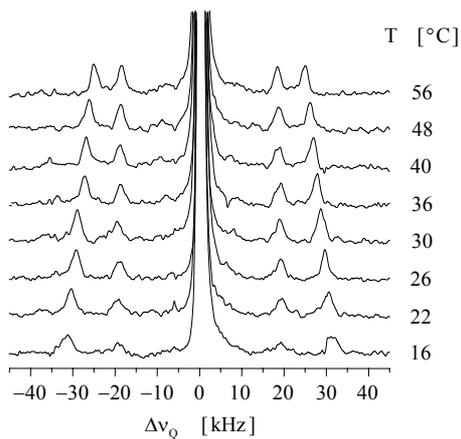


Abbildung 4.56: <sup>2</sup>H-NMR-Spektrenarray lamellarer Membranen bestehend aus PSMd<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>)/POPC im molaren Verhältnis von 1:2; n<sub>w</sub> = 27.

In den respektiven Temperaturscans der PSM/POPC<sub>31</sub>-Mischungen der Verhältnisse 2:1 & 1:2 deutet sich bis 16°C bei keiner der Proben der Übergang zur geordneten Phase an. Dieser dürfte erst bei tieferen Temperaturen auftreten.

In Kap. 4.2.1 (Abb. 4.48a)) wurde für das C<sub>2</sub>-Segment der Acylkette des PSMd<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>) schon oberhalb von 40°C eine Signalverbreiterung gefunden, die der vorzeitigen Verfestigung des Interfaces zugeschrieben wurde. Es stellt sich daher die Frage, ob ähnliche Beobachtungen auch in den Mischungen mit dem POPC gemacht werden können. Abb. 4.56 zeigt einen Temperaturarray der <sup>2</sup>H-NMR-Spektren für Membranen aus PSMd<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>)/POPC 1:2.

Bei 16°C kann der Beginn einer Signalverbreiterung festgestellt werden. Bei der gleichen Temperatur tauchen auch im gesamten Acylketten-<sup>2</sup>H-Spektrum langsam Gelphasenanteile auf. Es ist daher anzunehmen, dass die thermotrope Separation der Interface-Versteifung und des Einfrierens der Kettenbeweglichkeit durch die Gegenwart des POPCs zumindest reduziert wird.

#### *Ordnungsparameterprofile*

Aus den Quadrupolaufspaltungen deuterierter Lipidketten lassen sich nach Gl. (2.17) Ordnungsparameterprofile erstellen, entsprechend der Annahme, dass der Ordnungsparameter entlang der Alkylkette kontinuierlich abnimmt (s. Kap. 2.1.3, S. 42).<sup>[183]</sup>

Eine Ausnahme bildet dabei die C<sub>2</sub>-Position der sn-2-Kette von den Glycero-phospholipiden bzw. der N-Acylkette des SM (vgl. Abb. 4.45a) mit Abb. 4.48a)). Das Quadrupolsplitting dieser Deuteronen ist reduziert, weil sich der Kettenanfang im Mittel nahezu parallel zur Membranoberfläche befindet. Zudem sind diese Deuteronen inäquivalent und führen zu unterschiedlichen Aufspaltungen. Sie werden daher in den Ordnungsparameterprofilen nicht mit aufgeführt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten wurde auch bei sn-1-deutierten Lipiden das C<sub>2</sub>-Segment in der Auswertung nicht mit berücksichtigt.

Wie anhand der Spektren in Abb. 4.49, 4.52 und 4.53 zu sehen ist, können die einzelnen Resonanzen der Positionen C<sub>3</sub> bis C<sub>10</sub> teilweise nicht vollständig aufgelöst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher entsprechend der Annahme von Seelig et al.<sup>[183]</sup> auch für die Deuteronen am Kettenanfang eine Zuordnung von  $\Delta\nu_Q$  mit kontinuierlicher Abnahme von  $\Delta\nu_Q$  mit aufsteigender Kettenposition getroffen. In der Literatur wird vielfach für die C<sub>3</sub>–C<sub>10</sub>-Deuteronen eine einheitliche Zuordnung von  $\Delta\nu_Q$  zum Maximum der koaleszierten Signale vorgenommen, was jedoch fragwürdiger als die in dieser Arbeit verwendete Methode erscheint.

Ein Vergleich der Ordnungsparameter für die reinen Lipide (PSM und POPC) zeigt, dass das  $|S_{CD}|$  der terminalen Methylgruppe beim PSMd<sub>31</sub> und beim POPCd<sub>31</sub> nahezu Null ist. Allerdings besitzt das PSMd<sub>31</sub>-Profil danach einen wesentlich steileren Anstieg als dasjenige des POPCd<sub>31</sub>. Damit einhergehend liegt der Plateaubereich beim reinen PSMd<sub>31</sub> für die Kettensegmente nahe der Carbonylbindung um knapp 0,1

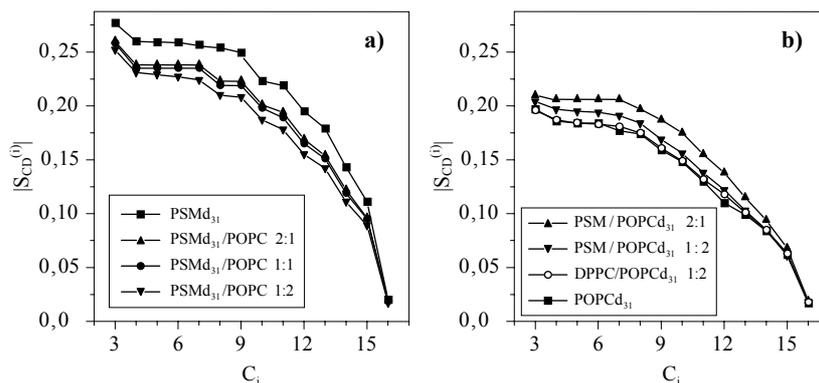


Abbildung 4.57: Ordnungparameterprofile binärer Systeme bestehend aus SM und POPC bei  $T = 48^\circ\text{C}$  aufgetragen gegen die Segmentposition der N-Acyllkette des SM bzw. der sn-1-Kette des POPC. Zu Vergleichszwecken sind auch die Profile reiner  $\text{PSMd}_{31}$ - bzw.  $\text{POPCd}_{31}$ -Membranen abgebildet, sowie der Mischung  $\text{DPPC}/\text{POPCd}_{31}$  1:2.

über demjenigen des reinen  $\text{POPCd}_{31}$  und erstreckt sich auch weiter in Richtung Kettenmitte als bei letzterem. SM- bzw. POPC-Membranen besitzen folglich in der fluiden Phase im *hydrophobic core* mehr oder weniger die gleiche Ordnung. Mit abnehmender Kettenposition, wirkt sich jedoch die Unterschiedlichkeit der Interfacestruktur und der Eigenschaften dieses Lipidbereichs beim PSM und POPC immer stärker auf die Ordnungsparameter aus.

Bei den binären PSM/POPC-Systemen offenbart sich in den Ordnungsparametern des Plateaubereichs ein stärkerer Einfluss des POPC auf das PSM als umgekehrt. Dabei ist beim  $\text{PSMd}_{31}$  die größte Abnahme der  $|\text{SCD}^{(0)}|$  für den Übergang vom reinen  $\text{PSMd}_{31}$  zu  $\text{PSMd}_{31}/\text{POPC}$  2:1 zu verzeichnen. Eine weitere Erhöhung des POPC-Anteils hat dagegen eine vergleichsweise geringe zusätzliche Erniedrigung der  $|\text{SCD}^{(0)}|$ -Werte für das  $\text{PSMd}_{31}$  zur Folge.

Die Verkleinerung der PSM-Ordnungsparameter durch das POPC geht auf eine Erhöhung der Fluidität der PSM-Lipide zurück. Das kann verstanden werden, wenn man berücksichtigt, dass  $T_m$  für das POPC unterhalb von  $0^\circ\text{C}$  und damit weit unterhalb desjenigen des PSM liegt. Befinden sich beide Lipide in der flüssig-kristallinen Phase, besitzt damit POPC gegenüber dem SM bei gleicher absoluter Temperatur eine sehr viel höhere reduzierte Temperatur  $T_r = |T - T_m|/T_m$ .<sup>47)</sup>

Der differentielle Effekt des PSM auf die  $|\text{SCD}^{(0)}|$ -Werte des  $\text{POPCd}_{31}$  (Abb. 4.57b)) beginnt sich ab dem Methylensegment  $C_4$  deutlich bemerkbar zu machen, also in et-

<sup>47)</sup> In die Bestimmungsgleichung für  $T_r$  sind sämtliche Temperaturen in Kelvin einzusetzen.

wa auf der Höhe der *trans*-Doppelbindung des Sphingosins ( $C_4=C_5$ ). Zwar wurde bisher nicht gezeigt, dass sich Segmente gleicher Indizes in der sn-1-Kette des POPC und in der Sphingosinkette von SM in etwa auf gleicher Höhe im *hydrocarbon core* befinden; eine derartige Annahme erscheint jedoch bei einem Vergleich der Molekülgeometrien gerechtfertigt. Bis zum  $C_7$ -Segment steigt der relative Unterschied der Ordnungsparameter auf ungefähr 8 bis 12% für PSM/POPCd<sub>31</sub> 1:2 bzw. 2:1 bezogen auf das reine POPC. Dabei erhöhen sich die in Abb. 4.57b) dargestellten  $|S_{CD}^{(i)}|$ -Werte des POPCd<sub>31</sub> erwartungsgemäß umso stärker je größer der Anteil an SM ist.

Tauscht man das PSM durch DPPC in der 1:2-Mischung mit POPC aus, erhält man bei 33Mol% DPPC nach Abb. 4.57b) praktisch die gleiche  $|S_{CD}^{(i)}|$ -Kurve, die sich für das reine POPCd<sub>31</sub> ergibt. Das heißt, die Ordnung der POPC-Komponente bleibt, im Gegensatz zu den PSM/POPC-Gemischen, durch das DPPC weitgehend unbeeinflusst. Demgegenüber zeigt sich in Abb. 4.58 durchaus eine Verringerung der Ordnung des DPPCd<sub>62</sub> durch die Zugabe von POPC.

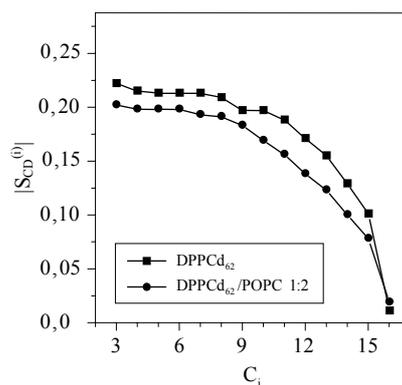


Abbildung 4.58: Ordnungparameterprofil des DPPCd<sub>62</sub> in der reinen lamellaren Phase sowie im binären DPPCd<sub>62</sub>/POPC-System bei  $T = 48^\circ\text{C}$ .

#### Längen und Flächen der Acylketten

Aus den Ordnungparameterprofilen lassen sich unter Vernachlässigung möglicher *back bending*-Konformationen mittlere molekulare Größen wie etwa die Länge  $L_C$  und die Fläche  $A_C$  der Acylketten für verschiedene Temperaturen berechnen (vgl. Kap. 2.1.4). Die so erhaltenen mittleren Kettenlängen werden maximal um 1,5% zu groß kalkuliert.<sup>[190]</sup> Bei den Flächen wird im folgenden zwischen der über die ganze Kette gemittelten Fläche  $A_{C,m}$  und der Kettenfläche  $A_{C,int}$  in unmittelbarer Nähe des Interfaces unterschieden.

Abb. 4.59 zeigt die Änderungen von  $L_C$  und  $A_C$  für das reine PSMD<sub>31</sub> sowie in unterschiedlichen Mischungen mit POPC. Aus den Graphen geht hervor, dass die mittlere

Acylkettenfläche beim PSM proportional mit dem POPC-Gehalt zunimmt. Entsprechend reduziert sich die Kettenlänge um  $0,5\text{\AA}$  bis  $1,5\text{\AA}$ .

Bei allen vier Membranen ist eine nur geringfügige Änderung der Kettenflächen im Interface-Bereich mit steigender Temperatur erkennbar, während  $A_{C,m}$  sehr viel stärker zunimmt. Dieser Trend macht sich auch in den lateralen Ausdehnungskoeffizienten  $\alpha_{\perp,m}$  und  $\alpha_{\perp,int}$ , die in Tab. 4.13 zusammengefasst sind, bemerkbar.  $\alpha_{\perp,m}$  ist gegenüber  $\alpha_{\perp,int}$  durchschnittlich um 55–65% größer. In Analogie zu den Ordnungsparemeterprofilen unterscheiden sich die Kettenlängen und -flächen der beiden PSM/POPC-Mischungen mit den molaren Verhältnissen 2:1 und 1:1 fast gar nicht.

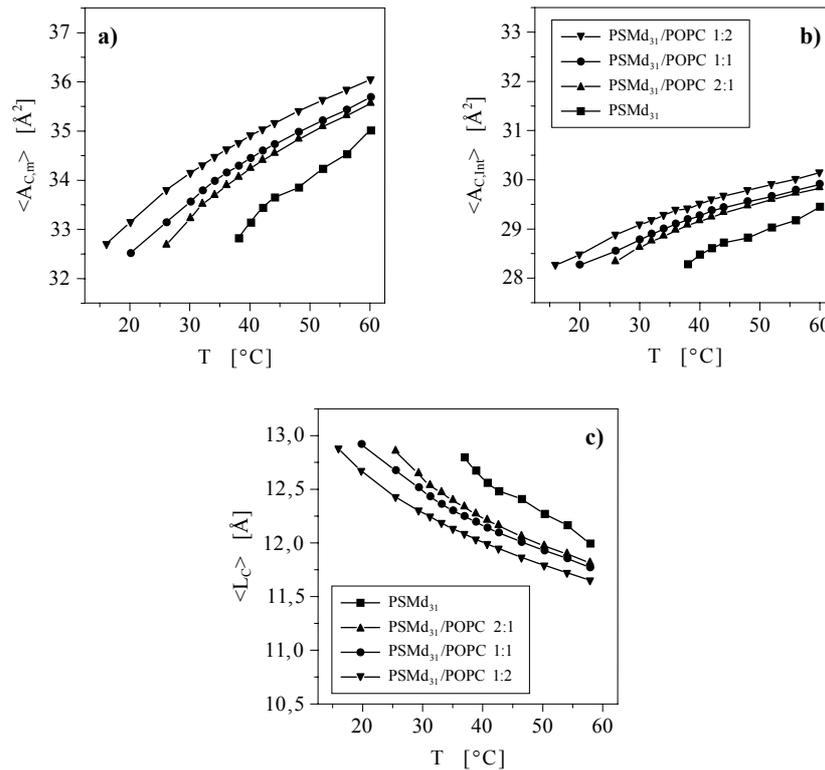


Abbildung 4.59: Mittlere Acylkettenlängen und -flächen des reinen PSMd<sub>31</sub> sowie in verschiedenen Mischungen mit POPC in der  $L_{\alpha}$ -Phase bei voller Hydratation;  $n_w = 31-39$ .

Die geringere Kettenordnung des POPC spiegelt sich, wie in Abb. 4.60 ersichtlich, auch in einer geringeren mittleren Kettenlänge und einer damit einhergehenden größeren Acylkettenfläche wider, aufgrund der ungesättigten sn-2-Kette und der höheren reduzierten Temperatur gegenüber den gesättigten Lipiden.

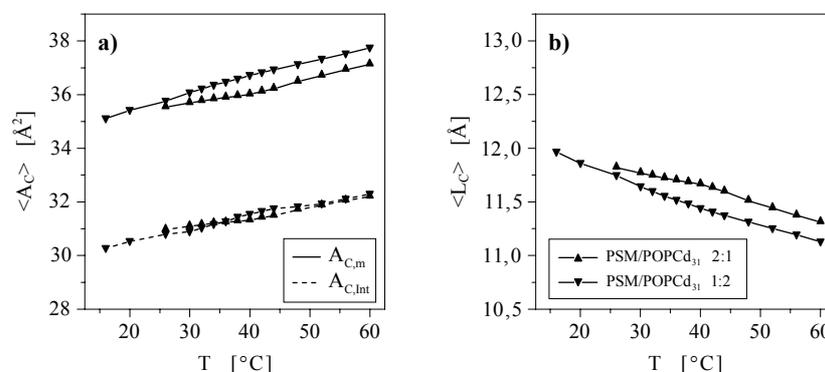


Abbildung 4.60: Mittlere Acylkettenlängen und -flächen des POPCd<sub>31</sub> in verschiedenen Mischungen mit PSM in der  $L_{\alpha}$ -Phase bei voller Hydratation;  $n_w = 27\text{--}36$ . Für die Flächen erfolgt eine Differenzierung zwischen  $A_{C,m}$  und  $A_{C,int}$  (s. Text, S. 201).

Abb. 4.60 kann ferner entnommen werden, dass in der  $L_{\alpha}$ -Phase das PSM eine geringere ordnende Wirkung auf das POPC zu besitzen scheint als letzteres die Fluidität des PSM in den Mischungen erhöht (vgl. Abb. 4.59). Speziell die Kettenfläche  $A_{C,int}$  in der Nähe des Interfaces ist, zumindest bei Erhöhung des SM-Gehalts von 33Mol% auf 67Mol%, nahezu invariant. Diese Tendenz spiegelt sich auch in den Ausdehnungskoeffizienten parallel zu Direktorachse  $\alpha_{\parallel}$  wider (Tab. 4.13): Während  $\alpha_{\parallel}$  des PSM beim Übergang von der PSM/POPC-2:1- zur 1:2-Mischung um ca. 18% sinkt, nimmt umgekehrt  $\alpha_{\parallel}$  für das POPC nur um ca. 10% zu.

Schließlich fällt auf, dass sich bei Temperaturerhöhung die Acylkettenflächen des POPC im Vergleich zum PSM nur wenig ändern. Entsprechend bleiben auch die  $L_C$ -Werte für  $16^{\circ}\text{C} \leq T \leq 60^{\circ}\text{C}$  in einem engen Bereich von 11,1–12,0 $\text{\AA}$ .

Die bei Austausch des PSM durch das DPPC sich ergebenden Längen und Acylkettenflächen sind für das DPPC/POPC-1:2-System in Abb. 4.61 enthalten. Bei hohen Temperaturen tritt eine Annäherung von  $A_C$  bzw.  $L_C$  für das DPPC und POPC auf, die bei  $A_{C,int}$  sogar zur Koaleszenz für  $T > 50^{\circ}\text{C}$  führt. Dies zeigt erneut, dass die Eigenschaften des Kettenanfangs wesentlich durch das Interface bestimmt werden. Dagegen werden die tiefer im hydrophoben Membrankern lokalisierten Segmente stärker durch die Kettenstruktur beeinflusst, z.B. durch etwaige Doppelbindungen.

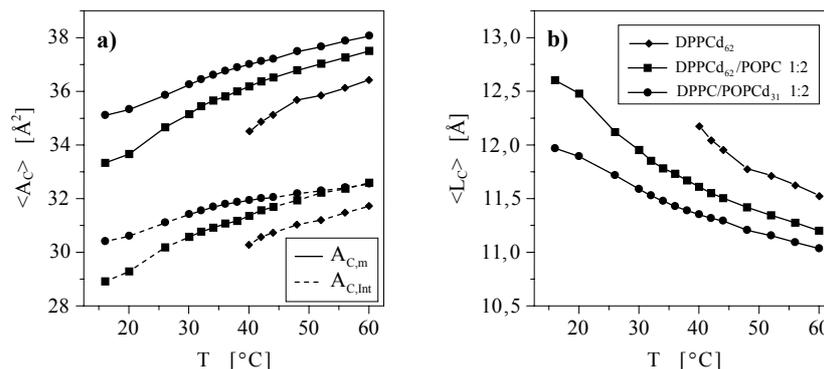


Abbildung 4.61: Angabe der mittleren Acylkettenlängen  $L_C$  und Flächen  $A_{C,m}$  bzw.  $A_{C,int}$  in voll hydratisierten DPPC/POPC-Membranen oberhalb von  $T_m$  beider Lipide sowie für das reine DPPCd<sub>62</sub>;  $n_w = 38-39$ .

	$\alpha_{\parallel} [10^{-3} \cdot \text{\AA}/^\circ\text{C}]$	$\alpha_{\perp,m} [10^{-3} \cdot \text{\AA}^2/^\circ\text{C}]$	$\alpha_{\perp,int} [10^{-3} \cdot \text{\AA}^2/^\circ\text{C}]$
PSMd <sub>31</sub>	-2,70	1,35	0,83
PSMd <sub>31</sub> /POPC 2:1	-1,94	0,97	0,59
PSMd <sub>31</sub> /POPC 1:1	-1,78	0,89	0,54
PSMd <sub>31</sub> /POPC 1:2	-1,64	0,83	0,54
PSM/POPCd <sub>31</sub> 2:1	-1,53	0,77	0,69
PSM/POPCd <sub>31</sub> 1:2	-1,39	0,70	0,57
DPPC/POPCd <sub>31</sub> 1:2	-1,44	0,72	0,48
DPPCd <sub>62</sub>	-2,61	1,30	1,10
DPPCd <sub>62</sub> /POPC 1:2	-1,82	0,91	0,99

Tabelle 4.13: Ausdehnungskoeffizienten verschiedener POPC-haltiger binärer Bilayer sowie des reinen PSMd<sub>31</sub> bzw. DPPCd<sub>62</sub>.  $\alpha_{\parallel}$  bezieht sich auf die Richtung parallel zur Direktorachse. In lateraler Richtung wird zwischen der Alkylkettenexpansion nahe des Interfaces  $\alpha_{\perp,int}$  und der über die gesamte Kette gemittelten  $\alpha_{\perp,m}$  unterschieden.

Zur Bestimmung der in Tab. 4.13 angegebenen Ausdehnungskoeffizienten wurden die Kettenlängen und -flächen logarithmisch gegen  $T$  aufgetragen und die so erhaltenen Kurven für  $T = 40-60^\circ\text{C}$  gemäß (2.27) & (2.28) gefittet. Innerhalb dieses Temperaturbereichs sind alle untersuchten Mischungen vollständig in der  $L_\alpha$ -Phase.

#### 4.2.4 Diskussion

Zunächst sollen einige wesentliche Literaturdaten kurz vorgestellt werden:

- Untersuchungen von SM/POPC-Monolayern auf silanisierendem Glas<sup>[51]</sup> mit molaren Verhältnissen zwischen 2:1 und 1:4 zeigen bei Raumtemperatur eine makroskopische Phasentrennung in PC-reiche *liquid expanded* und SM-reiche *liquid condensed* Phasen. Cholesterin assoziiert vor allem mit den *liquid condensed* Domänen und verstärkt die laterale Trennung von POPC und SM.
- In ternären Mischungen aus SM, PC und Cholesterin ist die Wechselwirkung zwischen dem Sterol und den PC-Lipiden schwächer, wenn ungesättigte Fettsäureketten an das Glycerol-Rückgrat angehängt sind.<sup>[342]</sup> Der Unterschied zwischen Systemen mit gesättigtem bzw. ungesättigtem PC hängt dabei nicht vom SM/PC-Verhältnis sondern von demjenigen des SM zu Chol ab.
- Untracht und Shipley<sup>[341]</sup> erstellten aus DSC- und Röntgenmessungen ein ternäres Phasendiagramm für das System BBSM/EYPC/H<sub>2</sub>O für den Temperaturbereich 10–44°C. Daraus kann entnommen werden, dass sich bei einem SM-Gehalt von mehr als 33Mol% während des Abkühlens auf 20°C durch laterale Phasenseparation zunehmend eine lamellare hoch SM-reiche Gelphase ausbildet.

##### *Gegenseitige Beeinflussung von SM und POPC*

Die aus den Messungen erhaltenen Daten enthüllen u.a. spezifische Einflüsse beider Lipide auf die jeweilige Partnerkomponente. So findet man für alle Mischmembranen mit steigender Temperatur einen nahezu mit der gleichen Steigung stattfindenden Abfall von  $\Delta v_Q$  im Plateaubereich, also in Interface-Nähe. Infolgedessen liegt die Vermutung nahe, dass das POPC das H-Brückennetzwerk im Interface-Bereich stört, weshalb keine Temperaturspezifität von  $\Delta v_Q$  (z.B. Sprünge oder Knicke bei 36–38°C) mehr auftritt.

Die für die  $\omega$ -endständige Methylgruppe des PSMd<sub>31</sub> in den Mischungen beobachtbaren Fluktuationen im Verlauf von  $\Delta v_Q$  machen deutlich, dass der Phasenübergang in den L<sub>α</sub>-Zustand durch das *Verhalten der Acylketten* des PSMd<sub>31</sub> mit beeinflusst wird. Andererseits zeigt die Temperaturabhängigkeit von  $\Delta v_Q$  des Plateaubereichs, sprich der Interface-nahen Kettensegmente beim POPCd<sub>31</sub> (Abb. 4.51a)) in der Mischung mit 67Mol% PSM einen „Knick“. Da das POPC bei diesen Temperaturen unverändert im L<sub>α</sub>-Zustand vorliegt, muss die Ursache hierfür in einer *signifikanten Änderung der Interface-Eigenschaften* des PSM beruhen, wodurch möglicherweise auch eine stärkere Einbindung des POPC in das intermolekulare H-Brückennetzwerk erfolgt. Beide Befunde unterstreichen die hinsichtlich der chemischen Bausteine, aus denen Lipide zusammengesetzt sind, vorherrschende Kooperativität des

Schmelz- bzw. Erstarrungsprozesses beim Übergang zwischen der geordneten und der  $L_{\alpha}$ -Phase. Das heißt, die frühzeitige Verfestigung des SM-Interfaces geht mit dem Einfrieren von Bewegungsmoden der Alkylketten einher.

Man kann annehmen, dass die höhere Interface-Steifigkeit im SM auf eine Verlängerung der mittleren Lebensdauer der H-Brücken zurückzuführen ist, was einer Erhöhung der intermolekularen Wechselwirkung gleichkommt. Die hierdurch stattfindende Membranverdichtung verringert die mittlere Zahl der *gauche*-Konformationen pro Lipid und verstärkt dadurch die intermolekularen London-Kräfte infolge einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens *on-resonanter* Ladungsfluktuationen in den Ketten benachbarter Lipide (oder des gleichen Lipids) (s. Kap. 1.1.1).

Ein Plot der Quadrupolaufspaltungen für die Deuteronen sämtlicher Kettensegmente (Daten nicht abgebildet) zeigt, dass die Ausprägung des beim PSM/POPC<sub>d<sub>31</sub></sub>-2:1 im Plateaubereich erkennbaren „Knicks“ mit steigender Kettenposition bis zur  $\omega$ -endständigen Methylgruppe erst ab etwa dem C<sub>13</sub>-Segment immer schwächer wird. Davor ist sie bei allen Acylkettenpositionen ungefähr gleich ausgeprägt. Das mag ein Hinweis auf die Eintauchtiefe der PSM-Lipide in die POPC-Membranmatrix sein.

Im Gegensatz zum POPC bewirkt offenbar der ungesättigte Kettenabschnitt des Sphingosins höchstens eine geringfügige Erniedrigung von  $T_m$ . Nimmt man DPPC – mit  $T_m = 41,25^\circ\text{C}$  [73] – sowie POPC – mit  $T_m = -5^\circ\text{C}$  [344] – als Vergleichslipide, kommt man zu dem Schluss, dass sich die Erhöhung der Kettenbeweglichkeit durch die Doppelbindung im Sphingosin und die Verfestigung des Interfaces durch eine stärkere intermolekulare H-Brückenausbildung gegenüber den PC-Lipiden in ihrer Wirkung auf  $T_m$  ungefähr ausgleichen.

#### *Domänenbildung*

Die von Untracht und Shipley [341] bereits beobachtete Koexistenz einer geordneten lamellaren SM-reichen Gelphase mit einer fluiden PC-reicheren Phase kann bei den hier untersuchten voll hydratisierten Mischungen sowohl in den Methylgruppensignalen als auch im gesamten <sup>2</sup>H-NMR-Spektrum der Acylkette des PSM<sub>d<sub>31</sub></sub> identifiziert werden. Dabei beginnt der Koexistenzbereich bei umso niedrigerer Temperatur, je höher der POPC-Anteil in den Proben liegt.

#### *Ordnungsparameter*

Lamellare binäre Membranen wurden im letzten Jahrtausend bereits vielfach intensiv untersucht. Für Lipide mit ungefähr gleichen Kettenlängen wurde dabei häufig folgende Beobachtung gemacht:

Bei mehreren ausschließlich aus Glycerophospholipiden gebildeten Mischungen wurde eine Unabhängigkeit von  $|S_{CD}|$  davon gefunden, welche Komponente deuteriert eingesetzt wurde, wie z.B. bei DPPE plus DPPC [347,348] oder bei verschiedenen Mischungen von POPC mit DPPC, DPPE, DMPC, DPPS. [348] Zwar fanden Sankaram

und Thompson<sup>[349]</sup> in Untersuchungen von DMPC/DSPC-Mischungen in der Gel-phase und im Übergangsbereich zum flüssig-kristallinen Zustand teilweise Unterschiede in den  $|S_{CD}|$ -Werten, je nachdem welche der beiden Komponenten deutlicher vorlag, doch spielt dabei vermutlich auch die partielle Phasenseparation eine Rolle, die allgemein bei Gemischen auftritt, wenn sich die Kettenlänge der eingesetzten Lipide um mehr als 4 Methylengruppen unterscheidet.<sup>[350]</sup>

Für die hier untersuchten lamellaren Mischungen aus PSM und POPC in der fluiden Phase unterscheiden sich die  $|S_{CD}^{(i)}|$ -Werte des deuterierten PSM von denen des POPCd<sub>31</sub> bei identischen Mischungsverhältnissen (Abb. 4.57).

Man kann annehmen, dass die  $|S_{CD}|$ -Änderungen für das POPC in den PSM/POPC-Membranen vorwiegend auf eine intermolekulare Wechselwirkung im Interface-Bereich zurückzuführen ist, bei der die Phosphatgruppe von PC-Lipiden vermutlich mit in das H-Brückennetzwerk des SM eingliedert wird.<sup>[329]</sup> Dies steht im Einklang mit den Befunden der weiter oben behandelten Temperaturabhängigkeiten der Quadrupolaufspaltungen (Abb. 4.51). Die H-Verbrückung mit dem PSM führt zu einer dichteren Lipidpackung in den PSM/POPC-Membranen gegenüber dem reinen POPC, und die Erhöhung der Ordnung des POPC geht somit vor allem auf eine Reduktion der *gauche*-Isomerisierungen in Anwesenheit des PSM zurück. Die entsprechenden <sup>2</sup>H-HNMR-Spektren zeigen darüber hinaus, dass sich insbesondere im Plateaubereich die Linienbreite bei Zugabe von SM erhöht.

Da das DPPC die Ausbildung intermolekularer H-Brücken nicht wie das SM fördert, sind die Ordnungsparameter des POPC in der DPPC/POPC-1:2-Mischung praktisch mit denen der reinen POPC-Membranen identisch. Die beim DPPC dagegen festgestellte Erhöhung der Lipidfluidität in Gegenwart des POPC kann in Analogie zu den weiter oben dargestellten Überlegungen bzgl. der gegenseitigen Beeinflussung des SM und des POPC auf eine Reduktion der Stärke der London-Kräfte zurückgeführt werden.

#### *Kettenlängen & -flächen*

Bei der Berechnung der geometrischen Parameter der Alkylketten von Lipiden in der  $L_{\alpha}$ -Phase kann nach Gl. (2.20) aus den Ordnungsparametern unter Vernachlässigung von Rückfaltungskonformationen (*back bending* bzw. *back folding*) eine mittlere Kettenlänge  $L_C$  erhalten werden.  $L_C$  ist somit als obere Grenze für die wahren Kettenlängen anzusehen. Unter Verwendung des von Nagle et al.<sup>[351]</sup> bestimmten Kettensegmentvolumens  $V_{CH_2}$  lässt sich nach Gl. (2.24) auch die mittlere Querschnittsfläche  $A_{C,m}$  von Acylketten berechnen. Der so erhaltene Wert  $A_{C,m}$  ist damit umgekehrt als untere Grenze für die wahre durchschnittliche Kettenquerschnittsfläche anzusehen.

Die mit steigendem PSM-Gehalt stattfindende Reduktion der *gauche*-Isomerisierungen bei POPC bringt auch eine Verlängerung der sn-1-Kette des POPC in den binä-

ren Bilayern mit sich. Die sich über den größten Teil <sup>48)</sup> der sn-1-Kette des POPC erstreckende richtende Wirkung des PSM spiegelt sich gleichfalls in den lateralen Ausdehnungskoeffizienten  $\alpha_{\perp,m}$  und  $\alpha_{\perp,int}$  wider. Das kann wie folgt verstanden werden: je mehr SM eine Membran enthält, desto stärker nimmt die richtende Wirkung des SM mit sinkender Temperatur zu und desto größer sind damit auch die lateralen Ausdehnungskoeffizienten. Die in Tab. 4.13 angegebenen Werte bestätigen diese Überlegung. Zudem wurden ähnliche Effekte bereits bei Mischungen verschiedener Glycerophospholipide beobachtet.<sup>[352]</sup>

---

<sup>48)</sup> Im Abschnitt *Gegenseitige Beeinflussung von SM und POPC* wurde darauf hingewiesen, dass möglicherweise das PSM nur bis ungefähr zur C<sub>13</sub>- oder C<sub>14</sub>-Position der sn-1-Kette des POPC in die Membran eintaucht.

### 4.2.5 Cholesterol-haltige binäre Systeme

Nach dem Temperatur- und Phasenverhalten des reinen PSM<sup>49)</sup> sowie von Mischungen aus PSM/POPC wurde als nächstes der Einfluss von Cholesterol (Chol) auf die Eigenschaften von SM-Bilayern untersucht. Binäre Mischungen dieses Sterols mit SM waren bereits vielfach Gegenstand von Forschungsstudien (als Bsp. sei auf [353]–[355] verwiesen). In dieser Arbeit wurden Messungen an lamellaren, voll hydratisierten PSMd<sub>31</sub>/Chol-Membranen mit 10Mol%, 20Mol% und 33Mol% Cholesterol mittels <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie durchgeführt. Für das Herauskrystallisieren möglicher SM-spezifischer Wechselwirkungen mit dem Sterol dienen DPPC/Chol-Mischungen mit einem molaren Verhältnis von 4:1 (20Mol% Chol) bzw. 2:1 (33Mol% Chol) als Referenzen.

Da das Sterol die Lipidgitterstruktur signifikant stört, gleichzeitig jedoch die Kettenordnung der Phospholipide gegenüber den reinen Lipidmembranen deutlich erhöht spricht man speziell bei Cholesterol-haltigen Membranen gewöhnlich von einer *liquid ordered* L<sub>O</sub>- bzw. *liquid disordered* L<sub>d</sub>-Phase.<sup>[356,357]</sup>

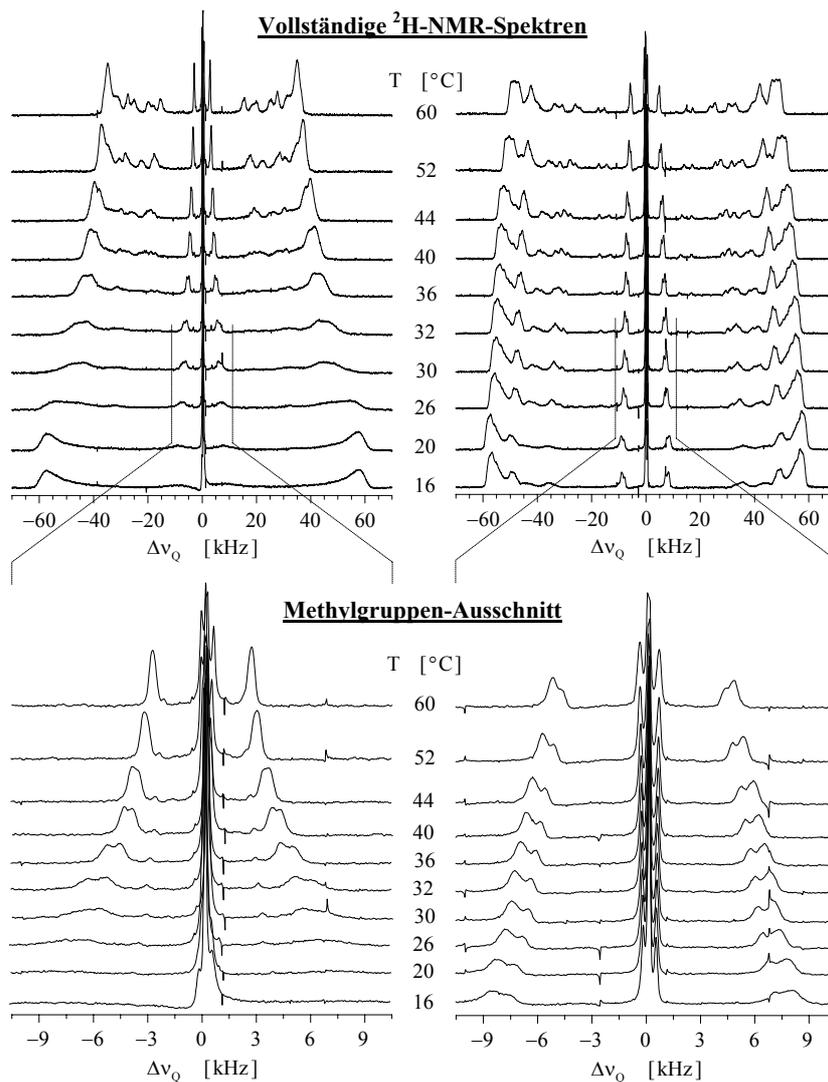
Abb. 4.62 zeigt eine Serie von NMR-Spektren für PSMd<sub>31</sub>-Membranen mit einem Anteil von 10Mol% bzw. 33Mol% Cholesterol. Beobachtet wird:

- Die Quadrupolaufspaltungen des PSMd<sub>31</sub> sind durch die Gegenwart des Cholesterols stark verbreitert, wobei die Zunahme von  $\Delta\nu_Q$  mit dem Cholesterol-Anteil korreliert ist.
- Bereits bei 10% Cholesterol ist der Phasenübergang zur L<sub>d</sub>-Phase verbreitert. Die Linienbreiten nehmen bei beiden Mischungen oberhalb von T<sub>m</sub> des PSMd<sub>31</sub> im Vergleich zum reinen Lipid deutlich zu, unterhalb von T<sub>m</sub> dagegen ab. Dementsprechend ist die Membranfluidität in der L<sub>O</sub>- gegenüber der L<sub>d</sub>-Phase herabgesetzt, die Flexibilität in der L<sub>d</sub>-Phase dagegen im Vergleich zur Gelphase erhöht.
- Bei 33% Cholesterol ist im untersuchten Temperaturbereich kein Phasenübergang mehr auszumachen. Gleiches gilt für 20% (vgl. *Spektralmomente*).
- Ein interessantes Phänomen tritt in Erscheinung, wenn lediglich die Methylgruppensignale betrachtet werden. Hierbei findet man bei PSMd<sub>31</sub>/Chol 9:1 im Bereich des thermotropen Phasenübergangs von der L<sub>d</sub>- zur L<sub>O</sub>-Phase eine Aufspaltung der <sup>2</sup>H-NMR-Resonanzen in zwei sich überlappende Signale.
- Für die Membranen aus PSMd<sub>31</sub>/Chol 2:1 bleibt die Signalaufspaltung der Methylgruppen über den gesamten Temperaturbereich erhalten.

Die letzten beiden Punkte lassen sich auf die Koexistenz einer Chol-reichen und einer Chol-armen Phase in den Membranen zurückführen. Bemerkenswert daran ist,

---

<sup>49)</sup> PSM: Palmitoyl-Sphingomyelin; vgl. auch S. X–XII für eine vollständige Zusammenstellung aller in dieser Arbeit verwendeten (Lipid-)Abkürzungen.



a) N-Palmitoyl-SM- $d_{31}$  + 10Mol% Chol  
mit  $n_w = 38\text{Mol/Mol}$ .

b) N-Palmitoyl-SM- $d_{31}$  + 33Mol% Chol  
mit  $n_w = 40\text{Mol/Mol}$ .

Abbildung 4.62:  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren eines Temperatur-Arrays der Mischsysteme PSM $d_{31}$  + 10Mol% bzw. 33Mol% Cholesterol. Oben sind die vollständigen  $^2\text{H}$ -Spektren und unten die vergrößerten Methylgruppenbereiche mit dem zentralen  $\text{D}_2\text{O}$ -Signal dargestellt.

dass sich die Domänenbildung nicht nur auf den unmittelbaren Phasenübergangsbereich bei  $T_m$  von  $\text{PSMd}_{31}$  beschränkt. Abb. 4.63 stellt für eine bessere Vergleichbarkeit die Methylgruppensignale aller drei  $\text{PSMd}_{31}$ /Chol-Membranen bei  $48^\circ\text{C}$  sowie diejenigen der untersuchten DPPC/Chol-Mischungen dar.

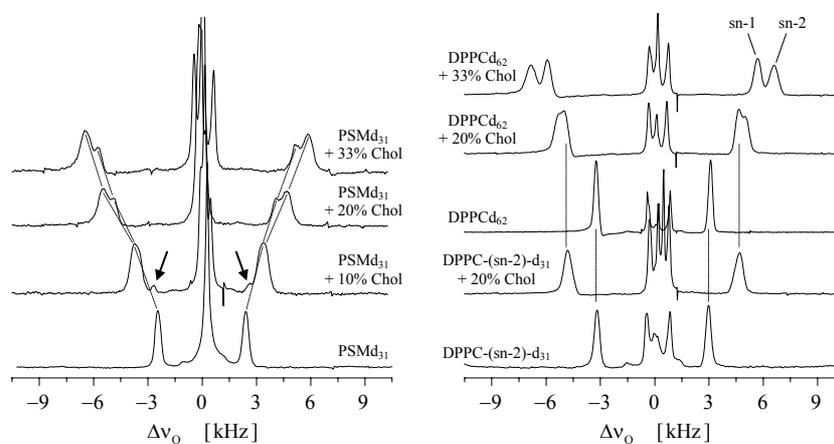


Abbildung 4.63: Vergleich der Methylgruppen-Resonanzen der reinen PSM- bzw. DPPC-Membranen mit denen in Mischungen mit Cholesterin.  $n_w$  lag stets zwischen 31 und 40;  $T = 48^\circ\text{C}$ . Die Pfeile links deuten auf Signale, die möglicherweise einer reinen PSM-Phase entspringen.

Man erkennt:

- In den  $\text{PSMd}_{31}$ /Chol-Mischungen tritt eine kontinuierliche Vergrößerung von  $\Delta\nu_Q$  für die Chol-reiche und die Chol-arme Phase auf. Ein *ausgezeichnetes SM/Chol-Verhältnis*, das in allen drei Mischungen in den Domänen von einer der beiden Phasen vorherrscht, existiert somit nicht.
- Bei dem Mischsystem aus  $\text{DPPC}-(\text{sn-2})-\text{d}_{31}$ /Chol 4:1 tritt keine Signalaufspaltung in Erscheinung; sondern durch die Zugabe von Cholesterin lediglich eine Vergrößerung von  $\Delta\nu_Q$ .
- In dem  $^2\text{H}$ -NMR-Spektrum von  $\text{DPPCd}_{62}$ /Chol 4:1 deutet sich eine beginnende Resonanzaufspaltung an. Aus einem Vergleich mit der Messung des  $\text{DPPC}-(\text{sn-2})-\text{d}_{31}$ /Chol 4:1 geht hervor, dass das innere der beiden Signale der sn-2-Kette zuzuordnen ist. Das äußere muss demnach der Methylgruppe der sn-1-Kette zugewiesen werden.
- Für  $\text{DPPCd}_{62}$ /Chol mit 33Mol% Cholesterin sind die Methylgruppensignale der sn-1- und der sn-2-Kette nahezu vollständig getrennt aufgelöst.

Fasst man sämtliche eben getroffenen Beobachtungen zusammen, ergibt sich als wesentlicher Unterschied zwischen dem DPPC und dem PSM eine laterale Domänenbildung bei SM/Chol-Mischungen oberhalb einer gewissen Mindestkonzentration von Cholesterol unter Ausbildung einer Chol-reichen und einer Chol-armen Phase. Liegen physiologische Temperaturen ( $T \approx 37^\circ\text{C}$ ) vor, existieren bereits in PSM/Chol-Membranen mit 10Mol% Cholesterol unterschiedliche Domänen (vgl. Abb. 4.62). Der Temperaturbereich, in dem Phasenkoexistenz auftritt, dehnt sich mit zunehmendem Cholesterol-Anteil stetig aus (s. wiederum Abb. 4.62). In den DPPC/Chol-Mischungen ließ sich lediglich in unmittelbarer Nähe des Phasenübergangs vom DPPC in den geordneten Zustand Domänenbildung nachweisen (Spektralen nicht abgebildet).

Diese Befunde zeigen, dass eine SM-Chol-spezifische Wechselwirkung existiert, die beim DPPC nicht in Erscheinung tritt. Vermutlich lassen sich die Ergebnisse der DPPC/Chol-Mischungen auch auf die Wechselwirkung andere Glycerophospholipide mit Cholesterol übertragen.

#### *Spektralmomente*

Die aus den  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren nach Gl. (2.29) berechenbaren Spektralmomente  $M_1$  und  $M_2$  sind für die PSMd<sub>31</sub>/Chol mit 20Mol% bzw. 33Mol% Cholesterol neben den Momenten für das reine PSMd<sub>31</sub> als Referenz in Abb. 4.64 dargestellt. Die Spektralmomente der entsprechenden DPPC/Chol-Membranen finden sich in Abb. 4.65.

Abb. 4.64 & 4.65 ist zu entnehmen, dass sich mit sinkender Temperatur der Betrag von  $M_1$  bzw.  $M_2$  kontinuierlich erhöht. Ab einem molaren Cholesterol-Anteil von 20% kann sowohl beim PSM als auch beim DPPC nicht mehr von einem diskreten Übergang zwischen einer fluiden und einer geordneten Phase gesprochen werden. Vielmehr nimmt die Ordnung in den Bilayern kontinuierlich mit sinkender Temperatur zu. Gleiches wurde bereits in früheren Arbeiten gefunden.<sup>[358]</sup> Dass der Übergang zwischen  $L_O$ - und  $L_d$ -Phase in den DPPC/Chol-Mischungen noch erkennbar ist, dürfte an der Schärfe des  $T_m$ -Übergangsbereichs beim DPPC liegen. Dagegen wird der ohnehin schon breite Übergang bei den PSM-Membranen durch Beifügungen von Cholesterol noch mehr verbreitert, so dass schließlich fast lineare Momentverläufe entstehen.

Sowohl bei den PSMd<sub>31</sub>/Chol- als auch bei den DPPCd<sub>62</sub>/Chol-Mischungen tritt mit steigender Temperatur eine Divergenz von  $M_1$  bzw.  $M_2$  für unterschiedliche Cholesterol-Anteile auf. Dabei werden die Spektralmomente umso kleiner, je weniger Cholesterol in den Membranen integriert ist, mit den Momenten der reinen PSMd<sub>31</sub>- bzw. DPPCd<sub>62</sub>-Bilayer als Asymptoten.

In den PSMd<sub>31</sub>-Membranen erhöht die Gegenwart des Cholesterols die Bilayer-Fluidität zwischen  $30^\circ\text{C}$  und  $40^\circ\text{C}$ . Für das DPPCd<sub>62</sub> führt demgegenüber die Beimengung von Cholesterol innerhalb des gesamten untersuchten Temperaturbereichs

zu einer Vergrößerung der Spektralmomente.<sup>50)</sup> Daraus kann allerdings nicht der Schluss gezogen werden, dass die DPPCd<sub>62</sub>/Chol-Membranen stets steifer als die reinen DPPCd<sub>62</sub>-Bilayer sind, da letztere bei ca. 22°C in den L<sub>c</sub>-Zustand übergehen und sich dadurch die Momente absenken.

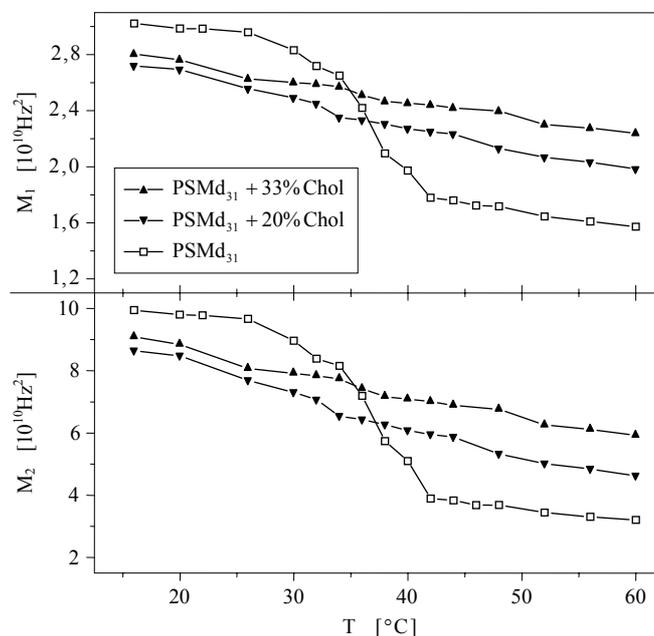


Abbildung 4.64: 1. und 2. Spektralmoment von PSMd<sub>31</sub> in Abhängigkeit von T in reinen Bilayern und in Mischungen mit Cholesterol; 31 ≤ n<sub>w</sub> ≤ 40.

Die <sup>2</sup>H-NMR-Messungen von PSM-Membranen mit 10% Cholesterol führen in etwa zu den gleichen M<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Kurven wie für reine PSM-Multischichten (Daten nicht abgebildet). Das heißt, die Phasenübergangstemperatur wird durch die Gegenwart des Sterols für das PSM nicht verschoben. Die hydrophobe Länge des Sterols entspricht mit 17,5Å in Bilayern aus gesättigten PCs einer mittleren Kettenlänge von 17:0/17:0.<sup>[359]</sup> Daher nimmt T<sub>m</sub> durch Zugabe von Cholesterol bei Lipiden mit kürzeren Ketten zu, wohingegen es bei solchen mit längeren Ketten sinkt.<sup>[359]</sup>

<sup>50)</sup> Der Verlauf von M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub> für das reine DPPCd<sub>62</sub> wurde bereits in Kap. 4.3.1 erläutert.

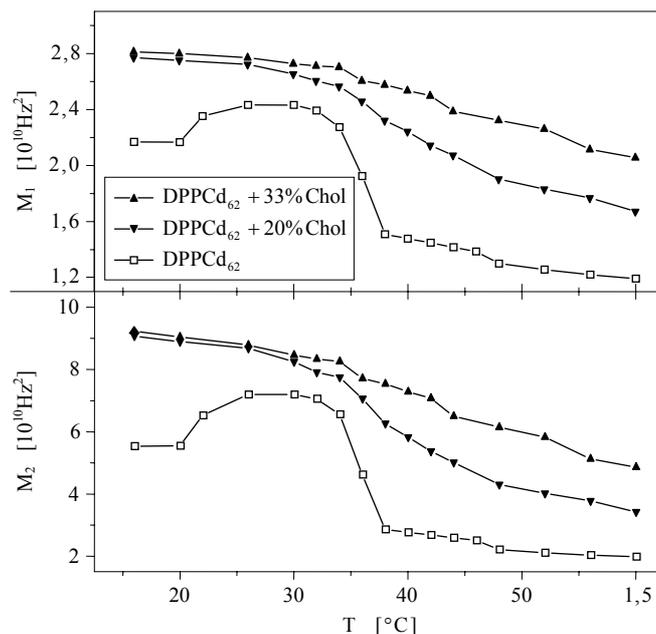


Abbildung 4.65: Temperaturabhängigkeit der ersten beiden Spektralmomente  $M_1$  und  $M_2$  von  $\text{DPPCd}_{62}$  in reinen Lipidmembranen sowie in binären Mischungen mit Cholesterol;  $29 \leq n_w \leq 32$ .

#### Phasenseparation bei $T_m$

Die in Abb. 4.62 und 4.63 an den Methylgruppensignalen erkennbare Koexistenz Chol-reicher und Chol-ärmerer Domänen wirft die Frage nach dem relativen molaren Verhältnis  $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$  der beiden Phasen auf, und ob  $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$  eine Abhängigkeit von der Temperatur besitzt. Die in Abb. 4.62a) für höhere Temperaturen erkennbare Koaleszenz der  $^2\text{H}$ -NMR-Signale bei einem Molanteil von 10% Cholesterol sagt diesbezüglich grundsätzlich nichts aus.<sup>51)</sup>

Für eine Klärung dieser Frage wurden für die drei PSM/Chol-Mischungen die Methylgruppensignale, soweit sich eine Aufspaltung dieser Resonanzen erkennen ließ, durch zwei Lorentzkurven gefittet.<sup>52)</sup> Im Anschluss daran wurde der Quotient ihrer Integrale gebildet. Abb. 4.66 zeigt das Ergebnis dieser Auswertung.

<sup>51)</sup> Ob bei einem molaren Cholesterol-Anteil von 10% für  $T < 30^\circ\text{C}$  nur noch eine Phase vorliegt, ist in den  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren nicht erkennbar, da die Signale stark verbreitert sind.

<sup>52)</sup> Nach Gl. (3.12) (s. Kap. 3.4.3) entspricht der Verlauf einer Resonanz, die aus einem NMR-FID durch Fouriertransformation erhalten wurde, einer Lorentz-Kurve.

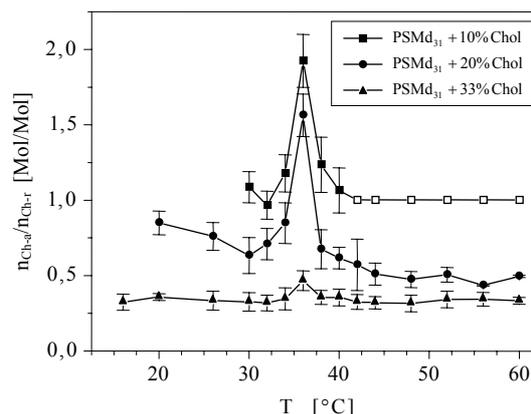


Abbildung 4.66: Temperaturabhängigkeit des molaren Verhältnisses Chol-arter zu Chol-reicher Bilayer-Regionen in PSM/Chol-Membranen. Die für PSMd<sub>31</sub>/Chol 9:1 oberhalb von 40°C eingezeichneten leeren Symbole kennzeichnen den Bereich der Resonanzkoaleszenz. Die Fehlerbalken geben sich aus den Unterschieden zwischen den Integralverhältnissen der linken und rechten Spektrenhälfte.

Die  $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$ -Kurven (in Abb. 4.66) offenbaren ein äußerst interessantes Lipidverhalten von PSM bei  $T_m$ . In allen drei Mischungen tritt exakt am Phasenübergang eine Zunahme der Chol-armen Domänen auf Kosten der Chol-reichen auf. Der Temperaturbereich, in dem diese Änderung von  $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$  stattfindet, beträgt weniger als 10°C. Ober- wie unterhalb von  $T_m$  fällt  $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$  ungefähr auf den gleichen Wert ab. Bei einem Cholesterolgehalt von 33Mol% ist die Vergrößerung des Anteils der Chol-armen Membranregionen gegenüber den Chol-reichen nur noch gering; hingegen steigt das Verhältnis  $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$  bei niedrigerer Cholesterolmenge drastisch an. Für 20Mol% Cholesterol scheint sich im unteren Temperaturbereich  $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$  dem Wert Eins zu nähern.

Die Koexistenz zweier Phasen bei  $T_m$  in SM/Chol-Membranen, von denen eine nur einen geringen Anteil an Cholesterol aufweist, konnte bereits mittels DSC bei Vesikeln, bestehend aus PSM plus einer variablen Cholesterolmenge, festgestellt werden.<sup>[360]</sup> Neben einem scharfen Peak, dessen Maximum sich kontinuierlich von 41°C bei 0% Cholesterol auf 35°C bei 20% Cholesterol verschob, wurde ein fast unabhängig vom Cholesterolanteil bei ca. 42°C auftretender zweiter breiter Peak gefunden. Die Ergebnisse wurden derart interpretiert, dass der scharfe Peak dem Übergang in einer SM-reichen Domäne und der breite demjenigen in einer Chol-reichen zuzuordnen sei.

Die bisher jedoch noch nicht beobachteten und beschrieben in Abb. 466 dargestellten Entmischungsphänomene zeigen, dass der thermotrope Phasenübergang des

PSM durch das Sterol keineswegs weitgehend „eingeebnet“ ist. Vielmehr macht sich dieser durch eine Umverteilung des PSM aus den Chol-reichen in die Chol-armen Domänen bemerkbar.

Da das Ausmaß der Phasenumverteilung vom Gesamtanteil an Cholesterol in den Membranen abhängt und mit steigendem Cholesterol-Gehalt sinkt, stellt sich die Frage, ob sich stabile SM/Chol-Phasen bevorzugt bei bestimmten molaren Mischungsverhältnissen ausbilden.

#### Ordnungsparameter

Auch für die binären Systeme mit Cholesterol konnte eine Zuordnung der Quadrupolspittings  $\Delta v_Q$  zu den verschiedenen Kettenpositionen getroffen werden. Die daraus erhaltenen Ordnungsparameterprofile der Acylketten sind für das PSM<sub>d31</sub> und das DPPC<sub>d62</sub> in Abb. 4.67 zusammengestellt.

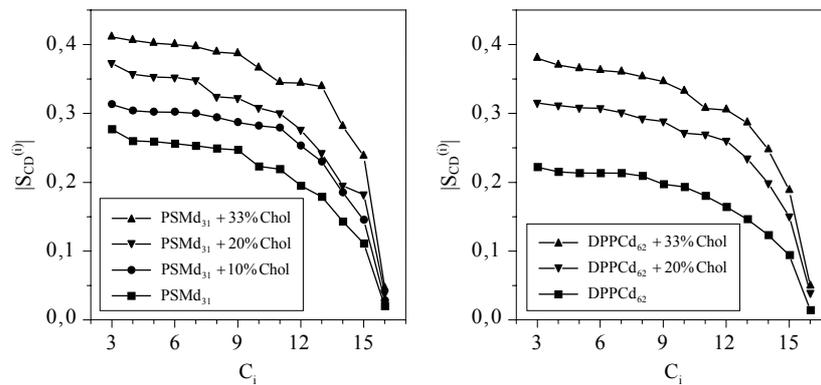


Abbildung 4.67: Ordnungsparameterprofile voll hydratisierter binärer Systeme bestehend aus PSM<sub>d31</sub> bzw. DPPC<sub>d62</sub> + Cholesterol bei  $T = 48^\circ\text{C}$ . Zu Vergleichszwecken sind gleichfalls die Profile der reinen PSM<sub>d31</sub>- bzw. DPPC<sub>d62</sub>-Membranen abgebildet.

Beobachtet wird bei allen Kettensegmenten eine mit dem Cholesterol-Anteil stetig zunehmende Ordnung, die im Bereich des Kettenanfangs am stärksten ausfällt und mehr und mehr abnimmt, je tiefer sich die Segmente im *hydrophobic core* des Bilayers befinden. Dadurch dehnt sich der Plateaubereich weiter ins Ketteninnere aus und der Anstieg der  $|S_{CD}^{(0)}|$ -Kurven im terminalen Kettenabschnitt wird dementsprechend steiler, wobei dieser Effekt beim SM stärker ausgeprägt ist als beim DPPC. Die Vergrößerung der Ordnungsparameter im Kettenanfang ist dagegen bei den PSM<sub>d31</sub>/Chol- und den DPPC<sub>d62</sub>/Chol-Membranen nahezu identisch.

*Längen und Flächen*

Für die PSMd<sub>31</sub>/Chol- und DPPCd<sub>62</sub>/Chol-Membranen ist die Temperaturabhängigkeit der aus den Ordnungsparameterprofilen erhaltenen mittleren Längen und Flächen für die N-Acylkette des PSMd<sub>31</sub> in Abb. 4.68 und für den Mittelwert der beiden sn-Ketten des DPPCd<sub>62</sub> in Abb. 4.69 dargestellt.

Die Flächen und Längen der Acylketten in den Mischungen mit 20% Cholesterol nähern sich sowohl beim PSM als auch beim DPPC mit sinkender Temperatur immer mehr den A<sub>C</sub>- und L<sub>C</sub>-Werten, die für die binären Systeme mit 33Mol% Cholesterol erhalten werden. Beim DPPC koaleszieren beide Kurven sogar unmittelbar

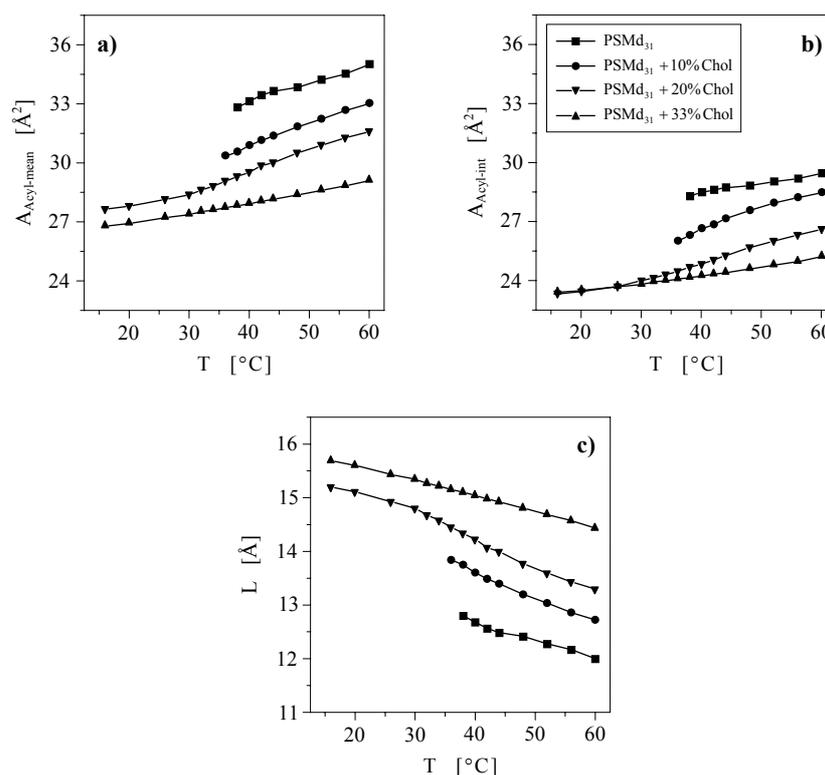


Abbildung 4.68: Länge und Flächen der N-Acylkette des PSMd<sub>31</sub> in verschiedenen Mischungen mit Cholesterol bei voller Hydratation;  $n_w = 38-40$ . Für die Flächen erfolgt eine Differenzierung zwischen der über die ganze Kette gemittelten Fläche  $A_{C,m}$  und  $A_{C,int}$  in unmittelbarer Nähe des Interfaces.

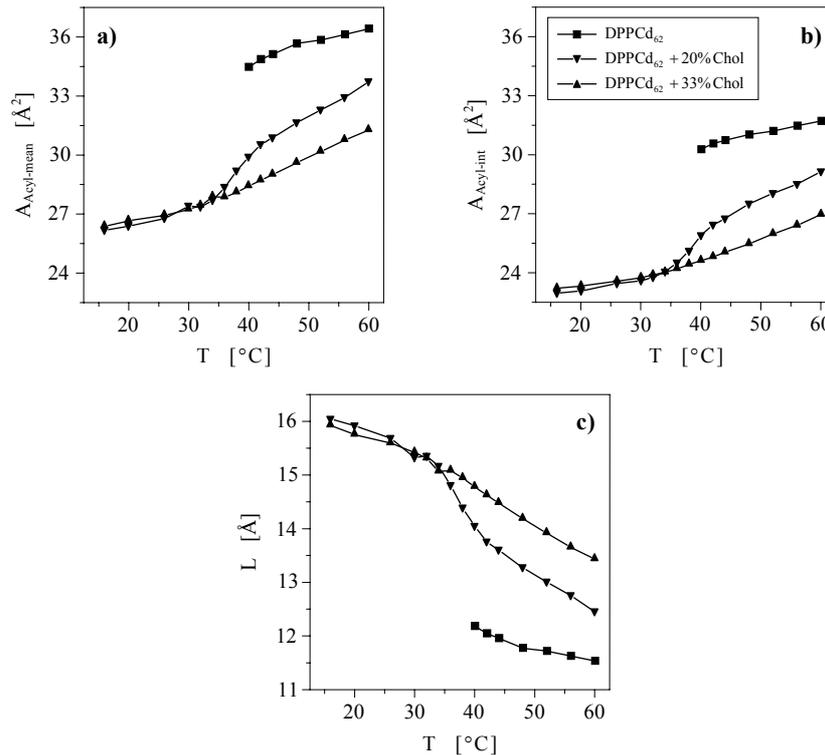


Abbildung 4.69: Über beide sn-Ketten des DPPC<sub>d62</sub> gemittelte Länge und Flächen in Mischungen mit Cholesterin bei voller Hydratation;  $n_w = 31-32$ .

nach dem Durchlaufen des Hauptphasenübergangs. Unterhalb von  $T_m$  scheint somit der Cholesterol-Gehalt in den Membranen lediglich einen marginalen Einfluss auf  $L_C$  und  $A_C$  auszuüben.

Für Temperaturen über  $T_m$  ist eine starke Abhängigkeit von  $L_C$  und  $A_C$  vom Anteil an Cholesterin in den Mischsystemen auszumachen. Allerdings verringert sich der Einfluss des Sterols mit stetig wachsendem Cholesterin-Gehalt immer mehr. Daraus kann gefolgert werden, dass oberhalb einer gewissen Grenzkonzentration, die wahrscheinlich zwischen 33Mol% und 50Mol% liegt, eine weitere Erhöhung des Cholesterin-Anteils keine Änderungen mehr bei  $L_C$  und  $A_C$  zeitigt.

Zur Bestimmung der in Tab. 4.14 angegebenen Ausdehnungskoeffizienten wurden die Kettenlängen und -flächen wiederum logarithmisch gegen die Temperatur aufgetragen und die entsprechenden Graphen gemäß Gl. (2.27) bzw. (2.28) gefittet.

	$\alpha_{\parallel}$ [ $10^{-3} \cdot \text{\AA}/^{\circ}\text{C}$ ]	$\alpha_{\perp,m}$ [ $10^{-3} \cdot \text{\AA}^2/^{\circ}\text{C}$ ]	$\alpha_{\perp,int}$ [ $10^{-3} \cdot \text{\AA}^2/^{\circ}\text{C}$ ]
PSMd <sub>31</sub> + 10% Chol	-3,47	1,74	1,79
PSMd <sub>31</sub> + 20% Chol	-3,44	1,72	1,75
PSMd <sub>31</sub> + 33% Chol	-2,03	1,02	0,97
DPPCd <sub>62</sub> + 20% Chol	-5,75	2,88	2,84
DPPCd <sub>62</sub> + 33% Chol	-4,81	2,91	2,27

Tabelle 4.14: Ausdehnungskoeffizienten Cholesterol-haltiger binärer Membranen im voll hydratisierten Zustand bei  $T = 40\text{--}60^{\circ}\text{C}$ .<sup>53)</sup>  $\alpha_{\parallel}$  bezieht sich auf die Richtung parallel zur Direktorachse. In lateraler Richtung wird zwischen der Expansion nahe des Interfaces  $\alpha_{\perp,int}$  und der über die gesamte Kette gemittelten  $\alpha_{\perp,m}$  unterschieden.

#### 4.2.6 Diskussion

##### *Domänenbildung*

Nach Demel et al.<sup>[361]</sup> besitzt Cholesterol eine hohe Affinität zu Sphingomyelin, die in binären Mischungen größer ist als zu den meisten – wenn nicht zu allen – anderen Phospholipiden. In Übereinstimmung damit finden Dietrich et al.<sup>[51]</sup> für die „kanonische *lipid raft*-Mischung“ (POPC-SM-Chol 1:1:1 – vgl. Kap.1.2.3) ebenso wie Schroeder et al.<sup>[362]</sup> in der SCRL-Mischung<sup>54)</sup> mittels <sup>31</sup>P- und <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie das gleiche Verhalten für Cholesterol wie in binären SM/Chol-Mischungen. Sie schlussfolgerten daraus, dass in den untersuchten Liposomen die Bildung von spatialen SM/Chol-reichen Regionen stattfindet und daher in den übrigen Membranbereichen eine Cholesterol-Verarmung auftritt.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Resultate bestätigen eine spezifische Wechselwirkung zwischen Sphingomyelin und Cholesterol. Ferner zeigt sich, dass bereits in den binären SM/Chol-Bilayern bei physiologischen Temperaturen die Membrankonstituenten in Chol-reiche und Chol-arme Domänen segregieren. Bei den DPPCd<sub>31</sub>/Chol-Mischungen konnten dagegen auch bei hohem Cholesterol-Gehalt nur in unmittelbarer Nähe des Phasenübergangs Entmischungen beobachtet werden.

##### *Phasenentmischung*

Für Mischungen mit weniger als 33% Cholesterol konnte exakt am Phasenübergang des PSM eine starke Zunahme der SM-reichen Regionen auf Kosten der Chol-

<sup>53)</sup> Die Ausdehnungskoeffizienten der reinen PSMd<sub>31</sub>- bzw. DPPCd<sub>62</sub>-Membranen sind bereits in Tabelle 4.13 aufgeführt.

<sup>54)</sup> SCRL: Leber-PC/Leber-PE/SM/Cerebroside/Chol 1:1:1:1:2.

reichen Domänen festgestellt werden. Diese Neigung des SM zur Phasentrennung dürfte von ausgesprochener physiologischer Bedeutung sein, da  $T_m$  für die meisten in biologischen Membranen vorkommenden Sphingomyeline bei etwa 37°C liegt.<sup>[285-288]</sup> Da der Grad der Phasenseparation vom Anteil an Cholesterol in den Membranen abhängt, könnte damit einer der Regulationsmechanismen gefunden worden sein, mittels derer die Ausbildung SM-reicher Domänen und damit möglicherweise auch der *lipid rafts* in Zellen kontrolliert wird.

Wie kann diese Separation verstanden werden?

Ferguson-Yankey et al.<sup>[363]</sup> & Talbot et al.<sup>[328]</sup> fanden, dass SM bevorzugt intramolekulare H-Brücken aufweist, während das Dihydro-SM stärker intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbildet. Die nach der Ginzburg-Landau-Theorie qualitativ beschreibbaren am Phasenübergang auftretenden Fluktuationen führen möglicherweise zu einem verstärkten Eindringen von Wasser zwischen die Lipide bis in den Interface-Bereich, was für das SM mit einer erhöhten Tendenz auch intermolekulare H-Brücken auszubilden verknüpft sein sollte. Dies könnte erklären, dass, wie von Untracht und Shipley<sup>[341]</sup> gefunden wurde, sich bereits in hydratisierten reinen SM-Bilayern bei  $T_m$  ein feines Labyrinth von Phasengrenzen bildet; das heißt, es existieren mehr als eine Phase.

Ogleich mit FTIR gezeigt wurde, dass sich die Hydratisierung der Amidgruppe am Phasenübergang in reinen voll hydratisierten EYSM-Membranen kaum ändert,<sup>[364]</sup> muss dies für den Estersauerstoff des Phosphats in der Kopfgruppe sowie für die Hydroxylgruppe des Sphingosins keineswegs gelten. Und insbesondere eine Involvierung dieser beiden chemischen Gruppen in das intermolekulare Wasserstoffbrücken-Netzwerk sollte eine stärkere SM-SM-Adhäsion zur Folge haben, da deren H-Brücken sonst zumeist intramolekularer Natur sind.

Die Ausbildung SM-reicher Phasendomänen erfordert eine weitgehend ungehinderte Diffusion der Lipide in den binären Membranen. Diese sollte durch das Cholesterol nicht behindert werden, da das Sterol zwar die *trans/gauche*-Isomerisierungen benachbarter Lipide einschränkt,<sup>[19]</sup> nicht jedoch deren laterale Beweglichkeit behindert.<sup>[26]</sup> Darüber hinaus fanden Gaede und Gawrisch<sup>[365]</sup> mittels <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie in DPPC/Chol-Mischungen im Phasenkoexistenzbereich eine durch Phasengrenzen nahezu unbehinderte laterale Diffusion der DPPC-Lipide mit einer Diffusionskonstante von  $D = 1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Es ist anzunehmen, dass sich – trotz der spezifischen SM-Chol-Wechselwirkung – das Sphingomyelin in Membranen mit Cholesterol-Anteil ähnlich verhält und eine in der gleichen Größenordnung sich bewegende Diffusionskonstante besitzt.

Infolge der Diffusion des Sphingomyelins bilden sich lokal kurzzeitig SM-Konzentrationsgradienten aus. Das Bestreben eines jeden Systems nach maximaler Entropie wirkt der Aufrechterhaltung dieser Gradienten entgegen. Im Bereich des thermotropen Phasenübergangs von SM kommt es jedoch zu einer Verfestigung der Membran im Interface-Bereich (vgl. Kap. 4.2.1), u.U. gerade durch eine Erhöhung der durch eingelagerte H<sub>2</sub>O-Moleküle vermittelten intermolekularen H-Brücken zwi-

schen den Lipiden. Die auf diese Weise stabilisierten SM-Gelphasen-Kondensationskeime<sup>55)</sup> können weiter wachsen, indem SM-Moleküle aus den Cholesteri- reicher Membrangebietern zu diesen Keimen diffundieren und durch Wasserstoffbrücken-Ausbildung daran „kleben“ bleiben.

Tritt bei  $T_m$  tatsächlich durch vermehrt eingelagertes Wasser eine höhere H-Brückenvernetzung zwischen den Lipiden auf, wird auch der unterhalb von  $T_m$  zu beobachtende Rückgang der SM-reichen Domänen verständlich. Infolge des Verschwindens der Phasenübergangs-Fluktuationen und der damit verbundenen Wasser- verdrängung aus dem Kopfgruppen- und Interface-Bereich kommt es wieder zu einer Reduktion der intermolekularen H-Brücken und damit zu einer Erhöhung der Flexibilität der SM-reichen Regionen. Die den Entropieterm im Gibbs Potential kompensierende Enthalpieniedrigung geht verloren und es findet wieder eine vermehrte Lipidmischung, oder anders ausgedrückt, eine weitgehend ungestörte Diffusion der Lipide statt.

Die geringe Breite des thermischen Bereichs, in dem sich  $n_{\text{Ch-a}}/n_{\text{Ch-r}}$  (s. Kap. 4.2.5) ändert, stützt die Annahme, dass Phasenübergangs-Fluktuationen hierbei eine Rolle spielen. Durch  $^2\text{H-NMR}$ -Messungen mit Mischungen des 4,5-Dihydro-SM mit Cholester- ol ließe sich die eben geführte Argumentation erhärten oder widerlegen. Da bei diesem SM-Derivat grundsätzlich eine höhere intermolekulare H-Verbrückung als beim SM vorliegt, sollte die beobachtete Phasenseparation nicht, oder in sehr viel geringerem Umfang, auftreten.

#### *Geometrische Größen der Acylketten*

Die durch das Cholesterol eingeschränkte *trans/gauche*-Isomerisierung mit Erhö- hung der *trans*-Anteile in den Acylketten<sup>[26]</sup> führt zu einer signifikanten Kettenver- längerung. Dieser Effekt wird umso deutlicher, je höher die Temperatur ist, da in Abwesenheit des Sterols dabei die Zahl der *trans/gauche*-Isomerisierungen stark zu- nimmt.

Bei Temperaturen unterhalb von  $T_m$  tritt dagegen eine Koaleszenz der Spektralmo- mente der reinen DPPC bzw. PSM-Membranen mit denen der binären Mischungen mit Cholesterol auf. Korreliert damit nähern sich die  $L_C$ - bzw.  $A_C$ -Kurven derselben Membransysteme bei Temperaturenniedrigung an. Beide Befunde besagen nichts an- deres, als dass die Acylketten natürlicherweise nur eine endliche Länge erreichen können und deshalb unterhalb von  $T_m$  mit sinkender Temperatur die Kettenverlänge- rung gegen einen Grenzwert geht. Dieser sollte unabhängig von einer möglichen Gegenwart des Cholesterols in den Membranen sein.

---

<sup>55)</sup> Die Aufrechterhaltung der Konzentrationsgradienten wird durch eine Erniedrigung des Gibbs Potentials  $G$  für das Membransystem infolge einer Absenkung der Enthalpie bewirkt, welche die Erniedrigung von  $G$  durch den andernfalls auftretenden Gewinn an Entropie überkompensiert.

# Anhang

## Anhang I

### Formalismus der Momente & Kumulanten

Um aufzuzeigen, dass die in der Festkörper-NMR-Spektroskopie vielfach Verwendung findenden Momente<sup>[22,56,57]</sup> und die bei Auswertungen dynamischer Lichtstreuexperimente verschiedentlich benutzten Kumulanten<sup>[272]</sup> die gleichen mathematischen Wurzeln besitzen, sei hier auszugsweise der gemeinsame zugrunde liegende Formalismus kurz skizziert.

Gegeben sei eine Wahrscheinlichkeitsdichte- bzw. Verteilungsfunktion  $P(x)$  einer Variablen  $x$ , mit  $x \in \mathbb{R}$ . Dann heißt die zu  $P(x)$  gehörige Fouriertransformierte  $\phi(t)$  die *charakteristische Funktion* von  $P(x)$  mit

$$\begin{aligned}\phi(t) &= \int_{-\infty}^{\infty} e^{ixt} P(x) dx \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} P(x) dx + it \int_{-\infty}^{\infty} xP(x) dx + \frac{1}{2!} i^2 t^2 \int_{-\infty}^{\infty} x^2 P(x) dx + \dots \\ &= 1 + it \langle x \rangle + \frac{1}{2!} i^2 t^2 \langle x^2 \rangle + \dots\end{aligned}\quad (I.1)$$

Zusätzlich kann man für  $P(x)$  eine *Moment-generierende Funktion*  $M(t)$  definieren durch

$$\begin{aligned}M(t) = \langle e^{tx} \rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} e^{tx} P(x) dx \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} P(x) dx + t \int_{-\infty}^{\infty} xP(x) dx + \frac{1}{2!} t^2 \int_{-\infty}^{\infty} x^2 P(x) dx + \dots \\ &= 1 + t \langle x \rangle + \frac{1}{2!} t^2 \langle x^2 \rangle + \dots\end{aligned}\quad (I.2)$$

Aus Gl. (I.1) und (I.2) wird ersichtlich, dass bei Kenntnis sämtlicher Erwartungswerte  $\langle x \rangle, \langle x^2 \rangle, \dots$ , die auch als *Rohmomente*  $M_n^r$  bezeichnet werden, mit

$$M_n^r = \langle x^n \rangle = \int x^n P(x) dx, \quad (I.3)$$

sowohl die charakteristische Funktion  $\phi(t)$ , als auch  $M(t)$  unmittelbar angegeben werden können durch

$$\phi(t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(it)^n}{n!} M_n^r, \quad (I.4)$$

bzw.

$$M(t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{t^n}{n!} M_n^r. \quad (I.5)$$

Existiert für eine physikalische Größe ein Verteilungsspektrum um einen gewissen Mittelwert, ist man meistens zusätzlich zu den Rohmomenten auch noch an den mittleren Abweichungen, d.h. an der Breite der Verteilung interessiert. Hierüber geben die *Zentralmomente*  $M_n$  Auskunft

$$M_n = \langle (x - \langle x \rangle)^n \rangle = \int (x - \langle x \rangle)^n P(x) dx. \quad (I.6)$$

Bezieht man sich bei der Berechnung der  $M_n$  auf einen beliebigen Wert  $a$ , statt auf den Erwartungswert  $\langle x \rangle$ , erhält man die *absoluten Momente*  $M_n^a$

$$M_n^a = \langle |x - a|^n \rangle = \int |x - a|^n P(x) dx. \quad (I.7)$$

Selbige finden beispielsweise bei der Bestimmung der Spektralmomente von Festkörper-NMR-Spektren Verwendung, wo der Wert  $a$  gleich der Larmorfrequenz  $\omega_0$  ist.

Alternativ zu Gleichung (I.3) ist es nach (I.1) bzw. (I.2) ebenso möglich die  $M_n^r$  aus  $\phi(t)$  oder aus  $M(t)$  zu gewinnen

$$M_n^r = \frac{1}{i^n} \left. \frac{d^n}{dt^n} (\phi(t)) \right|_{t=0} = \left. \frac{d^n}{dt^n} (M(t)) \right|_{t=0}. \quad (I.8)$$

Die Zentralmomente wiederum können auch aus den Rohmomenten abgeleitet werden

$$M_n = \sum_{k=0}^n \binom{n}{k} (-1)^{n-k} M_k^r (M_1^r)^{n-k}. \quad (I.9)$$

In der Literatur werden sowohl die Rohmomente als auch die Zentralmomente öfters verwirrenderweise einfach nur als Momente von  $P(x)$  bezeichnet.

Teilweise ist es einfacher mit dem Logarithmus der Momenten-generierenden Funktion bzw. mit  $\ln(\phi(t))$  zu arbeiten. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn eine messbare Funktion  $g(x,t)$  eine exponentielle Abhängigkeit von  $x$  besitzt, und man an dem Erwartungswert von  $x$  interessiert ist (vgl. Kap. 2.3.2, Gl. (2.83)).

Die den Rohmomenten entsprechenden Koeffizienten bezeichnet man dann als die *Kumulanten*  $K_n$ . Unter Verwendung der  $K_n$  lautet die zu (I.4) analoge Gleichung für die charakteristische Funktion

$$\ln(\phi(t)) = \ln\left(\sum_{n=0}^{\infty} \frac{(it)^n}{n!} M_n^r\right) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(it)^n}{n!} K_n. \quad (\text{I.10})$$

Gleichermaßen gilt für die *Kumulanten-generierende Funktion*  $K(t)$

$$K(t) = \ln(M(t)) = \ln\left(\sum_{n=0}^{\infty} \frac{t^n}{n!} M_n^r\right) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{t^n}{n!} K_n. \quad (\text{I.11})$$

Die ersten vier Kumulanten schreiben sich in Termen der Roh- bzw. Zentralmomente wie folgt:

$$\begin{aligned} K_1 &= M_1^r & K_1 &= M_1 \\ K_2 &= M_2^r - (M_1^r)^2 & K_2 &= M_2 \\ K_3 &= M_3^r - 3M_2^r M_1^r + 2(M_1^r)^3 & K_3 &= M_3 \\ K_4 &= M_4^r - 4M_3^r M_1^r - 3(M_2^r)^2 + 12M_2^r (M_1^r)^2 - 6(M_1^r)^4 & K_4 &= M_4 - 3M_2^2 \end{aligned}$$

Ist die Funktion  $\ln(\phi(t))$  bzw.  $K(t)$  bekannt, können aus ihnen in Analogie zu (I.8) wiederum die Kumulanten berechnet werden gemäß

$$\begin{aligned} K_n &= \frac{1}{i^n} \frac{d^n}{dt^n} \ln(\phi(t)) \Big|_{t=0} \\ &= \frac{d^n}{dt^n} \ln(K(t)) \Big|_{t=0}. \end{aligned} \quad (\text{I.12})$$

## Anhang II

### Auswertung von DLS-Experimenten

#### II.1 Prinzipien

Die hier ausgeführte Diskussion bzgl. der Wahl der für einen regularisierten Fit einer Korrelationsfunktion zu verwendenden Fitparameterwerte bezieht sich auf die von der Firma ALV GmbH, Langen Deutschland für Lichtstreuungsmessungen entwickelte Software.

Im folgenden wird zwischen dem Korrelations-Zeitfenster  $\Delta t$  – festgelegt durch die Parameter **First Datapoint** (FP) und **Last Datapoint** (LP)<sup>56</sup> – und dem Zerfalls-Zeitfenster  $\Delta\tau$  unterschieden.  $\Delta\tau$  ist bestimmt durch die minimale Zerfallszeit (**Min. Decay Time** –  $\tau_{\min}$ ) und die maximale Zerfallszeit (**Max. Decay Time** –  $\tau_{\max}$ ) und definiert die Breite eines Verteilungsspektrums. Bei einem Fit werden nur Zerfälle mit Korrelationszeiten innerhalb von  $\Delta\tau$  berücksichtigt (s. Abb. II.1). Dagegen ist  $\Delta t$  der Zeitbereich, in dem die gemessene Korrelationsfunktion gefittet wird. Zunächst sollen in knapper Form die wichtigsten Punkte, die bei der Auswertung von DLS-Messungen unter Benutzung der ALV-Software zu beachten sind, aufgelistet werden.

- Die Auflösung eines Zerfallszeitspektrums wird durch dessen Breite  $\Delta\tau$  und durch die mittels des Parameters **Number of Gridpoints** bestimmbare Zahl der Gitterpunkte innerhalb von  $\Delta\tau$  festgesetzt. Der größt-möglicher Wert dieses Parameters beträgt 250. Aufgrund dieser endlichen Auflösbarkeit der Spektren ergeben sich für das Fitten von Korrelationsfunktionen verschiedene Konsequenzen.
- Eine der Konsequenzen betrifft die Halbwertsbreite der Peaks. Im allgemeinen verringern sich die Halbwertsbreiten der Komponenten einer ungewichteten Verteilung (s. Kap. 2.3.4), wenn die Auflösung erhöht wird. In Verbindung damit verschieben sich die linken Flanken der Peaks zu etwas größeren und die rechten Flanken zu etwas kleineren Zeiten. Da sich, wie in Abb. 2.19 dargestellt, beim Übergang von einer ungewichteten zu einer gewichteten Radiusverteilung durch die  $R^3$ - bzw.  $R^6$ -Renormierung die mittleren Peakpositionen  $R_{\text{mean}}$  in Richtung der linken Peakflanken verschieben, kommt es in den gewichteten Verteilungen bei verbesserter Auflösung gewöhnlich zu einem Shift von  $R_{\text{mean}}$  hin zu größeren Radiuswerten (s. Abb. II.3).

---

<sup>56</sup> Bei einer DLS-Messung werden die am Detektor ankommenden Lichtintensitäten in Zeitkanäle geleitet. Jeder Kanal entspricht einer Korrelationszeit auf einer logarithmischen Skala. Aus diesem Grund geben die Parameter FP und LP das Zeitkanalintervall an, innerhalb dessen  $g(t)$  ausgewertet werden soll.

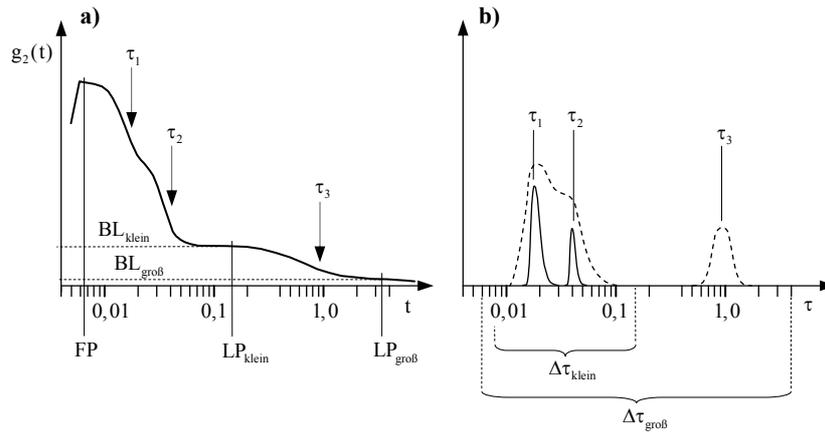


Abbildung II.1: a) Korrelationsfunktion  $g_2(t)$  mit drei Zerfällen und den dazugehörigen Halbwertszeiten  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ . Die Pfeile markieren die Positionen der  $\tau_i$  im Korrelogramm. Der Knick von  $g_2(t)$  vor FP rührt von der endlichen Zeitaufloesung des Detektors her. Die interessierenden Zerfaelle sollen in diesem Fall  $\tau_1$  und  $\tau_2$  sein. Um die Aufloesung zu verbessern (s. Text), wird daher nach einem ersten Fit mit dem Parametersatz FP,  $LP_{\text{groeb}}$  und  $\Delta\tau_{\text{groeb}}$  ein zweiter Fit mit den Parametern FP,  $LP_{\text{klein}}$  und  $\Delta\tau_{\text{klein}}$  durchgefuehrt.  $BL_{\text{groeb}}$  und  $BL_{\text{klein}}$  kennzeichnen die jeweiligen Basislinien.

b) Diffusions-Halbwertszeit-Verteilung bei maebiger Aufloesung in dem groeben Zerfallszeitfenster  $\Delta\tau_{\text{groeb}}$  (-----) und bei erhoehter Aufloesung in dem kleineren  $\Delta\tau_{\text{klein}}$  (—), mit  $\Delta\tau = \tau_{\text{max}} - \tau_{\text{min}}$ .

- Die gemessene Verteilungsbreite einer Partikelspezies ist aufgrund der endlichen Messgenauigkeit der Korrelationsfunktion, der damit verbundenen Notwendigkeit einer Regularisierung und der endlichen Aufloesung des Zerfallszeitfensters  $\Delta\tau$  stets groebser als die tatsaechlich in einer Probe vorliegende Verteilungsbreite. Das fuehrt im Anzahl-gewichteten Radiusspektrum mitunter zu etwas zu kleinen mittleren hydrodynamischen Radien. Um diese Abweichung zu minimieren, sollte die Aufloesung beim Fitten einer Korrelationsfunktion moeglichst weit erhoeht werden.
- Als eine weitere Folge des endlichen Aufloesungsvermoegens von  $\Delta\tau$  kommt es bei maebiger Aufloesung oftmals zur Fusion separater Teilchenspezies und damit zu einer breiten Verteilung. Stellt sich bei einer Verteilungskurve die Frage, ob sie eine Komposition mehrerer Spezies ist, kann das unregularte Spektrum zu Rate gezogen werden. Enthaeht das geglaettete (= regularte

sierte) Signal mehr als einen signifikanten diskreten (= unregularisierten) Peak, so liefert eine Erhöhung der Auflösung oftmals auch im geglätteten Spektrum eine Aufspaltung des breiten Signals in einzelne schmale Verteilungen.

- Die Effekte, die bei Verkleinerung von  $\tau_{\max}$  in den Verteilungsspektren auftreten, werden von der Menge an Verunreinigungen in einer Probe bestimmt. Bei marginalen Anteilen an Verunreinigungen, wobei sich deren Diffusionskorrelations-Zerfallszeiten idealerweise weit oberhalb von  $\tau_{\max}$  befinden, kann  $\tau_{\max}$  normalerweise sehr nah an die relevanten, d.h. an die interessierenden Zerfallszeit-Verteilungen gesetzt werden. Enthält die Probe dagegen nicht-vernachlässigbare Verunreinigungsbeiträge, sollte  $\tau_{\max}$  so groß gewählt werden, dass in dem Zeitintervall  $[\tau_{\max}/50; \tau_{\max}]$ , mindestens aber in  $[\tau_{\max}/10; \tau_{\max}]$  keine Signale liegen. Andernfalls kommt es durch Peakmitteilung (siehe Kap. II.5) einerseits zu Peak-Verbreiterungen und andererseits zu einer Verschiebung derjenigen Peaks, die in diesem Zeitintervall unterhalb von  $\tau_{\max}$  liegen, in Richtung  $\tau_{\max}$ , das heißt hin zu größeren Zerfallszeiten.
- Die unregularisierte, diskrete Verteilung kann in der ALV-Software mittels der Option **Show S[0]** (enthalten in dem mit der rechten Maustaste anzuziehenden Popup-Menü im *Distribution Window*) dargestellt werden.
- Die Optimierung der Fitparameter für verschiedene Partikelspezies führt gewöhnlich zu unterschiedlichen Parameterwerten.

#### Regularisierung

Bei der Berechnung geglätteter bzw. regularisierter Verteilungen kann in der ALV-Software zwischen einer Regularisierung 0. oder 2. Ordnung gewählt werden. Die 0. Ordnung entspricht einer Minimierung der Fläche unter der Verteilungsfunktion  $f(\Gamma)$ , oder anders ausgedrückt einer Minimierung des folgenden Integrals mit  $n = 0$

$$r_n = \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} \frac{d^n f(\Gamma)}{d\Gamma^n} d\Gamma. \quad (\text{II.1})$$

Die Regularisierung 2. Ordnung ( $n = 2$  in Gl. (II.1)) liefert stärker geglättete Verteilungen als diejenige 0. Ordnung.

Als Maß für die im Regularisierungs-Verfahren zugelassene Varianzbreite (s. Kap. 2.3.6) dient der sog. **Target PROBI**-Faktor. Er kann zwischen  $1 \cdot 10^{-4}$  und 0,95 variiert werden. Kleine Werte dieses Faktors bedeuten eine geringe Regularisierungsstärke, während ein großer Faktor sehr stark geglättete Partikelgrößen-Verteilungen liefert. Bewährt hat sich ein mittlerer Wert von 0,2–0,5.

### *Basislinienkorrektur*

Die Wahl des Zeitbereichs  $\Delta t$ , in dem die Korrelationsfunktion auszuwerten ist, hängt davon ab, für welche Zerfälle man sich im Spektrum interessiert. Damit die bei einem bestimmten LP-Wert möglicherweise noch vorhandene Restkorrelation in  $g(t)$  (vgl. z.B. Abb. II.1a)) beim Fitten eliminiert werden kann, existiert die Option **Fit additional baseline**. Der Untergrund setzt sich aus der möglicherweise vorhandenen Hintergrundstrahlung, Luftblasen, Probenverunreinigungen und ähnlichem zusammen. Die Basislinie geht als zusätzlicher Freiheitsgrad in den Fit ein. Daher sollte diese Option nur verwendet werden, wenn tatsächlich eine von Null verschiedene Basislinie bei LP existiert. Sonst werden die Peaks unnötig verbreitert.

Damit eine Basislinie festgesetzt werden kann, sollte  $g(t)$  bei LP einen Sattelpunkt-ähnlichen Verlauf haben. Andernfalls werden nicht-vernachlässigbare Anteile von Zerfällen mit  $\tau > LP$  in  $\Delta t$  mit hineingenommen und beeinflussen  $f(\Gamma)$ .

### *Verunreinigungen*

Unerwünschte Partikel in DLS-Proben stören oftmals in drastischer Weise die Messungen. Gewöhnlich sind diese Teilchen groß im Vergleich zu den tatsächlich interessierenden. Ihre Streuintensität liefert somit, obgleich ihre Zahl nur einen Bruchteil der übrigen Partikel ausmachen kann, mitunter den dominierend Beitrag zu  $g(t)$ . Abbildung II.2 zeigt zwei typische Situationen, die die Auswertung von DLS-Messungen schwierig bis unmöglich machen. In Abb. II.2a) ist der Verlauf von  $g(t)$  im gesamten Zeitfenster monoton fallend, ohne Sattelpunkt-Struktur. Eine Basislinie kann daher unterhalb von 1000ms nicht festgelegt werden, was zur Folge hat, dass auch  $\tau_{\max}$  und damit  $\Delta\tau$  entsprechend groß zu wählen ist. Ein Fit mit einem derart großen  $\Delta\tau$  liefert üblicherweise sehr breite Verteilungsspektren geringer Aussagekraft. Abb. II.2b) zeigt eine nicht mehr analysierbare Korrelationsfunktion. Die Ursache für eine solche Klippenstruktur von  $g(t)$  ist darauf zurückzuführen, dass im Lauf der Messung ein so großes Teilchen das Streuvolumen kreuzte, dass sich der Shutter aus Gründen des Detektorschutzes aufgrund des plötzlich drastischen Anstiegs der Streuintensität schloss.

### *Verlässlichkeit der Existenz eines Zerfalls*

Um eine im Verteilungsspektrum auftauchende Teilchenspezies der mittleren Zerfallszeit  $\tau$  zu validieren, d.h. deren Existenz in der zu untersuchenden Probe als sicher annehmen zu können, ist der Intensitätsanteil  $A_1$  des bei  $\tau$  auftretenden Peaks<sup>57)</sup> mit der Standardabweichung  $\sigma_{\text{run}}(t = \tau)$ <sup>58)</sup> der gemessenen Korrelationsfunktion zu vergleichen.

---

<sup>57)</sup> Der Intensitätsanteil  $A_1$  einer Verteilung in einem Zerfallszeit- oder Radiusspektrum kann unter der Option **Show Results** in dem mit der rechten Maustaste anzuzeigenden Pop-up-Menü im *Distribution Window* eingesehen werden.

Für  $A_1 \leq 10 \cdot \sigma_{\text{run}}$  liegt die Fehlertoleranz für die Genauigkeit der Radiusbestimmung oberhalb von 10%. Für den Fall, dass der Intensitätsanteil die gleiche Größe besitzt wie  $\sigma_{\text{run}}(t = \tau)$ , kann schließlich keine Aussage mehr darüber getroffen werden, ob in der Probe in diesem Zeit- bzw. Radiusbereich tatsächlich eine Partikelspezies vorliegt. In einem solchen Fall können nur Wiederholungsmessungen Klarheit schaffen.

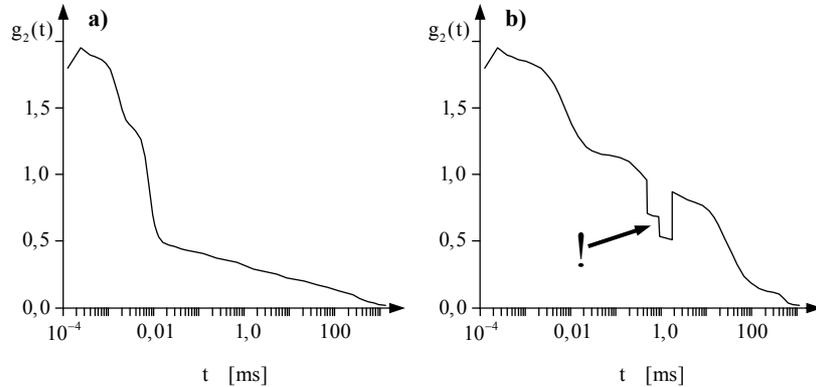


Abbildung II.2: a) Korrelationsfunktion einer Probe mit starkem Anteil an Verunreinigungen, deren Zerfallszeiten sich über ein breites Zeitfenster erstrecken.  
 b) Nicht auswertbare Korrelationsfunktion.

<sup>58</sup> Für eine DLS-Messung, bei der N einzelne Korrelationsfunktionen  $g_i(t)$  zu einer Gesamtmessung  $\overline{g(t)}$ , mit

$$\overline{g(t)} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N g_i(t) ,$$

akkumuliert werden, berechnet sich die Standardabweichung  $\sigma_{\text{run}}(t)$  wie folgt

$$\sigma_{\text{run}}(t) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (g_i(t) - \overline{g(t)})^2} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (g_i^2(t) - \overline{g(t)}^2)} = \sqrt{g^2(t) - \overline{g(t)}^2} .$$

$\sigma_{\text{run}}(t)$  wird unter dem Menü *Display* → *Std.Dev of Correlation* in Einheiten von %/100 angezeigt, das heißt, ein Wert von 0,001 entspricht einem  $\sigma_{\text{run}}(t)$  von 0,1%. Zur Angabe von  $\sigma_{\text{run}}(t)$  sind mindestens 3 Einzelmessungen (= runs) pro Gesamtmessung nötig.

**Beachte:**

Die in dem *Residuals Window* angegebene Standardabweichung  $\sigma_{\text{res}}(t)$  bezieht sich dagegen auf die Abweichung der aus der gefitteten Verteilung errechneten Korrelationsfunktion von der gemessenen, mit den Amplituden  $g_{\text{fit}}(t)$  bzw.  $g_{\text{meas}}(t)$

$$\sigma_{\text{res}}(t) = \sqrt{|g_{\text{fit}}^2(t) - g_{\text{meas}}^2(t)|} .$$

## II.2 Verschiebung des mittleren Radius bei Variation von $\Delta\tau$

Zur Klärung der Frage, wie sich der mittlere Radius eines Peaks im Anzahl-gewichteten Verteilungsspektrum ändert, wenn durch zunehmende Auflösungsver-besserung im geglätteten ungewichteten Spektrum eine Linienbreitenverschmälerung stattfindet, wird eine Gaußsche Intensitäts-gewichtete Zerfallszeitverteilung  $f_G(\tau, \sigma)$  angenommen. Die Streuung  $\sigma$  dieser Verteilung wird stufenweise, beginnend bei 0,0005ms bis hin zu 0,015ms, erhöht, wobei der Erwartungswert  $\tau = 0,1\text{ms}$  beträgt. In wässriger Lösung bei  $T = 25^\circ\text{C}$  (Viskosität  $\eta = 0,89\text{mPa}\cdot\text{s}$ ) entspricht das einem hydrodynamischen Radius von 17,10nm. Für die einzelnen Verteilungen  $f_G(\tau, \sigma)$  werden die zugehörigen Korrelationsfunktionen durch folgende Gleichung erhalten

$$g_2(t) - 1 = N \cdot \left( \int_{\tau_{\min}}^{\tau_{\max}} f_G(\tau, \sigma) \cdot e^{(-t/\tau)} d\tau \right)^2, \quad \text{mit } f_G(\tau, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(\tau-0,1\text{ms})^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{II.2})$$

Das Korrelations-Zerfallszeitintervall  $\Delta\tau$  ist durch  $\tau_{\min} = 1,25 \cdot 10^{-4}\text{ms}$ , sowie durch  $\tau_{\max} = 1,57 \cdot 10^{-4}\text{ms}$  festgelegt. Die Lösung des Integrals in Gl. (II.2) erfolgt durch Summennäherung unter Verwendung der von dem ALV-Programm benutzten logarithmischen Zeitskala. Die so generierten Korrelationsfunktionen werden sodann mittels der ALV-Software gefittet. Da die Korrelogramme in dieser Software norma-lerweise auf 0,75 normiert sind, wird der Normierungsfaktor N in Gl. (II.2) wie folgt gewählt

$$N = \frac{0,75}{g_2(t = \tau_{\min})_{\text{unnorm}} - 1}. \quad (\text{II.3})$$

$\sigma$ [ms]	$\langle R_H \rangle$ [nm] ungewichtet	$\langle R_H \rangle$ [nm] Anzahl-gewichtet
0,0005	16,97±0,027	16,98±0,027
0,001	16,97±0,027	16,98±0,027
0,005	16,95±0,026	16,97±0,026
0,010	16,88±0,089	16,22±0,085
0,015	16,66±0,150	14,78±0,136

Tabelle II.1: Mittlere hydrodynamische Radien  $\langle R_H \rangle$  der regularisierten Spektren einer Gausschen Partikelverteilung mit dem Erwartungswert  $\tau = 0,1\text{ms}$  in Abhängigkeit von der Streuung  $\sigma$  dieser Verteilung. Die zugrunde liegenden Korrelationsfunktionen wurden nach Gl. (II.2) berechnet.

Die durch Fitten von  $g_2(t) - 1$  erhaltenen mittleren hydrodynamischen Radien  $\langle R_H \rangle$  sind in Tabelle II.1 aufgelistet. Deutlich erkennbar ist, dass sich mit zunehmender Linienverbreiterung im Zerfallszeitspektrum aufgrund der Radiusrenormierung die mittleren Radien in der geglätteten Anzahl-gewichteten Verteilung artifiziell immer weiter zu kleineren Werten hin verschieben. Dagegen erfahren die mittleren Radien in den ungewichteten Verteilungen einen vergleichsweise geringen Shift. Abbildung II.3 veranschaulicht noch einmal grafisch den Zusammenhang zwischen der Peakbreite einer ungewichteten Radiusverteilung und  $\langle R_H \rangle$  im Anzahl-gewichteten Spektrum.

Resümierend sollte beim Fitten einer Korrelationsfunktion maßgebliches Augenmerk auf eine gute Auflösung gerichtet werden, damit sich die Halbwertsbreiten der berechneten Verteilungen nach Möglichkeit im Bereich der tatsächlichen Verteilungsbreiten einer Probe befinden.

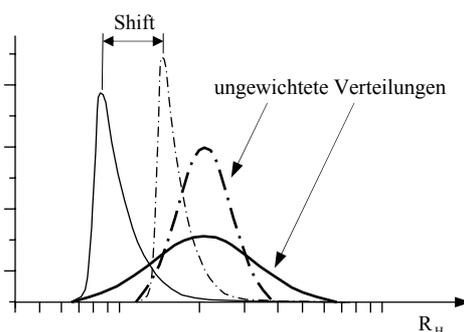


Abbildung II.3: Schematische Darstellung der ungewichteten und der Anzahl-gewichteten  $R_H$ -Verteilung bei zwei verschiedenen Auflösungen des Zerfallszeit-Fensters  $\Delta t$ :

- ungewichtete Radiusverteilung mit geringer Auflösung,
- Anzahl-gewichtete Radiusverteilung bei geringer Auflösung,
- - - ungewichtete Radiusverteilung bei hoher Auflösung,
- - - Anzahl-gewichtete Radiusverteilung mit hoher Auflösung.

### II.3 Einflussbereich eines Diffusions-Korrelationszerfalls in $g(t)$

Im folgenden soll das Intervall bestimmt werden, in dem ein beliebiger Zerfall mit der Korrelationszeit  $\tau$  die Funktion  $g_2(t)$  innerhalb einer absoluten Mess- und Rechengenauigkeit von 6 Ziffern beeinflusst.<sup>59)</sup> Zu diesem Zweck wird angenommen, dass der Verlauf von  $g_2(t)$  durch eine einzige Partikelspezies festgelegt sei mit den

<sup>59)</sup> Das entspricht der Datengenauigkeit, die die ALV-Software verwendet.

beiden Randbedingungen  $g_2(t=0) = 2$  und  $g_2(t \rightarrow \infty) = 1$ . Zu ermitteln sind die Zeiten  $t_{\min}$  und  $t_{\max}$  unterhalb bzw. oberhalb derer sich  $g_2(t)$  in den ersten 5 Nachkomma-Stellen nicht mehr ändert! Es gilt somit

$$t_{\min} = t(g_2 = 2 - 10^{-5}), \quad (\text{II.4})$$

$$t_{\max} = t(g_2 = 1 + 1 \cdot 10^{-5}). \quad (\text{II.5})$$

Die Verwendung der monomodalen Gleichung für  $g_2(t)$  (s. Gl. (2.80)) liefert zusammen mit (II.4) und (II.5)

$$t_{\min} = \frac{\ln(1,00001)}{2} \cdot \tau \cong 5 \cdot 10^{-6} \tau, \quad (\text{II.6})$$

$$t_{\max} = \frac{\ln(1 \cdot 10^{-5})}{2} \cdot \tau \cong 6\tau. \quad (\text{II.7})$$

### *Interpretation*

Gl. (II.6) besagt, dass alle Zerfälle mit  $\tau < 10\text{ms}$  ( $\hat{=} 1700\text{nm}$  für  $T = 25^\circ\text{C}$  und Wasser als Medium) die Funktion  $g_2(t)$  bis an die untere Grenze von  $\Delta t$ , die bei ca.  $3 - 4 \cdot 10^{-4}\text{ms}$  liegt, im Prinzip messbar beeinflussen. Selbst bei einer Verringerung der absoluten Messgenauigkeit auf 4 Ziffern übt ein Zerfall immer noch über 4 logarithmische Dekaden einen Einfluss auf  $g_2(t)$  aus. Allerdings haben Schmutzpartikel gewöhnlich nur einen geringfügigen Anteil an der Amplitude der Gesamtkorrelationsfunktion, wie beispielhaft in Abb. II.4 illustriert ist. Unter dieser Voraussetzung ist deren Einfluss auf  $g_2(t)$  im unteren Bereich des Korrelationszeitfensters  $\Delta t$  letztlich doch rasch vernachlässigbar. Bestimmt ein Zerfall jedoch den Verlauf von  $g_2(t)$  wesentlich mit, sollte er auch in  $\Delta\tau$  vollständig enthalten sein. Dagegen zeigt  $t_{\max}$  in Gl. (II.7) dass beim Fitten der Korrelationsfunktion die Peakposition einer beliebigen Teilchenspezies in keiner Weise beeinflusst wird, wenn  $g_2(t)$  bereits nach dem 6-fachen (also weniger als eine Dekade) der Zerfallszeit  $\tau$  dieser Partikel abgeschnitten wird.

Für das Auffinden der optimalen Fitparameter ist dies von entscheidender Wichtigkeit!

## **II.4 Rekonstruktion einer Korrelationsfunktion**

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen grafisch die Zerfallsbeiträge verschiedener Teilchensorten, wie sie bei einer Messung von Schallvesikeln bestehend aus

DPPC auftraten. Unter der Annahme diskreter Zerfälle lautet die Amplitudenkorrelationsfunktion  $g_1(t)$  hierfür

$$g_1(t) = N_1 \sum_{i=1}^7 c_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \\ = N_1 \left( 2,45 \cdot 10^{-3} e^{-\frac{t}{7,43 \cdot 10^{-4} \text{ms}}} + 0,135 e^{-\frac{t}{0,110 \text{ms}}} + e^{-\frac{t}{0,353 \text{ms}}} + 0,210 e^{-\frac{t}{0,895 \text{ms}}} \right. \\ \left. + 0,135 e^{-\frac{t}{8,62 \text{ms}}} + 0,047 e^{-\frac{t}{21,0 \text{ms}}} + 0,017 e^{-\frac{t}{305 \text{ms}}} \right), \quad (\text{II.8})$$

während sich die Korrelationsfunktionen  $g_{1,i}(t)$  der einzelnen Anteile  $i$  von  $g_1(t)$  mit den Diffusionskorrelations-Zerfallszeiten  $\tau_i$  nach

$$g_{1,i}(t) = c_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (\text{II.9})$$

berechnen. Die Koeffizienten  $c_i$  sind Intensitäts-gewichtet und auf den stärksten Zerfall normiert, mit  $\tau_{\text{main}} = \tau_3 = 0,353 \text{ms}$  und  $c_{\text{main}} = 1,0$ .  $g_1(t)$  selbst wird mittels des Faktors  $N_1 \cong 1,545$  so normiert, dass gilt:  $g_1(t=0) = 1$ . Abb. II.4a) enthält zusätzlich zu den unquadratierten Funktionen noch  $g_2(t) - 1$ .

Optisch sieht man  $g_2(t)$  nur selten an, ob die Funktion mono- oder multimodalen Ursprungs ist; insbesondere, wenn Zerfälle vor dem Hauptzerfall enthalten sind. Dies gilt es beim Finden der optimalen Fitparameter für eine gemessene Korrelationsfunktion zu beachten, da sich mitunter gefittete Spektren bei Variation eines Fitparameters ändern, obgleich in dem jeweiligen Bereich von  $g(t)$  kein Zerfallsbeitrag erkennbar ist.! Einzig Diffusions-Korrelationszerfälle deren  $\tau$  größer als dasjenige des Hauptzerfalls ist, können häufig bereits im Verlauf von  $g(t)$  visuell festgestellt werden. In Abb. II.4a) ist vergrößert  $g_2(t) - 1$  und  $(g_{1,3}(t))^2$  kurz vor dem Ausklingen auf Null gezeigt. Monomodale Korrelationsfunktionen haben ein kantiges Zerfallsende, polydisperse Funktionen dagegen ein weiches Ausklingen.

Die aus dem regularisierten Fit von  $g_2(t) - 1$  aus Abb. II.4a) hervorgehende Intensitäts- bzw. Anzahl-gewichtete Radiusverteilung ist in Abb. II.5a) bzw. b) veranschaulicht.

## II.5 Bestimmung der optimalen Fitparameterwerte

Wie eingangs erwähnt, gilt es, durch Wahl der Fitparameter eine möglichst gute Auflösung, d.h. geringe Linienbreiten zu erzielen. Der in dieser Hinsicht optimale Wert eines der vier Parameter FP, LP,  $\tau_{\text{min}}$  und  $\tau_{\text{max}}$  hängt mit von den Werten der

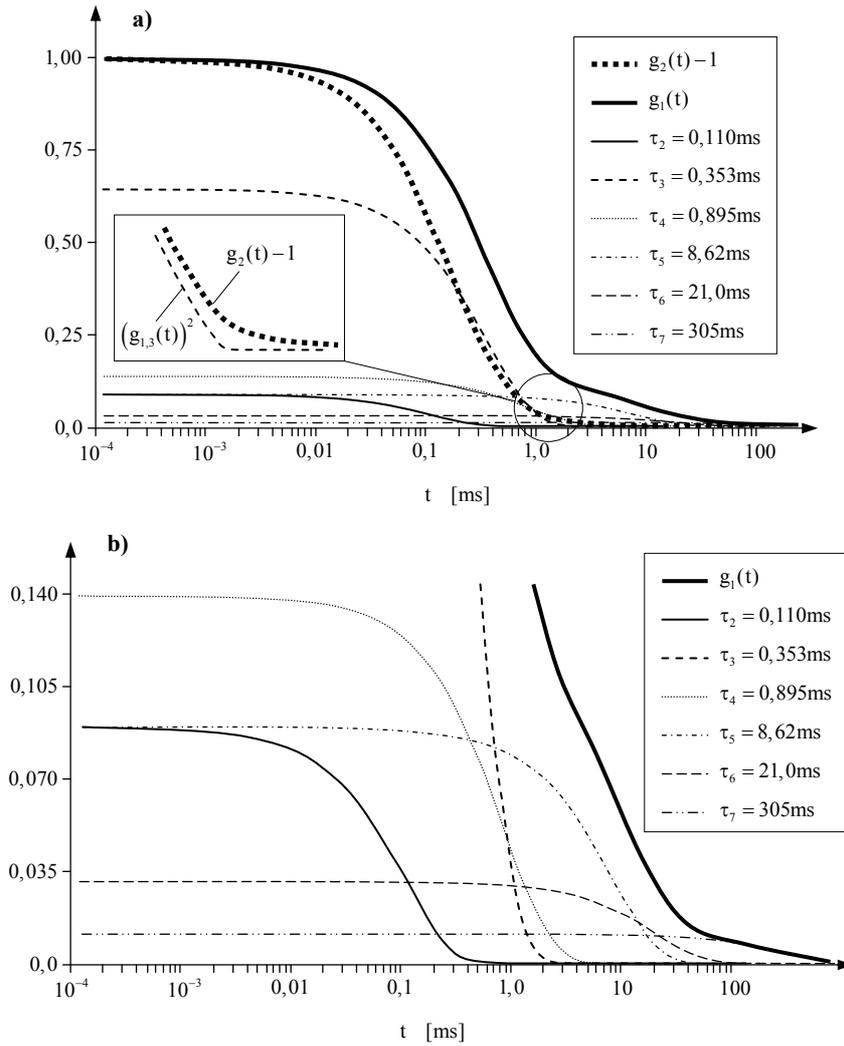


Abbildung II.4: Darstellung einer Amplituden-Korrelationsfunktion  $g_1(t)$ , sowie der Einzelbeiträge  $g_{1,i}(t)$ , aus denen sich  $g_1(t)$  nach Gl. (II.8) zusammensetzt. Die Funktionen  $g_{1,i}(t)$  sind nach Gl. (II.9) berechnet.

- a) Gesamte Amplituden-Korrelationsfunktion  $g_1(t)$  und Intensitäts-Korrelationsfunktion  $g_2(t) - 1$ . Vergrößert gezeigt ist der Verlauf von  $g_2(t) - 1$  und von  $(g_{1,3}(t))^2$  gegen Ende des Korrelationsabfalls.
- b) Vergrößerung des unteren Korrelogrammbereich aus a).

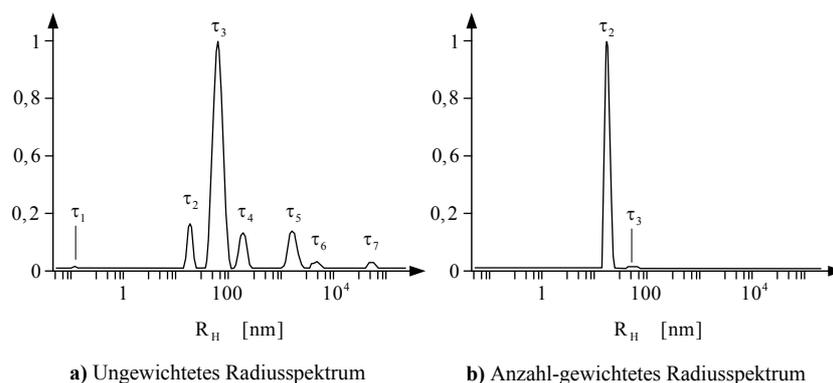


Abbildung II.5: Die aus der Regularisierung der in Abb. II.4 dargestellten Korrelationsfunktion  $g_1(t)$  hervorgehenden Radiusverteilungen. Die Verteilungen sind so normiert, dass die Amplitude des größten Peaks Eins beträgt.

anderen drei Parameter ab. Um trotz dieser intrinsischen Abhängigkeit einen guten Parametersatz zu erhalten, bietet sich als erster Schritt bei der Auswertung von DLS-Messungen ein Rawfit an. Damit kann festgestellt werden, welche Zerfallskonstanten, speziell wo durch Verunreinigungen verursachte Zerfälle im Korrelogramm vorkommen, und wie nahe sich die Zerfälle der Schmutzpartikel an diejenigen der tatsächlich zu bestimmenden Teilchensorten befinden. Tabelle II.2 enthält beispielhafte Einstellungen für diesen Zweck.

Bedingt durch die Totzeitgrenze des Detektors ist der mögliche Variationsbereich der Parameter FP und  $\tau_{\min}$  im Gegensatz zu LP und  $\tau_{\max}$  deutlich eingeschränkt. Daher erscheint es sinnvoll FP und  $\tau_{\min}$  als erstes festzulegen.

#### *First DataPoint – FP & Minimale Zerfallszeit – $\tau_{\min}$*

Der erste auswertbare Punkt der Korrelationsfunktion liegt für das HPPS aufgrund der endlichen Zeitauflösung des Detektors, d.h. aufgrund dessen Totzeit,<sup>60)</sup> im günstigsten Fall bei  $0,375\mu\text{s}$ . Aus diesem Grunde sollte FP nicht unter 3 (= 375ns) oder 4 (= 500ns) und  $\tau_{\min}$  nicht kleiner als  $0,5\mu\text{s}$  (= 0,0005ms) gewählt werden. Als günstig haben sich FP- bzw.  $\tau_{\min}$ -Werte im Bereich von 4 bzw. 0,001ms ( $\tau_{\min}$  entspricht bei wässrigen Lösungen ungefähr einer Partikelgröße von  $R_H = 0,17\text{nm}$ ) erwiesen.

<sup>60)</sup> Jede Korrelationsfunktion, die mit dem von MALVERN vertriebenen HPPS-Gerät gemessen wird, weist einen durch die Totzeit des Detektors verursachten Knick bei ca. 125ns – 275ns auf (s. beispielsweise Abb. II.6a)).

Min. Decay Time [ms]	0,0001	FP	4	(= 500ns)
Max. Decay Time [ms]	20000	LP	239	(= 503,3s)
<input type="checkbox"/> Fit additional Baseline		Number of Gridpoints 250		
<input type="checkbox"/> Zero Order Regularizor				
<input checked="" type="checkbox"/> Enable Data Weighting				

Tabelle II.2: Parametereinstellungen eines Rawfits.

Mitunter befindet sich im Zerfallszeitspektrum bei  $\tau = 10^{-4}$ – $10^{-2}$ ms ein sehr kleiner Peak, der zum Teil auch nur als geringfügiger Anstieg in der ungewichteten Verteilungsfunktion zu erkennen ist (vgl. Abb. II.6b)). Zur Feststellung der Relevanz eines solchen Signals dient wieder die Standardabweichung  $\sigma_{\text{min}}(t)$  (s. Kap. II.1 – *Verlässlichkeit der Existenz eines Zerfalls*). Das Erscheinen eines solchen Peaks kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein, wie etwa eine Fehlinterpretation des Rauschanteils von  $g(t)$ . Eine derartige Situation kann allerdings auch auftreten, wenn viele sehr kleine Teilchen verschiedener Größe in der Probe vorkommen. Wird  $\tau_{\text{min}}$  groß gewählt, werden die sonst in ihrer Teilchenzahl wenig bedeutenden Partikel-spezies durch Mittelwertbildung zu einem einzigen kleinen Peak zusammengefasst, und durch die  $R^0$ -Renormierung bildet diese gemittelte Verteilung dann im Anzahl-gewichteten Radiusspektrum das Hauptsignal. Abhängig davon, ob es sich bei einem solchen Peak um Rauschanteile von  $g(t)$  handelt, oder um Summation mehrerer kleiner Teilchensorten, schafft entweder eine simultane Vergrößerung von FP und  $\tau_{\text{min}}$  oder aber eine Verkleinerung von  $\tau_{\text{min}}$  Abhilfe. Alternativ zur Variation von FP und  $\tau_{\text{min}}$  kann vor dem Fitten der zur Wichtung zu verwendende Radiusbereich eingeschränkt werden mittels der Parameter **Lower Radius for Distribution** und **Upper Radius for Distribution**. Für die in Abb. II.6a) gezeigte Korrelationsfunktion böte sich beispielsweise ebenso ein Fit mit der Einstellung **Lower Radius for Distribution = 2nm** an.

Damit die Auflösung eines Spektrums möglichst hoch ist, sollte  $\tau_{\text{min}}$  nicht zu klein gewählt werden. Liegt  $\tau_{\text{min}}$  jedoch sehr nahe an dem ersten im Zerfallszeitspektrum signifikanten Signal (dessen Gesamtanteil am Spektrum mind. 2–5% beträgt), kommt es zu einer Verbreiterung der Partikel-Verteilungskurve.

#### *Peakmittelung – Mittelwertbildung*

Vor der Darlegung, wie die optimalen LP- und  $\tau_{\text{max}}$ -Werte gefunden werden können, soll einführend ein Effekt beschrieben werden, der bei sukzessiver Vergrößerung von LP bzw. bei Verkleinerung von  $\tau_{\text{max}}$  oft auftritt. Betrachtet wird eine Korrelationsfunktion wie in Abb. II.7a). Ein Fit von  $g(t)$  unter Verwendung von  $LP_{\text{klein}}$  enthält den Zerfall  $\tau_3$  nicht mehr in  $\Delta t$ . Innerhalb von  $\Delta t$  liefert dieser Fit damit die in

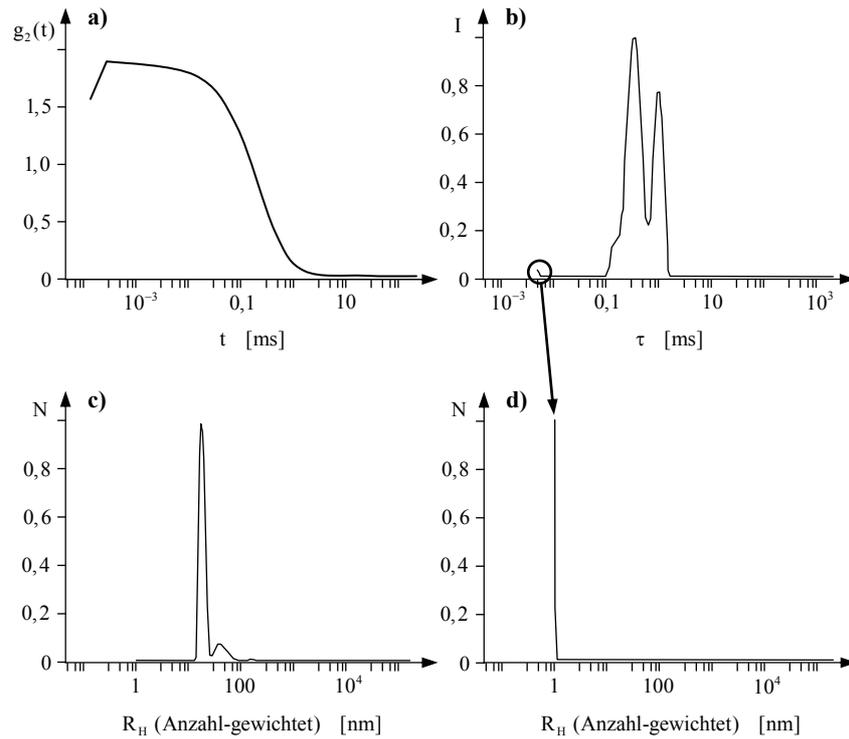


Abbildung II.6: a) Korrelationsfunktion  $g_2(t)$ ;  
 b) Aus  $g_2(t)$  aus a) hervorgehende Intensitäts-gewichtete Zerfallszeit-Verteilung mit einem kleinen Anstieg am linken Spektrenrand;  
 c) Anzahl-gewichtetes Radiusspektrum, erhalten durch einen Fit mit folgenden Parameterwerten:  $FP = 3$  ( $= 375\text{ns}$ ),  $LP = 168$  ( $= 1,049\text{s}$ ),  $\tau_{\min} = 0,0005\text{ms}$ ,  $\tau_{\max} = 100\text{ms}$ ;  
 d) Anzahl-gewichtetes Radiusspektrum, wobei im Vergleich zu der Verteilung in c)  $\tau_{\min} = 0,005\text{ms}$  gesetzt wurde.

Abb.II.7b) gezeigte Verteilung mit  $\tau_1$  und  $\tau_2(LP_{\text{klein}})$  (= durchgezogene Linie). Bei einer Vergrößerung des *Last Datapoints* bis zum Zeitkanal  $LP_{\text{groß}}$  liegt schließlich  $\tau_3$  ebenfalls innerhalb des anzufittenden Bereichs von  $g(t)$ . Allerdings kann  $\tau_3$  nicht als eigener Zerfall in  $f(\tau)$  eingehen, da  $\Delta\tau$ , d.h. eigentlich  $\tau_{\max}$ , dafür zu klein gewählt ist. Aus diesem Grund wird  $\tau_3$  ersatzweise dadurch berücksichtigt, dass ein über  $\tau_2$  und  $\tau_3$  gemittelter Zerfall im Verteilungsspektrum erscheint. Anders ausgedrückt

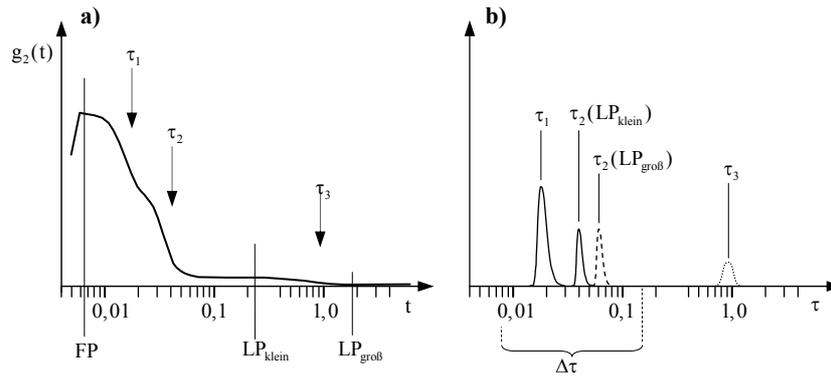


Abbildung II.7: a) Korrelationsfunktion mit drei Zerfällen  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und  $\tau_3$  und Angabe der Positionen zweier möglicher LP-Werte ( $LP_{\text{klein}}$  und  $LP_{\text{groeb}}$ ).  
 b) Zerfallszeitverteilung – der gepunktet gezeichnete Zerfall  $\tau_3$  erscheint in der Verteilung nicht, da er außerhalb von  $\Delta\tau$  liegt. Die Position des Zerfalls  $\tau_1$  bleibt beim Fitten mit  $LP_{\text{groeb}}$  und  $LP_{\text{klein}}$  gleich, da sich  $\tau_1$  zu weit von  $\tau_3$  entfernt befindet. Dagegen verschiebt sich  $\tau_2$  zu längeren Zeiten wenn statt  $LP_{\text{klein}}$   $LP_{\text{groeb}}$  gewählt wird, um durch Mittelwertbildung den Abfall von  $g(t)$  bei  $\tau_3$  mit anzufitten.

verschiebt sich der Zerfall  $\tau_2$  durch *Peakmittlung* hin zu längeren Zeiten. In dem Spektrum in Abb. II.7b) erscheinen jetzt die beiden Peaks bei  $\tau_1$  und  $\tau_2(LP_{\text{groeb}})$ .

#### Last Datapoint – LP & Maximale Zerfallszeit $\tau_{\text{max}}$

Bei der Bestimmung von LP und  $\tau_{\text{max}}$  ist als erstes zwischen Korrelationsfunktionen zu unterscheiden, die oberhalb der interessierenden Zerfallszeiten nahezu auf Null abfallen oder aber in diesem Zeitfenster einen Sattelpunktbereich besitzen. Wenn LP auf ein Plateau gelegt wird, dessen Amplitudenwert deutlich größer als Null ist ( $> 10^{-3}$ ) – wie beispielsweise bei  $LP_{\text{klein}}$  in Abb. II.7a) – ist eine Basislinie anzufitten.<sup>61)</sup> Andernfalls würde die bei LP vorhandene Basislinie als zusätzlicher Zerfall behandelt werden. Beim Fitten einer Korrelationsfunktion mit Positionierung von LP und

<sup>61)</sup> Die Option **Fit additional Baseline** sollte nur verwendet werden, wenn  $g(t)$  bei LP tatsächlich merklich größer als Null ist. Denn durch das Einführen einer Basislinie geht ein weiterer Freiheitsgrad in den Fit ein, was die Fitparametervariabilität erhöht und zu einer Linienverbreiterung führt.

$\tau_{\max}$  in einem Sattelpunktbereich ist die Parameter-Variationsbreite meist durch die Länge des Plateaus eingeschränkt.

Zur Bestimmung von  $\tau_{\max}$  ist zunächst die Zerfallszeit  $t_{\text{end}}$  im Zerfallszeitspektrum zu ermitteln, deren Definition in Abb. II.8 gegeben wird. Im weiteren wird zwischen drei Fällen unterschieden:

1. Es existieren lediglich geringfügige Mengen an Verunreinigungen in der Probe mit einem Gesamt-Intensitätsanteil in der Zerfallszeitverteilung von höchstens 2%.
2. Die Probe enthält größere Mengen an Schmutzpartikeln – Gesamt-Intensitätsanteil > 2% – deren Zerfallszeit mindestens  $10 \cdot t_{\text{end}}$  beträgt.
3. Es treten auch Korrelationszerfälle von Verunreinigungen unterhalb von  $10 \cdot t_{\text{end}}$  auf.

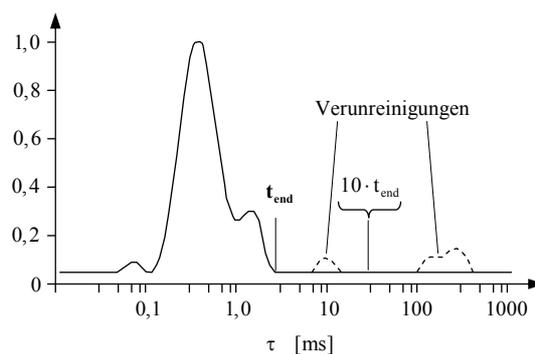


Abbildung II.8: Definition von  $t_{\text{end}}$ . Dargestellt ist ein Zerfallszeitspektrum mit zwei durch Verunreinigungen verursachten Verteilungen. Die tatsächlich zu untersuchenden Partikel liefern das durchgezogene Spektrum. Daher ist beim Finden der optimalen Parameterwerte nur auf Linienbreiten- bzw. Positionsänderungen dieser Verteilung zu achten.

Der Peak bei 10ms liegt sehr nahe bei der interessierenden Verteilung und muss daher mit in  $\Delta t$  und  $\Delta \tau$  hineingenommen werden.

Im ersten Fall kann  $\tau_{\max}$  solange schrittweise verkleinert werden, bis sich die mittlere Position des längsten interessierenden Zerfalls zu verschieben beginnt. Bei sehr sauberen Proben ist für  $\tau_{\max}$  teilweise ein Wert von lediglich  $2 \cdot t_{\text{end}}$  möglich.

Falls im Zerfallszeitspektrum nicht-vernachlässigbare Mengen von Verunreinigungen ausschließlich bei Zeiten auftreten, die länger als  $10 \cdot t_{\text{end}}$  sind, sollte  $\tau_{\max}$  um ca. eine bis 1,5 Größenordnungen oberhalb von  $t_{\text{end}}$  liegen. Als Kriterium für die untere

Grenze von  $\tau_{\max}$  dient wieder die Positionsstabilität der zu untersuchenden Zerfallszeitverteilung. Sobald sich selbige durch Änderung von  $\tau_{\max}$  merklich verschiebt – egal ob in Richtung längerer oder kürzerer Zeiten – ist  $\tau_{\max}$  zu klein gewählt worden. Häufig erscheint bei Verkleinerung von  $\tau_{\max}$  am rechten Spektrenrand ein Peak, der sich bei Erniedrigung der maximalen Zerfallszeit zunächst ebenfalls zu kürzeren Zeiten verschiebt und dabei gewöhnlich an Intensität gewinnt. Schließlich endet dieses Signal in einem, wie in Abb. II.9 gezeigten Anstieg der Verteilungsfunktion. Darin sind alle in  $\Delta t$  auftretenden Zerfälle mit Halbwertszeiten oberhalb von  $\tau_{\max}$  zusammengefasst. Normalerweise verschwindet diese Flanke in den gewichteten Verteilungen; andernfalls kann der Parameter **Upper Radius for Distribution** beim Fitten erniedrigt werden.

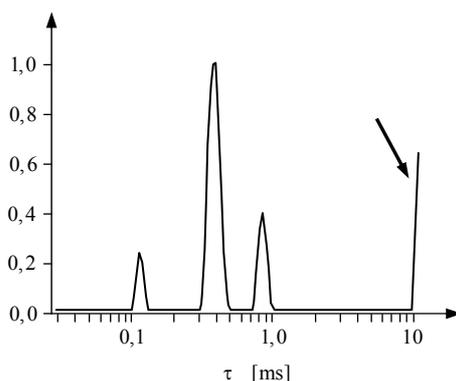


Abbildung II.9: Zerfallszeit-Spektrum einer Probe mit merklichem Anteil an Verunreinigungen innerhalb von  $\Delta t$ , deren Zerfallszeiten größer als 10ms sind und die beim Fitten durch die rechte Verteilungsflanke repräsentiert werden

Im dritten Fall schließlich, bei dem auch unterhalb von  $10 \cdot t_{\text{end}}$  Schmutzanteile im Zerfallszeitspektrum auftauchen, ist  $\tau_{\max}$  so groß zu wählen, dass diese Verunreinigungen mit in  $\Delta \tau$  enthalten sind; beispielhaft ist ein solcher Fall in Abb. II.8 dargestellt. Da hierbei die Einzelkorrelationsfunktionen der interessierenden Zerfälle mit denen der Schmutzpartikel stark überlappen, kann  $\tau_{\max}$  kaum unterhalb von  $10 \cdot t_{\text{end}}$  gelegt werden, ohne dass dabei die eigentlich zu untersuchenden Zerfälle merklich beeinflusst würden. Solange sich allerdings bei Verschiebung der rechten Grenze von  $\Delta \tau$  hin zu kürzeren Zeiten lediglich die Signale der Verunreinigungen in ihrer Position ändern, ist  $\tau_{\max}$  noch nicht zu klein.

Nach dem Setzen von  $\tau_{\max}$ , gilt es den Last Datapoint zu ermitteln. LP sollte zu Beginn zwischen 6- und 10-mal größer als  $\tau_{\max}$  gewählt werden. Dadurch erfasst

man sämtliche Zerfälle mit  $\tau < \tau_{\max}$  vollständig innerhalb der Messgenauigkeit (s. Kap. II.3).<sup>62)</sup>

Der optimale Wert für LP hängt ebenso wie derjenige von  $\tau_{\max}$  wesentlich von den Schmutzanteilen und ihren Zerfallszeiten relativ zu den interessierenden Korrelationszerfällen ab.

Enthält die Probe nur marginale Mengen an Verunreinigungen, kann LP teilweise sehr viel größer gewählt werden als  $10 \cdot \tau_{\max}$ . Da in diesem Fall nur diejenigen diskreten Verteilungen zu dem finalen regularisierten Spektrum beitragen, die die zulässige maximale Varianzbreite trotz des großen Korrelations-Zeitfensters  $\Delta t$  nicht überschreiten, weisen die geglätteten Verteilungskurven gewöhnlich deutlich geringere Linienbreiten auf. Beispielhaft ist in Abbildung II.10 die ungewichtete und die Anzahl-gewichtete Radiusverteilung einer Schallvesikelprobe aus BBSM in Abhängigkeit von LP bei konstant gehaltenem  $\tau_{\max}$  dargestellt.

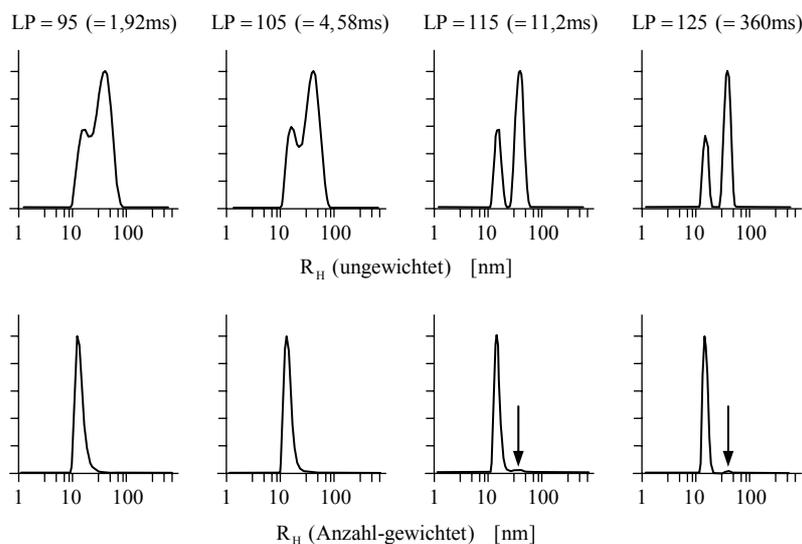


Abbildung II.10: Änderung der ungewichteten und der Anzahl-gewichteten Radiusverteilung bei sukzessiver LP-Vergrößerung beim Fitten einer Korrelationsfunktion einer Schallvesikel-Verteilung, bestehend aus BBSM.  $\tau_{\max}$  liegt stets bei 2ms.  $t_{\text{end}}$  beträgt hierbei 0,588ms.

<sup>62)</sup> Als Richtlinie für die Wahl des Startwerts für die Ermittlung des optimalen LPs kann ein Wert zwischen 140 und 150 (= 98,3ms bzw. 229,3ms) angesehen werden, vorausgesetzt die Wahl von LP wird nicht durch einen Sattelpunktverlauf von  $g(t)$  eingeschränkt.

Da einerseits jede Probe unvermeidlicherweise stets gewisse Verunreinigungen enthält, und andererseits jede Korrelationsfunktion auch bei größeren Zeiten  $t$  noch Rauschanteile besitzt, treten bei zu großen LP-Werten aufgrund der Peakmittelung (s. weiter oben) schließlich wieder Linienverbreiterungen auf. Dies ist umso eher der Fall, je höher der Anteil der Verunreinigungen in  $g(t)$  ist. Daher führt mitunter ebenso eine Verkleinerung von LP zu einer Peakverschmälerung.

Ferner existiert für den *Last Datapoint* eine Schwelle, unterhalb derer es stets zu einer Linienverbreiterung kommt. Dieses untere Limit liegt bei dem Zeitkanal 115 (= 11,2ms). Weiterhin sollte LP nicht unter  $6 \cdot t_{\text{end}}$  fallen. Unterschreitet LP diese Grenze, werden informationstragende Teile von Zerfällen, die in  $g(t)$  innerhalb von  $\Delta t$  enthalten sind, beim Fitten nicht mit berücksichtigt. In diesem Fall verschieben sich die Positionen der längsten Zerfälle in  $\Delta \tau$  zu etwas kleineren Zeiten.<sup>63)</sup>

Das Anpassen von  $\tau_{\text{max}}$  und LP ist meist sukzessiv mit simultaner Variation von  $\tau_{\text{max}}$  und LP durchzuführen. Solange  $\tau_{\text{max}}$  größer ist als LP, ändert sich durch Verkleinerung von  $\tau_{\text{max}}$  praktisch nichts an der Zerfallszeit-Verteilung. Gewöhnlich verschwinden die im Zerfallszeitspektrum vorhandenen Anteile der Verunreinigungen in einer gewichteten Radiusverteilung mehr oder weniger vollständig.

### *Stabilität der Lösung*

Am Ende des Parameter-Tunings können die Parameter separat leicht variiert werden, um zu prüfen, ob eine gewisse Stabilität der Lösung in einem kleinen Parameterbereich vorhanden ist. Bestätigt sich diese Stabilität, können die gefundenen Parameterwerte und die dazugehörige Lösung als verlässlich angesehen werden.

### *Absolute Werte – relative Verschiebungen*

Abschließend sei noch kurz darauf hingewiesen, dass oft das Interesse weniger bei absoluten Radiuswerten als vielmehr bei relativen Verschiebungen liegt, wie sie etwa bei Aggregationsdynamiken auftreten.

---

<sup>63)</sup> Semimathematisch kann die Verkleinerung der Zerfallszeit  $\tau$  beim Abschneiden eines Korrelationszerfalls im hinteren Bereich folgendermaßen verstanden werden:

Betrachtet wird  $g_1(t)$  im monomodalen Fall mit  $g_1(t) = \exp(-t/\tau)$ . Bestimmt man  $\tau$  in Abhängigkeit von  $t_{1/2}$ , d.h. in Abhängigkeit von der Zeit, bei der  $g_1(t)$  gerade auf die Hälfte zwischen  $g_1(t=0)$  und  $g_1(t \rightarrow \infty)$  abgefallen ist, erhält man  $\tau = t_{1/2}/\ln 2$ ; für  $g_2(t) - 1$  gilt ähnliches:  $\tau = 2t_{1/2}/\ln 2$ . Das Abschneiden der Korrelationsfunktion eines Zerfalls bewirkt, dass sich  $g_1(t \rightarrow \infty)$  erhöht und  $g_1(t_{1/2})$  (bei unverändertem  $g_1(t=0)$ ) deshalb bereits bei kleineren Zeiten erreicht wird. Infolge des in erster Näherung linearen Zusammenhangs zwischen  $t_{1/2}$  und  $\tau$  geht daher das Abschneiden von  $g(t)$  mit einer Verschiebung der Zerfallszeit  $\tau$  in Richtung kürzere Zeiten einher.

In diesem Fall genügen für eine Auswertung der Messdaten bereits die Mittelwerte der ungewichteten Verteilungen. Da diese Mittelwerte wesentlich weniger sensitiv gegenüber höheren Linienbreiten sind als im gewichteten Fall (s. Kap. II.2), können die Fits meist mit moderat angepassten  $\tau_{\max}$ - und LP-Werten durchgeführt werden, und aufwendige Parameteradaptionen an die einzelnen Korrelationsfunktionen erübrigen sich. Diese Vorgehensweise eignet sich besonders, wenn kein einheitlicher für alle Messungen befriedigender Fitparametersatz gefunden werden kann.



# Literaturverzeichnis

- [1] J. N. Israelachvili, „Thermodynamic and geometric aspects of amphiphile aggregation into micelles, vesicles and bilayers, and the interaction between them“ In *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions*, V. Degiorgio, editor, North-Holland 1985
- [2] E. Evans und D. Needham, „Physical properties of surfactant bilayer membranes: Thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions“, *J. Phys. Chem.*, **91** (1987), 4219-4228
- [3] F. London, „Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte“, *Z. Phys.*, **63** (1930), 245-79
- [4] F. London, „The General Theory of Molecular Forces“ *Trans. Faraday Soc.*, **33** (1937), 8-26, (1937)
- [5] U. W. Schmitt, G. A. Voth, „The isotope substitution effect on the hydrated proton“, *Chem. Phys. Lett.*, **329** (2000), 36-41
- [6] M. Gutman, E. Nachliel, „The dynamics of proton exchange between bulk and surface groups“, *Biochim. Biophys. Acta*, **1231** (1995), 123-138
- [7] C. Crepin und A. Tramer, „Electronic spectra and proton transfer in the phenol/(NH<sub>3</sub>)<sub>n</sub> clusters in argon matrices“, *Chem. Phys.*, **156** (1991), 281-291
- [8] J. A. Syage und J. Steadman, „Picosecond measurements of phenol excited-state proton transfer in clusters. I. Solvent basicity and cluster size effects“, *J. Chem. Phys.*, **95** (1991), 2497-2510
- [9] P. L. Huyskens, W. A. P. Luck, T. Zeegers-Huyskens, *Intermolecular Forces: An Introduction to Modern Methods and Results*, Springer-Verlag, 1991
- [10] R. M. Helm, H.-P. Vogel, H. J. Neusser, „Rotational analysis and tunnel splittings of the intermolecular vibrations of the phenol-water complex by high resolution UV spectroscopy“, *J. Chem. Phys.*, **108** (1998), 4496-4504
- [11] R. S. Mulliken, „Criteria for the Construction of Good Self-Consistent Field Molecular Orbital Wavefunctions and the Significance of LCAO-MO Population Analysis“, *J. Chem. Phys.*, **36** (1962), 3428-3439
- [12] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 2. Auflage, Academic Press, London 1992

- [13] K. Morokuma, „Why do molecules interact? The origin of electron donor-acceptor complexes, hydrogen bonding and proton affinity“, *Acc. Chem. Res.*, **10** (1977), 294
- [14] K. Morokuma, K. Kitaura in: H. Ratajczak, W. J. Orville-Thomas, *Molecular Interactions*, Vol. 1, John Wiley & Sons Inc., 1981
- [15] G. L. Nelsestuen, „Significance of reduced dimensionality in reaction kinetics: impact of multi-site particles“, *Chem. Phys. Lipids*, **101** (1999), 37-44
- [16] E. Sackmann, „Biological membranes: architecture and function“ In *Handbook of Biological Physics* Bd. 1A, Elsevier, Amsterdam 1995, S. 1-63
- [17] M. Bloom, E. Evans und O. G. Mouritsen, „Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective“, *Quart. Rev. Biophys.*, **24** (1991), 293-397
- [18] J. M. Smaby, H. L. Brockman, R. E. Brown, „Cholesterol's interfacial interactions with sphingomyelins and phosphatidylcholines: Hydrocarbon chain structure determines the magnitude of condensation“, *Biochemistry*, **33** (1994), 9135-9142
- [19] A. Rietveld, K. Simons, „The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts“, *Biochim. Biophys. Acta*, **1376** (1998), 467-379
- [20] M. J. Ruocco, D. J. Siminovitch, J. R. Long, S. K. Das Gupta, R G. Griffin, „<sup>2</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study of N-palmitoyl-galactosylsphingosine (cerebroside)/cholesterol bilayers“, *Biophys. J.*, **71** (1996), 1776-1788
- [21] B. Ramstedt, P. Leppimäki, M. Axberg, J. P. Slotte, „Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography“, *Eur. J. Biochem.*, **266** (1999), 997-1002
- [22] J. H. Davis, „The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by deuterium NMR“, *Biochim. Biophys. Acta*, **737** (1983), 117-171
- [23] D. B. Fenske, „Structural and motional properties of vesicles as revealed by nuclear magnetic resonance“, *Chem. Phys. Lipids*, **64** (1993), 143-162
- [24] G. W. Stockton und I. C. P. Smith, „A deuterium nuclear magnetic resonance study of the condensing effect of cholesterol on egg phosphatidylcholine bilayer membranes. I. Perdeuterated fatty acid probes“, *Chem. Phys. Lipids*, **17** (1976), 251-263
- [25] G. W. Stockton, C. F. Polnaszek, A. P. Tulloch und F. Hasan, „Molecular motion and order in single-bilayer vesicles and multilamellar dispersions of egg lecithin and lecithin-cholesterol mixtures. A deuterium nuclear magnetic resonance study of specifically labelled lipids“, *Biochemistry*, **15** (1976), 954-966

- [26] G. Lindblom und G. Orädd, „NMRstudies of translational diffusion in lyotropic liquid crystals and lipid membranes“, *Prog. NMR Spec.*, **26** (1994), 483-515
- [27] E. Evans und D. Needham, „Surface-density transitions, surface elasticity and rigidity and rupture strength of lipid bilayer membranes“ In *Physics of Amphiphilic Layers* V. 21, Springer-Verlag, 1987
- [28] E. Sackmann, „Physical basis of self-organization and function of membranes: physics of vesicles“ In *Handbook of Biological Physics* Bd. 1A, Elsevier, Amsterdam 1995, S. 213-304
- [29] P. C. M. M. Magusin und M. A. Hemminga, „A theoretical study of rotational diffusion models for rod-shaped viruses, the influence of motion on <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance lineshapes and transversal relaxation“, *Biophys. J.*, **64** (1993), 1851-1860
- [30] P. L. Yeagle, „Modulation of membrane function by cholesterol“, *Biochimie*, **73** (1990), 1508-1514
- [31] M. Edidin, „THE STATE OF LIPID RAFTS: From Model Membranes to Cells“, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32** (2003), 257-283
- [32] T. Lang, D. Bruns, D. Wenzel, D. Riedel, P. Holroyd et al., „SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis“, *EMBO J.*, **20** (2001), 2202-2213
- [33] S. K. Rodal, G. Skretting, Ø. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, K. Sandvig, „Extraction of cholesterol with methyl-β-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles“, *Mol. Biol. Cell*, **10** (1999), 961-974
- [34] A. Subtil, I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. A. Lampson, J. H. Keen, T. E. McGraw, „Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** (1999), 6775-6780
- [35] J. Kwik, S. Boyle, D. Fooksman, L. Margolis, M. P. Sheetz, M. Edidin, „Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100** (2003), 13964-13969
- [36] A. Nagy, R. R. Baker, S. J. Morris, V. P. Whittaker, „The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity“, *Brain Res.*, **109** (1976), 285-309
- [37] W. C. Breckenridge I. G. Morgan, J. P. Zanetta und G. Vincendon, „Adult rat brain synaptic vesicles: II. Lipid composition“, *Biochim. Biophys. Acta*, **320** (1973), 681-686
- [38] C. Cotman, M. L. Blank, A. Moehl und F. Snyder, „Lipid Composition of Synaptic Plasma Membranes Isolated from Rat Brain by Zonal Centrifugation“, *Biochemistry*, **8** (1969), 4606-4612

- [39] W. C. Breckenridge, G. Gombos und I. G. Morgan, „The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes“, *Biochim. Biophys. Acta*, **266** (1972), 695-707
- [40] J. Eichberg, V. P. Whittaker und R. M. C. Dawson, „Distribution of lipids in subcellular particles of guinea pig brain“, *Biochem. J.*, **92** (1964), 91-100
- [41] Y. Barenholz, T. E. Thompson, „Sphingomyelins in bilayers and biological membranes“, *Biochim. Biophys. Acta*, **604** (1980), 129-158
- [42] L. Nyberg, R. D. Duan, A. Nilsson, „Sphingomyelin. A dietary component with structural and biological function“, *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **108** (1998), 119-128
- [43] P. M. Rudd, M. R. Wormald, D. R. Wing, S. B. Prusiner, R. A. Dwek, „Prion glycol-protein: structure, dynamics and roles for the sugars“, *Biochemistry*, **40** (2001), 3759-3766
- [44] S. J. Singer, G. L. Nicolson, „The fluid mosaic model of the structure of cell membranes“, *Science*, **175** (1972), 720-731
- [45] O. G. Mouritsen, M. Bloom, „Mattress model of lipid-protein interactions in membranes“ *Biophys. J.*, **46** (1984), 141-153
- [46] M. K. Jain, H. B. White 3rd., „Long-range order in biomembranes“, *Adv. Lipid Res.*, **15** (1977), 1-60
- [47] R. D. Klausner, A. M. Kleinfeld, R. L. Hoover, M. J. Karnovsky, „Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis“, *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 1286-1295
- [48] K. Gawrisch, J. A. Barry, L. L. Holte, T. Sinnwell, L. D. Bergelson, J. A. Ferretti, „Role of interactions at the lipid-water interface for domain formation“ *Mol. Membr. Biol.*, **12** (1995), 83-88
- [49] C. C. Curtain, L. M. Gordon, R. C. Aloia, „Lipid domains in biological membranes: conceptual development and significance“ In *Lipid Domains and the Relationship to Membrane Function* Bd. 2, Alan R. Liss, New York 1988, S. 1-15
- [50] H. Heerklotz, „Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures“, *Biophys. J.*, **83** (2002), 2693-2701
- [51] C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volvyk, N. L. Thompson, M. Levi et al., „Lipid rafts reconstituted in model membranes“, *Biophys. J.*, **80** (2001), 1417-1428
- [52] C. Dietrich, Z. N. Volvyk, M. Levi, N. L. Thompson, K. Jacobson, „Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001), 10642-10647

- [53] A. V. Samsonov, I. Mihalyov, F. S. Cohen, „Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes”, *Biophys. J.*, **81** (2001), 1486-1500
- [54] J. M. Boggs, „Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function”, *Biochim. Biophys. Acta*, **906** (1987), 353-404
- [55] J. M. Holopainen, A. J. Metso, J.-P. Mattila, A. Jutila, und P. K. J. Kinnunen, „Evidence for the Lack of a Specific Interaction between Cholesterol and Sphingomyelin”, *Biophys. J.*, **86** (2004), 1510-1520
- [56] S. Scarlata, „Regulation of the lateral association of phospholipase C<sup>β</sup> 2 and G protein subunits by lipid rafts”, *Biochemistry* **41** (2002), 7092-7099
- [57] L. J. Pike, L. Casey, „Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking”, *Biochemistry*, **41** (2002), 10315-10322
- [58] N. Naslavsky, H. Shmeeda, G. Friedlander, A. Yanai, A. H. Futerman, Y. Barenholz, A. Taraboulos, „Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions”, *J. Biol. Chem.*, **274** (1999), 20763-20771
- [59] J. Neugebauer, *Detergents*, Hoechst Celanese Corp., Potsdam, New York 1987
- [60] J. Seelig, „Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes”, *Quart. Rev. Biophys.*, **10** (1977), 353-418
- [61] K. Arnold, A. Lösche und K. Gawrisch, „<sup>31</sup>P-NMR investigations of phase separation in phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine mixtures”, *Biochim. Biophys. Acta*, **645** (1981), 143-148
- [62] D. Marsh, J. M. Seddon, „Gel-to-inverted hexagonal (L beta-HII) phase transitions in phosphatidylethanolamines and fatty acid- phosphatidylcholine mixtures, demonstrated by <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy and x-ray diffraction”, *Biochim. Biophys. Acta*, **690** (1982), 117-123
- [63] P. A. Thiel, T. E. Madey, „The interaction of water with solid surfaces: Fundamental aspects”, *Surf. Sci. Rep.*, **7** (1987), 211-385
- [64] H. Frischleder und G. Peinel, „Quantum-chemical and statistical calculations on phospholipids“, *Chem. Phys. Lipids*, **30** (1982), 121-158
- [65] E. G. Finer, A. Darke, „Phospholipid hydration studied by deuterium magnetic resonance spectroscopy”, *Chem. Phys. Lipids*, **12** (1974), 1-16
- [66] F. Volke, S. Eisenblätter, J. Galle, G. Klose, „Dynamic properties of water at phosphatidylcholine lipid-bilayer surfaces as seen by deuterium and pulsed field gradient proton NMR”, *Chem. Phys. Lipids*, **70** (1994), 121-131

- [67] H. H. Mantsch, H. Saito und I. C. P. Smith, „Deuterium magnetic resonance, applications in chemistry, physics and biology“, in: J. W. Emsly, J. Finley und L. H. Sutcliffe, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, chapter 4, S. 211-271, Pergamon Press, 1978
- [68] S. Bicknese, N. Periasamy, S. B. Shohet, A. S. Verkman, „Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: measurement by evanescent field frequency-domain microfluorimetry“, *Biophys. J.*, **65** (1993), 1272-1282
- [69] T. Lefèvre, M. Subirade, „Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy“, *Int. J. Biol. Macromol.*, **28** (2000), 59-67
- [70] H. Binder, K. Arnold, A. S. Ulrich, O. Zschörnig, „Interaction of  $Zn^{2+}$  with phospholipid membranes“, *Biophys. Chem.*, **90** (2001), 57-74
- [71] J. Wolfe, G. Bryant, „Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems“, *Cryobiology*, **39** (1999), Nr. 2, S. 103-129
- [72] S. Cinelli, G. Onori, A. Santucci, „Solvent isotope effects on the phase transition properties of lipid bilayers“, *Colloids Surf. B*, **20** (2001), 297-302
- [73] M. R. Vist, J. H. Davis, „Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoyl-phosphatidylcholine mixtures:  $^2H$  nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry“, *Biochemistry*, **29** (1990), 451-464
- [74] H. G. Coster, D. R. Laver, B. P. Schoenborn, „Effect of  $^2H_2O/H_2O$  replacement on the dielectric structure of lipid bilayer membranes“, *Biochim. Biophys. Acta*, **686** (1982), 141-143
- [75] G. Cevc, D. Marsh, „Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models“, Bd. 5 In *Cell Biology: A Series of Monographs*, John Wiley & Sons, New York 1987
- [76] P. R. Cullis, „Lateral diffusion rates of phosphatidylcholine in vesicle membranes: effects of cholesterol and hydrocarbon phase transitions“, *FEBS Letters*, **70** (1976), 223-228
- [77] M. Bloom, E. E. Burnell, A. L. MacKay, C. P. Nichol, M. I. Valic, und G. Weeks, „Fatty acyl chain order in lecithin model membranes determined from proton magnetic resonance“, *Biochemistry*, **17** (1978), 5750-5762
- [78] P. Karakatsanis und T. M. Bayerl, „Diffusion measurements in oriented phospholipid bilayers by  $^1H$ -NMR in a static fringe field gradient“, *Phys. Rev. E*, **54** (1996), 1785-1790
- [79] S. Mulukutla, G. G. Shipley, „Structure and thermotropic properties of phosphatidylethanolamine and its N-methyl derivative“, *Biochemistry*, **23** (1984), 2514-2519

- [80] H. L. Casal und H. H. Mantsch, „Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy“, *Biochim. Biophys. Acta*, **779** (1984), 381-401
- [81] M. J. Ruocco und G. G. Shipley, „Thermal and structural behavior of natural cerebroside 3-sulfate in bilayer membranes“, *Biochim. Biophys. Acta*, **859** (1986), 246-256
- [82] K. Harlos, „Pretransitions in the hydrocarbon chains of phosphatidylethanolamines. A wide angle X-ray diffraction study“, *Biochim. Biophys. Acta*, **511** (1978), 348-255
- [83] M. A. Hemminga, „<sup>31</sup>P-NMR studies of oriented phospholipid multilayers“, *J. Magn. Res.*, **47** (1982), 307-323
- [84] B. Tümmler, U. Herrmann, G. Maass, H. Eibl, „Kinetics of the subtransition of asymmetrically substituted phosphatidylcholines“, *Biochemistry*, **23** (1984), 4068-4074
- [85] D. Marsh, „Molecular motion in phospholipid bilayers in the gel phase: long axis rotation“, *Biochemistry*, **19** (1980), 1632-1637
- [86] L. W. Trahms, D. Klabe und E. Boroske, „<sup>1</sup>H-NMR study of the three low temperature phases of DPPC-water systems“, *Biophys. J.*, **42** (1983), 285-293
- [87] Y. C. W. van der Leeuw und G. Stulen, *J. Magn. Res.*, **42** (1981), 434-445
- [88] H. H. Fuldner, „Characterization of a third phase transition in multilamellar dipalmitoyllecithin liposomes“, *Biochemistry*, **20** (1981), 5707-5710
- [89] J. C. W. Shepherd und G. Büldt, „The influence of cholesterol on head group mobility in phospholipid membranes“, *Biochim. Biophys. Acta*, **558** (1979), 41-47
- [90] J. C. W. Shepherd und G. Büldt, „Zwitterionic dipoles as a dielectric probe for investigating head group mobility in phospholipid membranes“, *Biochim. Biophys. Acta*, **514** (1978), 83-94
- [91] K. Larsson, „Folded bilayers — an alternative to the rippled lamellar lecithin structure“, *Chem. Phys. Lipids*, **20** (1977), 225-228
- [92] A. Tardieu, V. Luzzati, F. C. Reman, „Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases“, *J. Mol. Biol.*, **75** (1973), 711-733
- [93] M. J. Janiak, D. M. Small, G. G. Shipley, „Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin“, *J. Biol. Chem.*, **254** (1979), 6068-6078

- [94] U. Strehlow, F. Jähnig, „Electrostatic interactions at charged lipid membranes. Kinetics of the electrostatically triggered phase transition”, *Biochim. Biophys. Acta*, **641** (1981), 301-310
- [95] T. Y. Tsong, „Kinetics of the crystalline-liquid crystalline phase transition of dimyristoyl L-alpha-lecithin bilayers”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **71** (1974), 2684-2688
- [96] T. Y. Tsong und M. I. Kanehisa, „Relaxation phenomena in aqueous dispersions of synthetic lecithins”, *Biochemistry*, **16** (1977), 2674-2680
- [97] B. Steinbauer, *Dynamik und Struktur lamellarer Lipidmischungen als Funktion der Hydratation*, Dissertation, Technische Universität München 2001
- [98] G. Kortüm, *Einführung in die chemische Thermodynamik*, Göttingen 1949
- [99] B. Katz, R. Miledi, „Ionic requirements of synaptic transmitter release”, *Nature*, **215** (1967), 651
- [100] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, Th. M. Jessell, *Neurowissenschaften*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1995
- [101] P. Fatt, B. Katz, „Membrane potentials at the motor end-plate”, *J. Physiol.*, **3**(3-4) (1950), 46-47
- [102] D. Fawcett, *The Cell*, 2. Auflage, Philadelphia: Saunders 1981
- [103] S. W. Kuffler, J. G. Nicholls, A. R. Martin, *From Neuron to Brain: A Cellular Approach to the Function of the Nervous System*, 2. Auflage, Sunderland, Mass.: Sinauer 1984
- [104] T. C. Südhof, „The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions“, *Nature*, **375** (1995), 645-653
- [105] D. P. C. Lloyd in *Handbook of Physiology, Section I: Neurophysiology Vol. II*, S. 929-949, American Physiology Society, Washington, DC 1960
- [106] M. Raastad, J. F. Storm, P. Andersen, „Putative Single Quantum and Single Fibre Excitatory Postsynaptic Currents Show Similar Amplitude Range and Variability in Rat Hippocampal Slices”, *Eur. J. Neurosci.*, **4** (1992), 113-117
- [107] N. A. Hessler, A. M. Shirke, R. Malinow, „The probability of transmitter release at a mammalian central synapse”, *Nature*, **366** (1993), 569-572
- [108] C. Rosenmund, J. D. Clements, G. L. Westbrook, „Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse”, *Science*, **262** (1993), 754-757
- [109] S. W. Whiteheart, K. Rossmagel, S. A. Buhrow, M. Brunner, R. Jaenicke, J. E. Rothman, „N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion”, *J. Cell. Biol.*, **126** (1994), 945-954

- [110] D. O. Clary, I. C. Griff, J. E. Rothman, „SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast”, *Cell*, **61** (1990), 709-721
- [111] R. C. Lin und R. H. Scheller, „Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis“, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16** (2000), 19-49
- [112] T. Söllner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Gero-manos, P. Tempst, J. E. Rothman, „SNAP receptors implicated in vesicle tar-geting and fusion”, *Nature*, **362** (1993), 318-324
- [113] H. T. McMahon, T. C. Südhof<sup>4</sup> „Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site”, *J. Biol. Chem.*, **270** (1995), 2213-2217
- [114] T. A. Ryan, „Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing”, *J. Neurosci.*, **19** (1999), 1317-1323
- [115] S. Mochida, H. Kobayashi, Y. Matsuda, Y. Yuda, K. Muramoto, Y. Nono-mura, „Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed be-tween rat sympathetic neurons in culture”, *Neuron*, **13** (1994), 1131-1142
- [116] K. Kumakura, K. Sasaki, T. Sakurai, M. Ohara-Imaizumi, H. Misonou et al., „Essential role of myosin light chain kinase in the mechanism for MgATP-dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells”, *J. Neurosci.*, **14** (1994), 7695-7703
- [117] J. E. Heuser, T. S. Reese, „Evidence for recycling of synaptic vesicle mem-brane during transmitter release at the frog neuromuscular junction”, *J. Cell. Biol.*, **57** (1973), 315-344
- [118] G. Fischer von Mollard, B. Stahl, C. Walch-Solimena, K. Takei, L. Daniels, A. Khoklatchev, P. De Camilli, T. C. Südhof, und R. Jahn, „Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesi-cle recycling pathway”, *Eur. J. Cell Biol.*, **65** (1994), 319-326
- [119] D. M. Landis, A. K. Hall, L. A. Weinstein, T. S. Reese, „The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system syn-apse”, *Neuron*, **1** (1988), 201-209
- [120] W. J. Betz, G. S. Bewick, „Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction”, *Science*, **255** (1992), 200-203
- [121] T. A. Ryan, H. Reuter, B. Wendland, F. E. Schweizer, R. W. Tsien, S. J. Smith, „The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single pre-synaptic boutons”, *Neuron*, **11** (1993), 713-724
- [122] R. Nieuwenhuys, J. Voogd, Chr. van Huijzen, *The Human Central Nervous System: A Synopsis and Atlas*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin 1981

- [123] J. M. Fearnley und A. J. Lees, „Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity”, *Brain*, **114** (1991), 2283-2301
- [124] F. H. Lewy, in *Handbuch der Neurologie* (Lewandowski, M., ed), Springer-Verlag, Berlin 1912, 920-933
- [125] M. S. Pollanen, D. W. Dickson und C. Bergeron, „Pathology and biology of the Lewy body”, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **52** (1993), 183-191
- [126] L. S. Forno, „Neuropathology of Parkinson's disease”, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **55** (1996), 259-272
- [127] M. Goedert, „Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases”, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2** (2001), 492-501
- [128] P. H. Weinreb, W. Zhen, A. W. Poon, K. A. Conway, und P. T. Lansbury, „NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded”, *Biochemistry*, **35** (1996), 13709-13715
- [129] D. Eliezer, E. Kutluay, R. Bussell und G. Browne, „Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states”, *J. Mol. Biol.*, **307** (2001), 1061-1073.
- [130] W. S. Davidson, A. Jonas, D. F. Clayton und J. M. George, „Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes”, *J. Biol. Chem.*, **273** (1998), 9443-9449
- [131] R. J. Perrin, W. S. Woods, D. F. Clayton und J. M. George, „Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis“, *J. Biol. Chem.*, **275** (2000), 34393-34398
- [132] E. Jo, J. McLaurin, C. M. Yip, P. St. George-Hyslop und P. E. Fraser, „alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity“, *J. Biol. Chem.*, **275** (2000), 34328-34334
- [133] S. Chandra, X. Chen, J. Rizo, R. Jahn und T. C. Südhof, „A broken alpha-helix in folded alpha-Synuclein”, *J. Biol. Chem.*, **278** (2003), 15313-15318
- [134] R. Bussell, D. Eliezer, „A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins”, *J. Mol. Biol.*, **329** (2003), 763-78
- [135] V. Narayanan und S. Scarlata, „Membrane binding and self-association of alpha-synucleins”, *Biochemistry*, **40** (2001), 9927-9934
- [136] E. Jo, N. Fuller, R. P. Rand, P. St George-Hyslop und P. E. Fraser, „Defective membrane interactions of familial Parkinson's disease mutant A30P alpha-synuclein”, *J. Mol. Biol.*, **315** (2002), 799-807
- [137] B. Nuscher, F. Kamp, T. Mehnert, S. Odoy, C. Haass, P. J. Kahle, K. Beyer, „Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study”, *J. Biol. Chem.*, **279** (2004), 21966-21975

- [138] M. Hashimoto, L. J. Hsu, A. Sisk, Y. Xia, A. Takeda, M. Sundsmo et al., „Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease“, *Brain Res.*, **799** (1998), 301-306
- [139] B. I. Giasson, K. Uryu, J. Q. Trojanowski und V. M. Lee, „Mutant and wild type human alpha-synuclein assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro“, *J. Biol. Chem.*, **274** (1999), 7619-7622
- [140] L. Narhi, S. J. Wood, S. Steavenson, Y. Jiang, G. M. Wu, D. Anafi et al., „Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation“, *J. Biol. Chem.*, **274** (1999), 9843-9848
- [141] K. A. Conway, J. D. Harper und P. T. Lansbury, „Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid“, *Biochemistry*, **39** (2000), 2552-2563
- [142] K. A. Conway, S. J. Lee, J. C. Rochet, T. T. Ding, R. E. Williamson und P. T. Lansbury, „Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (2000), 571-576
- [143] A. Iwai, M. Yoshimoto, E. Masliah und T. Saitoh, „Non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) is amyloidogenic“, *Biochemistry*, **34** (1995), 10139-10145
- [144] H. Han, P. H. Weinreb und P. T. Lansbury, „The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease?“, *Chem. Biol.*, **2** (1995), 163-169
- [145] M. Yoshimoto, A. Iwai, D. Kang, D. A. Otero, Y. Xia und T. Saitoh, „NACP, the precursor protein of the nonamyloid beta/A4 protein (A beta) component of Alzheimer disease amyloid, binds A beta and stimulates A beta aggregation“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** (1995), 9141-9145
- [146] C. B. Lücking und A. Brice, „Alpha-synuclein and Parkinson's disease“, *Cell. Mol. Life Sci.*, **57** (2000), 1894-1908
- [147] L. C. Serpell, J. Berriman, R. Jakes, M. Goedert und R. A. Crowther, „Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (2000), 4897-4902
- [148] A. L. Biere, S. J. Wood, J. Wypych, S. Steavenson, Y. Jiang, D. Anafi, F. W. Jacobsen, M. A. Jarosinski, G.-M. Wu, J.-C. Louis, F. Martin, L. O. Narhi und M. Citron, „Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is more fibrillogenic than beta- and gamma-synuclein and cannot cross-seed its homologs“, *J. Biol. Chem.*, **275** (2000), 34574-34579
- [149] M. Hashimoto, E. Rockenstein, M. Mante, M. Mallory und E. Masliah, „beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor“, *Neuron*, **32** (2001), 213-223

- [150] V. N. Uversky, J. Li, P. Souillac, I. S. Millett, S. Doniach, R. Jakes, M. Goedert und A. L. Fink, „Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins“, *J. Biol. Chem.*, **277** (2002), 11970-11978
- [151] J. Y. Park, und P. T. Lansbury, „Beta-synuclein inhibits formation of alpha-synuclein protofibrils: a possible therapeutic strategy against Parkinson's disease“, *Biochemistry*, **42** (2003), 3696-3700
- [152] O. M. El-Agnaf, R. Jakes, M. D. Curran, D. Middleton, R. Ingenito, E. Bianchi et al., „Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments“, *FEBS Lett.*, **440** (1998), 71-75
- [153] M. Zhu und A. L. Fink, „Lipid Binding Inhibits  $\alpha$ -Synuclein Fibril Formation“, *J. Biol. Chem.*, **278** (2003), 16873-16877
- [154] A. Der-Sarkissian, C. C. Jao, J. Chen und R. Langen, „Structural Organization of  $\alpha$ -Synuclein Fibrils Studied by Site-directed Spin Labeling“, *J. Biol. Chem.*, **278** (2003), 37530-37535
- [155] R. A. Crowther, R. Jakes, M. G. Spillantini und M. Goedert, „Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein“, *FEBS Lett.*, **436** (1998), 309-312
- [156] T. Gomez-Isla, M. C. Irizarry, A. Mariash, B. Cheung, O. Soto, S. Schrupp, J. Sondel, L. Kotilinek, J. Day, M. A. Schwarzschild, J. H. Cha, K. Newell, D. W. Miller, K. Ueda, A. B. Young, B. T. Hyman, K. H. Ashe, „Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice“, *Neurobiol. Aging*, **24** (2003), 245-258
- [157] R. L. Klein, M. A. King, M. E. Hamby, E. M. Meyer, „Dopaminergic cell loss induced by human A30P alpha-synuclein gene transfer to the rat substantia nigra“, *Hum. Gene Ther.*, **13** (2002), 605-612
- [158] R. Bussell, D. Eliezer, „Effects of Parkinson's disease-linked mutations on the structure of lipid-associated alpha-synuclein“, *Biochemistry*, **43** (2004), 4810-4818
- [159] K. K. Dev, K. Hofele, S. Barbieri, V. L. Buchman, H. van der Putten, „Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease“, *Neuropharmacology*, **45** (2003), 14-44
- [160] Q. L. Ma, P. Chan, M. Yoshii, K. Ueda, „Alpha-synuclein aggregation and neurodegenerative diseases“, *J. Alzheimers. Dis.*, **5** (2003), 139-148
- [161] J. Li, V. N. Uversky, A. L. Fink, „Conformational behavior of human alpha-synuclein is modulated by familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T“, *Neurotoxicology*, **23** (2002), 553-567

- [162] R. Bussell, D. Eliezer, „Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein”, *J. Biol. Chem.*, **276** (2001), 45996-6003
- [163] J. Li, V. N. Uversky, A. L. Fink, „Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein”, *Biochemistry*, **40** (2001), 11604-11613
- [164] K. A. Conway, J. D. Harper, P. T. Lansbury, „Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease”, *Nat. Med.*, **4** (1998), 1318-1320
- [165] M. K. Lee, W. Stirling, Y. Xu, X. Xu, D. Qui, A. S. Mandir, T. M. Dawson, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, D. L. Price, „Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 -->Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (2002), 8968-8973
- [166] P. T. Kotzbauer, B. I. Giasson, A. V. Kravitz, L. I. Golbe, M. H. Mark, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, „Fibrillization of alpha-synuclein and tau in familial Parkinson's disease caused by the A53T alpha-synuclein mutation”, *Exp. Neurol.*, **187** (2004), 279-288
- [167] J. J. Zarranz, J. Alegre, J. C. Gomez-Esteban, E. Lezcano, R. Ros, I. Ampuero, L. Vidal, J. Hoenicka, O. Rodriguez, B. Atares, V. Llorens, E. Gomez-Tortosa, T. del Ser, D. G. Munoz, J. G. de Yébenes, „The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia”, *Ann. Neurol.*, **55** (2004), 164-173
- [168] P. H. Jensen, M. S. Nielsen, R. Jakes, C. G. Dotti und M. Goedert, „Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation”, *J. Biol. Chem.*, **273** (1998), 26292-26294
- [169] M. J. Volles, S. J. Lee, J. C. Rochet, M. D. Shtilerman, T. T. Ding, J. C. Kessler und P. T. Lansbury, „Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease”, *Biochemistry*, **40** (2001), 7812-7819
- [170] M. J. Volles und P. T. Lansbury, „Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism”, *Biochemistry*, **41** (2002), 4595-4602
- [171] K. A. Conway, J. C. Rochet, R. M. Bieganski, und P. T. Lansbury, „Kinetic Stabilization of the  $\alpha$ -Synuclein Protofibril by a Dopamine- $\alpha$ -Synuclein Adduct”, *Science*, **294** (2001), 1346-1349
- [172] F. Bovey, L. Jelinski, P. A. Mirau, *Nuclear Magnetic Resonanz Spectroscopy*, 2. Auflage, New York: Academic Press, 1988

- [173] G. Gemmecker, *Advanced NMR Spectroscopy → Basic Principles of FT NMR* ([http://www.spectroscopynow.com/Spy/basehtml/SpyH/1,1181,0-1-1-0-143-news\\_detail-0416242292-143,00.html](http://www.spectroscopynow.com/Spy/basehtml/SpyH/1,1181,0-1-1-0-143-news_detail-0416242292-143,00.html)) (1999)
- [174] R. G. Griffin, „Solid state nuclear magnetic resonance of lipid bilayers”, *Methods in Enzymology*, **72** (1981), 108-174
- [175] H. Haken, H. Wolf, *Atom- und Quantenphysik*, 5. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 1993
- [176] C. P. Slichter, *Principles of magnetic resonance*, Springer-Verlag, Heidelberg 1990
- [177] T. Mayer-Kuckuck, *Kernphysik: Eine Einführung*, Teubner-Verlag, Stuttgart 1984
- [178] J. R. Hoyland, „Ab initio bond orbital calculations. I. Application to methane, ethane, propane and propylene.”, *J. Am. Chem. Soc.*, **90** (1968), 2227-2232
- [179] W. Derbyshire, T. Gorvin & D. Warner, „A deuterium magnetic resonance study of a single crystal of deuterated malonic acid.”, *Molec. Phys.*, **17** (1969), 401-407
- [180] R. G. Barnes & J. W. Bloom, „Deuteron quadrupole couplings in deuterated glycine.” *Molec. Phys.*, **25** (1973), 493-494
- [181] B. M. Fung, „Nuclear quadrupole coupling constants.” In *Critical Evaluation of Chemical and Physical structural Information* (D. R. Lide & M. A. Paul), Washington D.C.: National Academy of Sciences 1974
- [182] B. M. Fung & I. Y. Wei, „Proton and Deuteron magnetic resonance of phenylsilane-d<sub>3</sub>, phenylphosphine-d<sub>2</sub> and benzenethio-d in liquid crystal solutions.”, *J. Am. Chem. Soc.*, **92** (1970), 1497-1501
- [183] A. Seelig, J. Seelig, „The dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipids bilayer measured by deuterium magnetic resonance.”, *Biochemistry*, **13** (1974), 4839-4845
- [184] A. A. Nevzorov, T. P. Trouard & M. F. Brown, „Lipid bilayer dynamics from simultaneous analysis of orientation and frequency dependence of deuterium spin-lattice and quadrupolar order relaxation.”, *Phys. Rev. E*, **58** (1998), 2259-2281
- [185] R. L. Thurmond, D. Oten, M. F. Brown & K. Beyer, „Structure and Packing of Phosphatidylcholines in Lamellar and Hexagonal Liquid-Crystalline Mixtures with a Nonionic Detergent: A Wide-Line Deuterium and Phosphorus-31 NMR Study.”, *J. Phys. Chem.*, **98** (1994), 972-983
- [186] H. Schindler, J. Seelig, „Deuterium order parameters in relation to thermodynamic properties of a phospholipids bilayer. A statistical mechanical interpretation.”, *Biochemistry*, **14** (1975), 2283-2287

- [187] A. Salmon, S. W. Dodd, G. D. Williams, J. M. Beach, M. F. Brown, „Configurational Statistics of Acyl Chains in Polyunsaturated Lipid Bilayers from  $^2\text{H-NMR}$ .”, *J. Am. chem. Soc.*, **109** (1987), 2600-2609
- [188] J. F. Nagle, S. Tristram-Nagle, „Structure of lipid bilayers.”, *Biochim. Biophys. Acta*, **1469** (2000), 159-195
- [189] H. I. Petrache, K. Tu, J. F. Nagle, „Analysis of simulated NMR order parameters for lipid bilayer structure determination”, *Biophys. J.*, **76** (1999), 2479-2487
- [190] H. I. Petrache, S. W. Dodd, M. F. Brown, „Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by  $(2)\text{H}$  NMR spectroscopy”, *Biophys. J.*, **79** (2000), 3172-3192
- [191] M. Jansson, R. L. Thurmond, J. A. Barry, M. F. Brown, „Deuterium NMR study of intermolecular interactions in lamellar phases containing palmitoyllysophosphatidylcholine.”, *J. Phys. Chem.*, **96** (1992), 9532-9544
- [192] T. P. Trouard, *Acyl chain dynamics in model phospholipids membranes as studied by deuterium NMR spectroscopy*, Ph.D. Thesis, University of Virginia 1992
- [193] T. P. Trouard, T. M. Alam, J. Zajicek, M. F. Brown, „Angular anisotropy of  $^2\text{H}$  NMR spectral densities in phospholipids bilayers containing cholesterol”, *Chem. Phys. Lett.*, **189** (1992), 67-75
- [194] J. H. Davis, „Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoylphosphatidylcholine”, *Biophys. J.*, **27** (1979), 339-358
- [195] J. Lloyd-Smith, *Broadline  $^1\text{H}$  and  $^2\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Studies of Binary Lipid Mixtures Containing Docosahexaenoic Acid*, Dissertation, University of British Columbia, Vancouver, Canada 1996
- [196] E. Fukushima, S. B. W. Roeder, *Experimental Pulse NMR: A Nuts and Bolts Approach*, Reading (USA), Addison Wesley 1981
- [197] J. H. Davis, „Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoylphosphatidylcholine”, *Biophys. J.*, **27** (1979), 339-358
- [198] A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, London 1961
- [199] M. Bloom und J. L. Thewalt, „Spectroscopic determination of lipid dynamics in membranes“, *Chem. Phys. Lipids*, **73** (1994), 27-38
- [200] M. Bloom und J. L. Thewalt, „Time and distance scales of membrane domain organization“, *Mol. Membr. Biol.*, **12** (1995), 9-13

- [201] B. Klosgen, C. Reichle, S. Kohlmann und K. d. Kramer, „Dielectric spectroscopy as a sensor of membrane headgroup mobility and hydration“, *Biophys. J.*, **71** (1996), 3251-3260
- [202] C. Morris, *Theory of the General Orientation Dependence of  $^2\text{H}$ -NMR Spin-Lattice Relaxation and Experiments on Model Membranes*, Ph.D. Thesis, University of British Columbia 1993
- [203] T. C. Farrar, E. D. Becker, *Pulse and Fourier Transform NMR – Introduction to Theory and Methods*, Academic Press, New York 1971
- [204] J. L. Doob, „The elementary Gaussian processes“, *Ann. Math. Statistics*, **15** (1944), 229-282
- [205] J. H. Davis, K. R. Jeffrey, M. Bloom, „Spin-lattice relaxation as a function of chain position in perdeuterated potassium palmitate“, *J. Magn. Reson.*, **29** (1978), 191-199
- [206] B. A. Wallace and Robert W. Janes, „Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics“, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5** (2001), 567-571
- [207] A. Roger and B. Nordén, in *Circular and linear Dichroism* by R. G. Compton, S. G. Davies and J. Evans, p. 1, Oxford University Press, Oxford
- [208] A. S. Davydov, *Theory of Molecular Excitons*, McGraw-Hill, New York, 1962
- [209] N. Harada and K. Nakanishi, *Circular Dichroism Spectroscopy: Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1983
- [210] A. Roger and B. Nordén, in *Circular and linear Dichroism* by R. G. Compton, S. G. Davies and J. Evans, p. 1, Oxford University Press, Oxford
- [211] S. Matile, N. Berova, K. Nakanishi, J. Fleischhauer und R. Woody, *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (1996), 5198-5206; S. Matile, N. Berova und K. Nakanishi, *Chem. Biol.*, **3** (1996), 379-392
- [212] F. Engelke, *Aufbau der Moleküle*, 3. Auflage, Teubner Verlag, Stuttgart 1996
- [213] E. B. Nielsen und J. A. Schellman, „The absorption spectra of simple amides and peptides“, *J. Phys. Chem.*, **71** (1967), 2297-2304
- [214] J. A. Schellman, *Accts. Chem. Res.*, **1** (1968), 144-151
- [215] E. U. Condon, W. Altran and H. Eyring, *J. Chem. Phys.*, **5** (1937), 753-775
- [216] L. B. Clark, „Polarization Assignments in the Vacuum UV Spectra of the Primary Amide, Carboxyl, and Peptide Groups“, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995), 7974-7986

- [217] W. Moffit, *J. Chem. Phys.*, **25** (1956), 467-478
- [218] I. Tinoco Jr., R. W. Woody und D. F. Bradley, *J. Chem. Phys.*, **38** (1963), 1317-1325
- [219] R. Mandel und G. Holzwarth, *J. Chem. Phys.*, **57** (1972), 3469-3477
- [220] R. W. Woody und I. Tinoco Jr., *J. Chem. Phys.*, **46** (1967), 4927-4945
- [221] J. A. Schellman und P. Oriel, *J. Chem. Phys.*, **37** (1962), 2114-2124
- [222] C. Chothia, *J. Mol. Biol.*, **75** (1973), 295-302
- [223] N. Greenfield und G. D. Fasman, *Biochemistry*, **8** (1969), 4108-4116
- [224] L. K. Li und A. Spector, *J. Am. Chem. Soc.*, **91** (1969), 220-222
- [225] E. Iizuka und J. T. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **55** (1966), 1175-1182
- [226] R. W. Woody, *Biopolymers*, **8** (1969), 669-683
- [227] S. Brahm, J. Brahm, G. Spach und A. Brack, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74** (1977), 3208-3212
- [228] J. S. Balcerski, E. S. Pysh, G. M. Bonora und C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.*, **98** (1976), 3470-3473
- [229] M. M. Kelly, E. S. Pysh, G. M. Bonora und C. Tonolio, *J. Am. Chem. Soc.*, **99** (1977), 3264-3266
- [230] E. S. Pysh, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **56** (1966), 825-832
- [231] V. Madison und J. A. Schellman, *Biopolymers*, **11** (1972), 1041-1076
- [232] M. C. Manning, M. Illangasekare und R. W. Woody, *Biophys. Chem.*, **31** (1988), 77-86
- [233] C. Toniolo und G. M. Bonora, *Makromol. Chem.*, **176** (1975), 2547-2558
- [234] C. Toniolo, G. M. Bonora und A. Fontana, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **6** (1974), 371-380
- [235] C. M. Wilmot und J. M. Thornton, *Protein Eng.*, **3** (1990), 479-493
- [236] R. W. Woody, in *The Peptides*, Vol. 7 von V. J. Hruby, Academic Press, New York 1985, 15-114
- [237] A. Percel und M. Hollosi, in *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, von G. D. Fasman, Plenum Press, New York 1996, 285-380
- [238] R. W. Woody, „Circular dichroism and conformations of unordered polypeptides“, *Adv. Biophys. Chem.*, **2** (1992), 37-39

- [239] N. Sreerama und R.W. Woody, „A self consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism” *Anal. Biochemistry*, **209** (1993), 32-44
- [240] N. Sreerama, S. Y. Venyaminov und R. W. Woody. “Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Inclusion of denatured proteins with native protein in the analysis”, *Anal. Biochem.*, **287** (2000), 243–251
- [241] <http://lamar.colostate.edu/%7Esreeram/CDPro/index.html>
- [242] W. C. Johnson Jr., „Analyzing Protein CD for Accurate secondary Structures”, *Proteins: Str. Func. Genet.*, **35** (1999), 307-312
- [243] J. P. Hennessey Jr. und W. C. Johnson Jr., „Information Content in the Circular Dichroism of Proteins”, *Biochemistry*, **20** (1981), 1085-1094
- [244] N. Sreerama und R.W. Woody, „Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set”, *Anal. Biochem.*, **282** (2000), 252-260
- [245] N. Sreerama und R.W. Woody, „On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra”, *Protein Science*, **13** (2004), 100-112
- [246] N. Sreerama, S. Yu. Venyaminov und R. W. Woody, „Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy”, *Protein Science*, **8** (1999), 370-380
- [247] J. P. Hennessey und W. C. Johnson, „Information content in the circular dichroism of proteins”, *Biochemistry*, **20** (1981), 1085-1094
- [248] L. A. Compton, W. C. Johnson, „Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication”, *Anal. Biochem.*, **155** (1986), 155-167
- [249] P. Pancoska und T. A. Keiderling, „Systematic comparison of statistical analysis of electronic and vibrational circular dichroism for secondary structure prediction of selected proteins”, *Biochemistry*, **30** (1991), 6885-6895
- [250] J. T. Yang, C. S. C. Wu und H. M. Martinez, „Calculation of protein conformation from circular dichroism”, *Meth. Enzymol.*, **130** (1986), 208-269
- [251] J. P. Hennessey Jr. und W. C. Johnson Jr., *Biochemistry*, **20** (1981), 1085-1094
- [252] P. Manavalan und W. C. Johnson Jr., „Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism”, *Anal. Biochem.*, **167** (1987), 76-85
- [253] N. Sreerama, S. Yu. Venyaminov und R.W. Woody, „Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis”, *Anal. Biochem.*, **287** (2000), 243-251

- [254] B. Dalmas, W. H. Bannister, „Prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra: an attempt to solve the problem of the best-fitting reference protein subsets”, *Anal. Biochem.*, **225** (1995), 39-48
- [255] S. W. Provencher und J. Glöckner, „Estimation of protein secondary structure from circular dichroism” *Biochemistry*, **20** (1981), 33-37
- [256] W. C. Johnson Jr., „Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy”, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **17** (1988), 145-166
- [257] N. J. Greenfield, „Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data”, *Anal. Biochem.*, **235**, (1996) 1-10
- [258] C. L. Lawson und R. J. Hanson, *Solving Least Squares Problems*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs 1974
- [259] S. W. Provencher, „A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations”, *Comput. Phys. Commun.*, **27** (1982), 213-227
- [260] S. W. Provencher, „CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations”, *Comput. Phys. Commun.*, **27** (1982), 229-242
- [261] V. A. Bloomfield, „Quasi-Elastic Light Scattering Applications in Biochemistry and Biology”, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10** (1981), 421-450
- [262] B. H. Zimm, „The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions“, *J. Chem. Phys.* **16** (1948), 1093-1099
- [263] B. H. Zimm, „The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions“, *J. Chem. Phys.* **16** (1948), 1099-1116
- [264] D. S. Poche, P. S. Russo, B. Fong, E. Temeyanko und H. Ricks, „Teaching Light Scattering to Exemplify and Reinforce Basic Principles“, *J. Chem. Educ.*, **76** (1999), 1534-1538
- [265] N. C. Santos und M. A. R. B. Castanho, „Teaching Light Scattering Spectroscopy: The Dimension and Shape of Tobacco Mosaic Virus”, *Biophys. J.*, **71** (1996), 1641-1646
- [266] B. J. Berne und R. Pecora, *Dynamic Light Scattering. With Applications to Chemistry, Biology and Physics*, 2. Auflage, New York, Dover Publications Inc., 2000
- [267] K. Schätzel, „Correlation Techniques in Dynamic Light Scattering”, *Appl. Phys. B*, **42** (1987), 193-213
- [268] F. Perrin, „Mouvement Brownien d'un Ellipsoïde (I). Dispersion Dielectrique pour des Molécules Ellipsoïdales“, *Le Journal de Physique et le Radium*, **10** (1934), p. 497-511

- [269] F. Perrin, „Mouvement Brownien d'un Ellipsoïde (II). Rotation Libre et Dépolarisation des Fluorescences. Translation et Diffusion de Molécules Ellipsoïdales“, *Le Journal de Physique et le Radium*, **1** (1936), p. 1-11
- [270] Ch. R. Cantor und P. R. Schimmel, *BIOPHYSICAL CHEMISTRY Part II: Techniques for the study of biological structure and function*, W. H. Freeman and Company, U.S. 1980, S. 561
- [271] L. Y. Chew, C. Ting, „Microscopic chaos and Gaussian diffusion processes“, *Physica A*, **307** (2002), 275-296
- [272] D. E. Koppel, „Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants“, *J. Chem. Phys.*, **57** (1972), 4814-4820
- [273] K. Mullis, F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.“, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, **51** (1986), 263-273
- [274] M. Okochi, J. Walter, A. Koyama, S. Nakajo, M. Baba, T. Iwatsubo, L. Meijer, P. J. Kahle, C. Haass, „Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein.“, *J. Biol. Chem.*, **275** (2000), 390-397
- [275] P. J. Kahle, M. Neumann, L. Ozmen, V. Müller, S. Odoy, H. Jacobsen, T. Iwatsubo, J. Q. Trojanowski, H. Takahashi, K. Wakabayashi, N. Bogdanovic, P. Riederer, H. A. Kretschmar, C. Haass, „Selective insolubility of  $\alpha$ -synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model“, *Am. J. Pathol.*, **159** (2001), 2215-2225
- [276] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland 1992
- [277] J. H. Davis, K. R. Jeffrey, M. Bloom, M. I. Valic, T. P. Higgs, „Quadrupolar echo deuterium magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains.“, *Chem. Phys. Lett.*, **42** (1976), 390-394
- [278] A. Savitzky und M. J. E. Golay, „Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures“, *Anal. Chem.*, **36** (1964), 1627-1639
- [279] K. Schätzel, „Noise in photon correlation and photon structure functions“, *Optica Acta*, **30** (1983), 155-166
- [280] L. Maroteaux, J. T. Campanelli und R. H. Scheller, „Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal“, *J. Neurosci.*, **8** (1988), 2804-2815
- [281] S. Nakajo, S. Shioda, Y. Nakai und K. Nakaya, „Localization of phosphonuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization“, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **27** (1994), 81-86

- [282] G. S. Withers, J. M. George, G. A. Banker und D. F. Clayton, „Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons”, *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **99** (1997), 87-94
- [283] P. H. Jensen, M. S. Nielsen, R. Jakes, C. G. Dotti und M. Goedert, „Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson’s disease mutation”, *J. Biol. Chem.*, **273** (1998), 26292-26294
- [284] G. Damaschun, H. Damaschun, K. Gast, C. Gernat, D. Zirwer, „Acid denatured apo-cytochrome c is a random coil: evidence from small-angle X-ray scattering and dynamic light scattering“, *Biochim Biophys Acta.*, **1078** (1991), 289-295
- [285] Y. Barenholz, „Sphingomyelin–lecithin balance in membranes; composition, structure and function relationships.”, in: M. Shinitzky, (Ed.), *Physiology of Membrane Fluidity*, Vol. 1., 1984, CRC Press, Boca Raton, FL, 131-173
- [286] R. Cohen, Y. Barenholz, S. Gatt, A. Dagan, „Preparation and characterization of well defined D-erythro sphingomyelins”, *Chem. Phys. Lipids*, **35** (1984), 371-384
- [287] L. K. Bar, Y. Barenholz, T. E. Thompson, „The effect of sphingomyelin composition on the phase structure of phosphatidylcholine–sphingomyelin bilayers”, *Biochemistry*, **36** (1997), 2507-2516
- [288] A. Frank, Y. Barenholz, D. Lichtenberg, T. E. Thompson, „Spontaneous transfer of sphingomyelin between phospholipid bilayers”, *Biochemistry*, **22** (1983), 5647-5651
- [289] C. Huang, J. T. Mason, „Structure and properties of mixed-chain phospholipid assemblies”, *Biochim. Biophys. Acta*, **864** (1986), 423-470
- [290] Y. Barenholz und T. E. Thompson, „Sphingomyelin: biophysical aspects“, *Chem. Phys. Lipids*, **102** (1999), 29-34
- [291] E. Yechiel, Y. Barenholz, „Relationships between membrane lipid composition and biological properties of rat myocytes: Effects of aging and manipulation of lipid composition”, *J. Biol. Chem.*, **260** (1985), 9123-9131
- [292] E. Yechiel, Y. Barenholz, Y. L. Henis, „Lateral mobility and organization of phospholipids and proteins in rat myocyte membrane: Effects of aging and manipulation of lipid composition”, *J. Biol. Chem.*, **260** (1985), 9132-9136
- [293] B. P. Gaber und J. P. Sheridan, „Kinetic and thermodynamic studies of the fusion of small unilamellar phospholipid vesicles”, *Biochim. Biophys. Acta*, **685** (1982), 87-93
- [294] J. Zimmerberg, L. V. Chernomordik, „Membrane fusion”, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **38** (1999), 197-205

- [295] S. L. Leikin, M. M. Kozlov, L. V. Chernomordik, V. S. Markin, Y. A. Chizmadzhev, „Membrane fusion: overcoming of the hydration barrier and local restructuring”, *Theor. Biol.*, **129** (1987), 411-425
- [296] J. Zimmerberg, S. S. Vogel, T. Whalley, I. Plonsky, A. Sokoloff, A. Chanturia, L. V. Chernomordik, „Intermediates in membrane fusion”, *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **60** (1995), 589-599
- [297] M. M. Kozlov, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. S. Markin, Y. A. Chizmadzhev, „Stalk mechanism of vesicle fusion. Intermixing of aqueous contents”, *Eur. Biophys. J.*, **17** (1989), 121-129
- [298] L. V. Chernomordik, M. M. Kozlov, S. L. Leikin, V. S. Markin, Iu. A. Chizmadzhev, „Membrane fusion: local interactions and structural rearrangements”, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **288** (1986)1009-1013
- [299] J. Zimmerberg, S. S. Vogel, L. V. Chernomordik, „Mechanisms of membrane fusion”, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22** (1993), 433-466
- [300] L. V. Chernomordik, M. M. Kozlov, J. Zimmerberg, „Lipids in biological membrane fusion”, *J. Membr. Biol.*, **146** (1995), 1-14
- [301] S. E. Schullery, C. F. Schmidt, P. Felgner, T. W. Tillack, T. E. Thompson, „Fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles”, *Biochemistry*, **19** (1980), 3919-3923
- [302] P. W. van Dijk, B. de Kruijff, P. A. Aarts, A. J. Verkleij und J. de Gier, „Phase transitions in phospholipid model membranes of different curvature”, *Biochim. Biophys. Acta*, **506** (1978), 183-191
- [303] J. Suurkuusk, B. R. Lentz, Y. Barenholz, R. L. Biltonen und T. E. Thompson, „A calorimetric and fluorescent probe study of the gel-liquid crystalline phase transition in small, single-lamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles”, *Biochemistry*, **15** (1976), 1393-1401
- [304] S. McLaughlin, M. Whitaker, „Cations that alter surface potentials of lipid bilayers increase the calcium requirement for exocytosis in sea urchin eggs”, *J. Physiol.*, **396** (1988), 189-204
- [305] A. Lau, A. McLaughlin, S. McLaughlin, „The adsorption of divalent cations to phosphatidylglycerol bilayer membranes”, *Biochim. Biophys. Acta.*, **645** (1981), 279-292
- [306] B. Zhang, Y. H. Koh, R. B. Beckstead, V. Budnik, B. Ganetzky und H. Y. Bellen, „Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis”, *Neuron*, **21** (1998), 1465-1475
- [307] J. C. M. Holthuis, T. Pomorski, R. J. Raggars, H. Sprong und G. van Meer, „The Organizing Potential of Sphingolipids in Intracellular Membrane Transport”, *Physiol. Rev.*, **81** (2001), 1689-1723

- [308] D. M. Michaelson, G. Barkai und Y. Barenholz, „Asymmetry of lipid organization in cholinergic synaptic vesicle membranes”, *Biochem. J.*, **211** (1983), 155-162
- [309] D. Lichtenberg, M. Menashe, S. Donaldson, R. L. Biltonen, „Thermodynamic characterization of the pretransition of unilamellar dipalmitoyl-phosphatidylcholine vesicles”, *Lipids*, **19** (1984), 395-400
- [310] D. E. Cabin, K. Shimazu, D. Murphy, N. B. Cole, W. Gottschalk, K. L. McIlwain, B. Orrison, A. Chen, C. E. Ellis, R. Paylor, B. Lu, und R. L. Nussbaum, „Synucleins Are Developmentally Expressed, and  $\alpha$ -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons”, *J. Neurosci.*, **22** (2002), 8797-8807
- [311] D. D. Murphy, S. M. Rueter, J. Q. Trojanowski, und V. M.-Y. Lee, „Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking  $\alpha$ -Synuclein”, *J. Neurosci.*, **20** (2000), 3214,3220
- [312] J. Lotharius und P. Brundin, „Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and  $\alpha$ -synuclein”, *Nature Reviews Neuroscience*, **3** (2002), 1-11
- [313] S. J. Wood, J. Wypych, S. Steavenson, J.-C. Louis, M. Citron, und A. L. Biere, „ $\alpha$ -Synuclein Fibrillogenesis Is Nucleation-dependent. IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF PARKINSON'S DISEASE”, *J. Biol. Chem.*, **274** (1999), 19509-19512
- [314] H. A. Lashuel, B. M. Petre, J. Wall, M. Simon, R. J. Nowak, T. Walz, P. T. Lansbury, „Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils”, *J. Mol. Biol.*, **322** (2002), 1089-1102
- [315] J.-C. Rochet, K. A. Conway und P. T. Lansbury, „Inhibition of Fibrillization and Accumulation of Prefibrillar Oligomers in Mixtures of Human and Mouse R-Synuclein”, *Biochemistry*, **39** (2000), 10619-10626
- [316] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, G. Musiol, H. Mühlig, *Taschenbuch der Mathematik*, 5. Auflage, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main 2001, S. 924-925
- [317] W. Kauzmann, K. Moore, D. Schultz, „Protein densities from X-ray crystallographic coordinates“, *Nature*, **248** (1974), 447-449
- [318] G. E. Meredith, G. M. Halliday, S. Totterdell, „A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insights into Lewy body formation”, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **10** (2004), 191-202
- [319] E. H. Norris, B. I. Giasson, V. M. Lee, „Alpha-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases”, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **60** (2004), 17-54

- [320] S. Kim, J. H. Seo, Y. H. Suh, „Alpha-synuclein, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease”, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **10** (2004), 9-13
- [321] I. G. McKeith, U. P. Mosimann, „Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease”, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **10** (2004), 15-18
- [322] S. J. Wood, J. Wypych, S. Steavenson, J. C. Louis, M. Citron, A. L. Biere, „alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease”, *J. Biol. Chem.*, **274** (1999), 19509-19512
- [323] K. Levenberg, „A method for the solution of certain problems in least squares”, *Quart. Appl. Math.*, **2** (1944), 164-168,
- [324] D. Marquardt, „An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters”, *SIAM J. Appl. Math.*, **11** (1963), 431-441
- [325] J. M. George, H. Jin, W. S. Woods und D. F. Clayton, „Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch”, *Neuron*, **15** (1995), 361-372
- [326] L. Maroteaux und R. H. Scheller, „The rat brain synucleins: family of proteins transiently associated with neuronal membrane”, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **11** (1991), 335-343
- [327] M. C. Irizarry, T. W. Kim, M. McNamara, R. E. Tanzi, J. M. George, D. F. Clayton et al., „Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system”, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **55** (1996), 889-895
- [328] C. M. Talbott, I. Vorobyov, D. Borchman, K. G. Taylor, D. B. DuPre, M. C. Yappert, „Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin”, *Biochim. Biophys. Acta*, **1467** (2000), 326-337
- [329] n. J. Villalaín, A. Ortiz, J. C. Gómez-Fernández, „Molecular interactions between sphingomyelin and phosphatidylcholine in phospholipid vesicles”, *Biochim. Biophys. Acta*, **941** (1988), 55-62
- [330] E. Jürgens, G. Höhne, und E. Sackmann, „Calorimetric study of the dipalmitoylphosphatidylcholin/water phasediagram”, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **87** (1983), 95-104
- [331] M. Kodama, M. Kuwabara, und S. Seki, „Successive phase-transition phenomena and phase diagram of the phosphatidylcholine-water system as revealed by differential scanning calorimetry” *Biochim. Biophys. Acta.* , **689** (1982), 567-570
- [332] A. K. Engel, D. Cowburn, „The origin of multiple quadrupole couplings in the deuterium NMR spectra of the two chains of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine”, *FEBS Lett.*, **126** (1981), 169-171

- [333] K. S. Bruzik, Conformation of the polar headgroup of sphingomyelin and its analogues. In: *Biochim. Biophys. Acta* 939 (1988), Nr. 2, S. 315-326
- [334] O. P. Lamba, D. Borchman, S. K. Sinha, S. Lal, M. C. Yappert, M. F. Lou, „Structure and molecular conformation of anhydrous and of aqueous sphingomyelin bilayers determined by infrared and Raman spectroscopy”, *J. Mol. Struct.*, 248 (1991), 1-24
- [335] C. F. Schmidt, Y. Barenholz, T. E. Thompson, „A nuclear magnetic resonance study of sphingomyelin in bilayer systems”, *Biochemistry*, **16** (1977), 2649-2656
- [336] D. J. Siminovitch, K. R. Jeffrey, „Orientational order in the choline headgroup of sphingomyelin: A  $^{14}\text{N}$ -NMR study”, *Biochim Biophys Acta*, **645** (1981), 270-278
- [337] M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura, A. Kusumi, „Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study”, *Biophys. J.*, **76** (1999), 1228-1240
- [338] K. A. Karlsson, „Aspects on structure and function of sphingolipids in cell surface membranes. In: Abrahamsson, S. (Hrsg.) ; Pascher, I. (Hrsg.): Structure of Biological Membranes. New York : Plenum Press, 1977, 245-274
- [339] W. Weiss, A. Enders, G. Nimtz, „Connectivity of hydrogen bonds in water between lecithin bilayers”, *Phys. Rev. A*, **33** (1986), 2137-2139
- [340] R. Skarjune, E. Oldfield, „Physical studies of cell surface and cell membrane structure. Deuterium nuclear magnetic resonance investigation of deuterium-labelled N-hexadecanoyl galactosylceramides (cerebrosides)”, *Biochim. Biophys. Acta*, **556** (1979), 208-218
- [341] S. H. Untracht, G. G. Shipley, „Molecular interactions between lecithin and sphingomyelin. Temperature- and composition-dependent phase separation”, *J. Biol. Chem.*, **252** (1977), 4449-4457
- [342] P. Mattjus, J. P. Slotte, „Does cholesterol discriminate between Sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids?”, *Chem. Phys. Lipids*, **81** (1996), 69-80
- [343] P. R. Maulik, G. G. Shipley, „N-palmitoyl sphingomyelin bilayers: structure and interactions with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine”, *Biochemistry*, **35** (1996), 8025-8034
- [344] J. L. Thewalt, M. Bloom, „Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams”, *Biophys. J.*, **63** (1992), 1176-1181
- [345] A. A. Nevzorov, T. P. Trouard, M. F. Brown, „Lipid bilayer dynamics from simultaneous analysis of orientation and frequency dependence of deuterium spin-lattice and quadrupolar order relaxation”, *Phys. Rev. E*, **58** (1998), 2259-2281

- [346] L. Powers, P. S. Pershan, „Monodomain samples of dipalmitoyl phosphatidylcholine with varying concentrations of water and other ingredients”, *Biophys. J.*, **20** (1977), 1371-52
- [347] A. Blume, R. J. Wittebort, S. K. Das Gupta, R. G. Griffin, „Phase equilibria, molecular conformation and dynamics in phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine bilayers”, *Biochemistry*, **21** (1982), 6243-6253
- [348] R. L. Thurmond, *Average and dynamic properties of membrane lipids studied by deuterium NMR spectroscopy*, Ph.D. Thesis, University of Arizona 1992
- [349] M. B. Sankaram, T. E. Thompson, „Deuterium Magnetic Resonance Study of Phase Equilibria and Membrane Thickness in Binary Phospholipid mixed Bilayers”, *Biochemistry*, **31** (1992), 8258-8268
- [350] J. R. Silvius, „Thermotropic phase transitions of pure lipids in model membranes and their modification by membrane proteins”, In *Lipid-Protein Interactions* (P. C. Jost, O. H. Griffith), Bd. 2, 239-281, Wiley, New York 1982
- [351] J. F. Nagle, D. A. Wilkinson, „Lecithin bilayers. Density measurements and molecular interactions”, *Biophys. J.*, **23** (1978), 159-175
- [352] S. C. Costigan, P. J. Booth, R. H. Templer, „Estimations of lipid bilayer geometry in uid lamellar phases”, *Biochim. Biophys. Acta*, **1468** (2000), 41-54
- [353] J. P. Slotte, „Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes”, *Chem. Phys. Lipids*, **102** (1999), 13-27
- [354] R. Bittman, C. R. Kasireddy, P. Mattjus, J. P. Slotte, „Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles”, *Biochemistry*, **33** (1994), 117761-11781
- [355] X.-M. Li, M. M. Momsen, J. M. Smaby, H. L. Brockman, R. E. Brown, „Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of Sphingomyelins”, *Biochemistry*, **40** (2001), 5954-5963
- [356] J. A. DiNatale, R. R. Vold, „The effects of chemical-shift anisotropy on deuterium powder patterns”, *J. Magn. Reson. A*, **117** (1995), 304-306
- [357] F. A. Nezil, M. Bloom, „Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes”, *Biophys. J.*, **61** (1992), 1176-1183
- [358] F. Aussenac, M. Tavares, E. J. Dufourc, „Cholesterol dynamics in membranes of raft composition: a molecular point of view from <sup>2</sup>H and <sup>31</sup>P solid-state NMR”, *Biochemistry*, **42** (2003), 1383-1390
- [359] T. P. McMullen, R. N. McElhaney, „New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry”, *Biochim. Biophys. Acta*, **1234** (1995), 90-98

- [360] T. N. Estep, D. B. Mountcastle, Y. Barenholz, R. L. Biltonen, T. E. Thompson, „Thermal behavior of synthetic sphingomyelin-cholesterol dispersions”, *Biochemistry*, **18** (1979), 2112-2117
- [361] R. A. Demel, J. W. Jansen, P. W. van Dijk, L. L. van Deenen, „The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids”, *Biochim. Biophys. Acta*, **465** (1977), 1-10
- [362] R. Schroeder, E. London, D. Brown, „Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91** (1994), 12130-12134
- [363] S. R. Ferguson-Yankey, D. Borchman, K. G. Taylor, D. B. DuPre, M. C. Yappert, „Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. I. Dihydrosphingomyelin”, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1467** (2000), 307-325
- [364] W. Hübner, A. Blume, „Interactions at the lipid-water interface”, *Chem. Phys. Lipids*, **96** (1998), 99-123
- [365] H. C. Gaede, K. Gawrisch, „Lateral diffusion rates of lipid, water, and a hydrophobic drug in a multilamellar liposome”, *Biophys. J.*, **85** (2003), 1734-1740

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:**

- B. Steinbauer, T. Mehnert, und K. Beyer, „Hydration and Lateral Organization in Phospholipid Bilayers Containing Sphingomyelin: A <sup>2</sup>H-NMR Study”, *Biophys. J.*, **85** (2003), 1013-1024
- B. Nuscher, F. Kamp, T. Mehnert, S. Odoy, C. Haass, P. J. Kahle, K. Beyer, „Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study”, *J. Biol. Chem.*, **279** (2004), 21966-21975

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Stoffwechselbiochem der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von Professor Klaus Beyer. Seinen zahlreichen Anregungen und seinen schier unbegrenzten Literaturkenntnissen verdanke ich es, dass diese Arbeit zügig fertiggestellt werden konnte.

Einen herzlichen Dank auch an alle weiteren Personen, die mir in den letzten 2½ Jahren geholfen haben:

- Herrn Prof. Bausch für seine spontane Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten und mich zu prüfen,
- Frau Brigitte Nuscher für die stets bereitwillige Hilfe und labortechnische Unterstützung bei der Präparation oder Analyse vieler Proben,
- Sabine Odoy für die Bereitstellung ganz Kilos von Protein,
- Volker Kurze für seine spontane Hilfsbereitschaft in verschiedenen Situationen,
- den Leuten in der Werkstatt für ihre tatkräftige Hilfe,
- allen Laboranten hier am Lehrstuhl für ihre freundschaftliche Gesellschaft,
- meinen Eltern und Freunden,
- und insbesondere Krissi für ihren Glauben an mich und ihre Ermutigungen.