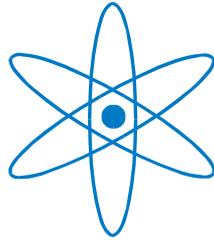


PHYSIK-DEPARTMENT



Zur nanomechanischen Charakterisierung von
oberflächengestützten Biomembranmodellen

Dissertation

von

Frank Wilhelm Samuel Stetter



TECHNISCHE UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Physik-Department
und
Zentralinstitut für Medizintechnik

Zur nanomechanischen Charakterisierung von oberflächengestützten Biomembranmodellen

Frank Wilhelm Samuel Stetter

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Zacharias

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Th. Hugel
2. Priv.-Doz. Dr. B. Nickel,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 18.04.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 17.05.2013 angenommen.

Meinem Großvater, Friedrich Langer (1927 – 2003).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	11
1 Einleitung.....	13
2 Grundlagen und Theorie	17
2.1 Kräfte in wässriger Umgebung.....	17
2.1.1 DLVO-Kräfte	17
2.1.2 Hydratationskräfte.....	20
2.1.3 Hydrophobe Kräfte.....	20
2.2 Biomembranen	21
2.2.1 Fluid-Mosaik-Modell	22
2.2.2 Moderne Vorstellung von Biomembranen.....	23
2.2.3 Membranlipide	24
2.2.4 Bolalipide	27
2.2.5 Lipidphasen	28
2.2.6 Modellmembranen	30
2.2.7 Elastische Eigenschaften von Lipidmembranen	33
2.3 Kraftmikroskopie.....	35
2.3.1 Grundsätzlicher Aufbau	36
2.3.2 Abbildungsmodi.....	36
2.3.3 Kraftspektroskopie	38
2.4 Lebensdauer molekularer Bindungen unter externer Kraft.....	43
2.4.1 <i>Bell</i> -Modell	43
2.4.2 Kraftabhängige Lebensdauer	45
2.4.3 Drei Modelle	46
2.4.4 Freie Aktivierungsenergie.....	51
2.5 Wechselwirkung zwischen Lipidmembranen und Proteinen	51
2.6 Wechselwirkung von kleinen Molekülen mit Lipidmembranen.....	52
2.7 Exkurs: Einzelmolekülmethoden – Wenn jedes Molekül zählt	53
2.8 Die Parkinson'sche Krankheit und Alpha Synuclein	58

3	Material und Methoden	63
3.1	Material.....	63
3.2	Handhabung von Lipiden.....	63
3.2.1	Herstellung von Lipidvesikeln	63
3.2.2	Herstellung von oberflächengestützten Lipiddoppelschichten.....	66
3.3	Kraftmikroskopie	67
3.3.1	Kraft-Abstands-Kurven	68
3.3.2	Funktionalisierung von AFM-Spitzen.....	69
3.3.3	Auswertung von Punktionsexperimenten.....	70
3.3.4	Auswertung von Einzellipidextraktions-Experimenten.....	72
3.4	Elektrophysiologische Messungen	73
3.5	Dynamische Lichtstreuung	73
3.6	Alpha-Synuclein	74
4	Nanomechanische Eigenschaften von Lipidmembranen (PKT)	75
4.1	Wirkung von Ethanol auf Lipidmembranen	75
4.1.1	Ergebnisse.....	76
4.1.2	Diskussion	78
4.2	Bolalipide.....	83
4.2.1	Ergebnisse.....	83
4.2.2	Diskussion	86
4.3	Alpha-Synuclein	89
4.3.1	Ergebnisse.....	89
4.3.2	Diskussion	92
5	Einzellipidextraktion (ELEX)	95
5.1	POPE aus POPC	96
5.2	DSPE aus DOPC.....	99
5.3	Cholesterol aus PSC221.....	100
5.4	Diskussion.....	107
5.4.1	Einige Abschätzungen	107
5.4.2	Phospholipide	108
5.4.3	Cholesterol.....	110

6	Ausblick.....	117
7	Anhang.....	119
7.1	Ergänzende PKT-Experimente.....	119
7.1.1	Ethanol auf PSC221-Membran.....	119
7.1.2	Verschiedene Geschwindigkeiten auf PSC221-Membran.....	120
7.1.3	Punktion von multilamellaren Lipidschichten.....	122
7.2	Berechnung der Aktivierungsenergie der Porenbildung.....	123
	Literaturverzeichnis.....	125
	Danksagung.....	137

Zusammenfassung

Leben, wie wir es kennen, basiert auf biologischen Zellen, die von Biomembranen umhüllt sind. Eine Biomembran besteht aus einer quasi-zweidimensionalen Lipidmembran, in der Membranproteine ihren lebenswichtigen Aufgaben nachgehen. Die mechanischen Eigenschaften von Biomembranen werden dabei immer mehr als wichtige Determinante für die Funktion von Membranproteinen und damit für Zellen insgesamt erkannt. Durch die Bestimmung von elastischen Lipidmembraneigenschaften wurden bereits wertvolle Beiträge zum Verständnis von Biomembranen geleistet. Meist wurden dafür jedoch makro- und mikroskopische Methoden verwendet, die die elastischen Eigenschaften über eine große Fläche hinweg gemittelt bestimmen. Molekularbiologische Vorgänge finden jedoch auf einer sehr viel kleineren Größenordnung, nämlich der der Proteine statt. Aus diesem Grunde ist es interessant und wichtig zu fragen, welche elastische Beschaffenheit Membranen auf dieser Größenordnung aufweisen und ob die makro- und mikroskopisch ermittelten Werte für die elastischen Konstanten auch auf der Nanoebene Bestand haben.

Auch die Stabilität und Verankerung von Lipiden in Lipidmembranen hat zahlreiche Aspekte die von der Lipidsortierung im Golgi-Apparat bis hin zur Verankerung von peripheren Proteinen reichen. Eine Kenntnis der Affinität von bestimmten Lipiden zu unterschiedlichen Umgebungen kann daher zum Verständnis dieser Phänomene beitragen.

Die in dieser Doktorarbeit etablierten und verwendeten Methoden sind die nanomechanische Punktion von Lipidmembranen (PKT) und die Einzellipidextraktion aus Lipidmembranen (ELEX). Gemeinsam ist beiden, dass die mechanischen Eigenschaften auf der Nanoebene – also dort wo die relevanten biologischen Prozesse vor sich gehen – gewonnen werden.

Bei PKT-Messungen wird die Lipidmembran mit einer nanoskopischen Spitze elastisch bis zur Punction eingedrückt. Aus der Analyse der Kraft-Abstands-Kurve können nanomechanische Eigenschaften (Punktionskraft, Membrandicke, Young'scher Modul, Kompressionsmodul und Biegemodul) abgeleitet werden.

So zeigte sich durch die PKT-Messungen – in guter Übereinstimmung mit der Literatur –, dass Ethanol einen starken Einfluss auf die nanomechanischen Eigenschaften hat. Auch Bolalipide, bei denen zwei hydrophile Kopfgruppen durch mindestens eine hydrophobe Kohlenhydratkette miteinander verbunden sind, modulieren die Eigenschaften der Lipidmembran so, dass diese robuster gegen mechanische Deformation wird. In einem dritten System wurde der Effekt des Proteins Alpha-Synuclein auf die Stabilität von anionischen Lipidmembranen untersucht und festgestellt, dass es bei niedrigen Proteinkonzentrationen zu einer Erhöhung der nanomechanischen Stabilität kommt, sich bei größeren Konzentrationen allerdings eine Destabilisierung bis hin zu Auflösung der Membran ergibt.

Bei ELEX-Messungen die Kraft gemessen, die nötig ist, um ein einzelnes Lipidmolekül aus der Membran herauszuziehen (Extraktion). Aus der Kraftladungsratenabhängigkeit dieser Kraft lassen sich dann die thermischen Aktivierungsparameter, wie zum Beispiel die natürliche Lebensdauer des Lipids in der Membran, bestimmen. Zunächst wurde die Verankerungsstärke von Phospholipiden in Phospholipidmembranen untersucht. Die Messwerte stimmten dabei gut mit Literaturwerten aus mikroskopischen Messungen überein. Die Extraktionsmessungen eines Cholesterol-Moleküls aus jeweils der (cholesterol-reichen) L_O - und der (cholesterol-armen) L_D -Phase einer phasenseparierten Membran ergab einen deutlichen Unterschied in den gemessenen Kräften und Lebensdauern zwischen beiden Phasen.

Die Fähigkeit beider Methoden unterschiedliche Lipidphasen auf der Nanoebene zu unterscheiden, eröffnet neue Möglichkeiten zur Charakterisierung von Membran-Mikrodomänen und der Heterogenität in Modell- und Zellmembranen im Allgemeinen.

1 Einleitung

Die Vielfalt des Lebens auf der Erde bringt auch und gerade Naturwissenschaftler immer wieder zum Staunen. Von einzelligen Bakterien und Archaeen über Pflanzen bis hin zum Menschen hat sich seit der Entstehung des Lebens eine ungeheure Ausprägtheit und Komplexität entwickelt. Jeder Organismus besteht aus Zellen deren Anzahl von einer bis zu vielen Billionen reicht und deren Wechselwirkung mit Nachbarzellen und mit der Umwelt dafür sorgt, dass ein Bakterium seiner Nahrung nachjagt, eine Blume sich nach der Sonne ausrichtet und dass ein Mensch eine wissenschaftliche Arbeit verfasst.

Trotz der funktionellen und strukturellen Unterschiede einzelner Zellen, teilen doch alle eine Gemeinsamkeit: Sie werden von Biomembranen begrenzt und damit auch im wörtlichen Sinne durch diese definiert¹.

Sie sorgen für einen geregelten Materialaustausch und sind Ort essentieller biochemischer Prozesse. Zellorganellen, inklusive des Zellkerns, sind von Biomembranen umgeben und können auf diese Weise die für ihre Funktion notwendigen Bedingungen aufrechterhalten. Das Grundgerüst einer Biomembran wird dabei in der Regel von einer Lipidmembran² gebildet. Sie bildet als quasi-zweidimensionale Flüssigkeit eine Matrix für die Einbettung von Proteinen und die Verankerung des Zytoskeletts. Sie ist durchlässig für Wasser und kleine lipophile Moleküle jedoch nicht für Ionen oder größere Moleküle. Sie stellt durch diese passiven Eigenschaften bereits die für das Überleben einer Zelle wichtige selektive Permeabilität her, die durch Membranproteine, wie zum Beispiel Ionenkanälen und poren-bildende Proteine, weiter modifiziert und ergänzt werden kann.

Biomembranen ermöglichen es im Grunde genommen erst, von *einer* Zelle zu sprechen, und die Gesamtfläche, die im menschlichen Körper von Biomembranen eingenommen wird, ist enorm. Geht man davon aus, dass ein erwachsener Mensch aus 100 Billionen Zellen besteht und dass jede dieser Zellen im Durchschnitt einen Radius von 5 μm besitzt, so ergibt sich eine Gesamtfläche von 25000 m^2 (~ 7 Tagwerk) und dies nur als untere Abschätzung, da der größte Teil der Biomembranen sich im Innern von Zellen befindet.

¹ lateinisch *definire* = ab-, begrenzen

² Die Begriffe „Lipidmembran“, „Lipidschicht“ und „Lipiddoppelschicht“ werden nachfolgend synonym benutzt. Falls im Text nicht anders angegeben, ist damit immer eine proteinfreie Lipiddoppelschicht gemeint.

Hinzu kommt, dass jedes Nervensignal, jeder Botenstoff, jeder Nährstoff, jeder Giftstoff und jeder medizinische Wirkstoff entweder durch Biomembranen hindurch muss oder auf Biomembranen selbst einwirkt, um seine Wirkung zu entfalten.

Eine Kenntnis der Vorgänge in und auf Biomembranen ist daher von herausragender Bedeutung für das Verstehen von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen.

Die mechanischen Eigenschaften von Biomembranen sind lange Zeit unterschätzt worden. Erst in den letzten zwanzig bis dreißig Jahren wird allmählich klar, dass Biomembranen mehr sind als bloße zweidimensionale Flüssigkeiten, in denen einzelne Proteine gelöst sind und ihren Aufgaben nachgehen. Heutige Vorstellungen gehen davon aus, dass es eine enge Wechselwirkung zwischen der Funktion von Membranproteinen einerseits und den elastischen Eigenschaften von Lipidmembranen andererseits gibt. Dabei können sowohl Proteine die Elastizität von Lipidmembranen verändern als auch Veränderungen in der Elastizität von Lipidmembranen die Funktion von Proteinen modulieren (1).

Lipidmembranen und die in sie eingebetteten Membranproteine können in diesem Sinne als Funktionseinheit aufgefasst werden.

Diese enge gegenseitige Verknüpfung von Lipidmembranen und Membranproteinen zeigt auf, dass ein vertieftes Verständnis für die Mechanik von Biomembranen nötig ist, um die diversen Funktionsmechanismen von Membranproteinen (sowie deren Modulation, zum Beispiel durch Wirkstoffe) wirklich zu verstehen. Aus diesem Grund wurden auch bereits zahlreiche Studien zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen durchgeführt und hierbei sind fraglos äußerst wichtige Ergebnisse erzielt worden.

Jedoch wurden in den meisten derartigen Untersuchungen die elastischen Eigenschaften über sehr große Flächen ($> \mu\text{m}^2$) gemittelt bestimmt. Die Größenordnung der von Membranproteinen eingenommenen und daher von ihnen „gespürten“ Fläche liegt jedoch im nm^2 -Bereich.

Aus diesem Grunde ist es interessant und wichtig zu fragen, wie sich die Situation „vor Ort“, d. h. auf der Größenordnung der Proteine darstellt. Dazu soll in der vorliegenden Arbeit ein Beitrag geleistet werden.

Zwei Hauptmethoden kamen im Rahmen dieser Dissertation zum Einsatz:

Die *Punktion von Lipidmembranen*. Hierbei wird eine Lipidmembran mit einer Kraftmikroskopienadel (AFM-Spitze) eingedrückt bis es zur Puktion, also zum plötzlichen Durchbruch, kommt. Aus der Analyse der vorhergehenden elastischen Verformung wie auch der Kraft, an der die Lipidschicht schließlich punktiert wird, lassen sich zahlreiche elastische Kenngrößen ableiten. In den in dieser Arbeit beschriebenen Puktionsexperimenten wurden zwei unterschiedliche systembeschreibende „Variablen“ verändert: die Pufferzusammensetzung und die Zusammensetzung der Lipidmembran. In einem dritten Experiment wurde dem Puffer das Protein Alpha-Synuclein zugesetzt und Veränderungen in der Membranstabilität gemessen.

Die zweite Methode ist die *Extraktion einzelner Lipide* aus oberflächengestützten Lipidmembranen. Dabei wird ein einzelnes Lipid chemisch an die AFM-Spitze angekoppelt und anschließend vorsichtig in Kontakt mit einer Lipidmembran gebracht. Wird das Lipid innerhalb der Verweildauer der Spitze auf der Lipidschicht in diese eingebaut, so wird dasselbe Lipid aus dieser wieder herausgezogen – extrahiert –, wenn sich die AFM-Spitze wieder von der Lipidschicht weg bewegt. Die Analyse der dazu notwendigen Kräfte, insbesondere in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit und der Lipidschichtzusammensetzung kann wesentliche Einblicke in die Kohäsion und Stabilität von Lipiden in Lipidmembranen geben. Zunächst wurden Phospholipide an AFM-Spitzen gekoppelt, deren Wechselwirkung mit Lipidmembranen gemessen sowie die Reproduzierbarkeit derartiger Experimente gezeigt. In einem weiteren Experiment wurde dann Cholesterol an die AFM-Spitze angebunden und dessen Wechselwirkung mit einer phasenseparierten Lipidmembran gemessen. Gerade hierbei ist das AFM ein konkurrenzloses Werkzeug da es, im Gegensatz zu anderen auch sehr empfindlichen Kraftmessern zusätzlich die Möglichkeit bietet, eine topographische Abbildung des Messbereichs zu erzeugen.

Im Kapitel „Grundlagen und Theorie“ werden alle zum Verständnis wichtigen biophysikalischen Grundlagen dargelegt und die verwendeten Methoden allgemein beschrieben. Das Kapitel 2.7 geht in einem Exkurs auf Einzelmolekülmethoden ein und motiviert deren Verwendung. Schließlich wird noch kurz das Protein Alpha-Synuclein und seine potentielle Rolle in der Parkinson'schen Krankheit diskutiert.

Kapitel 0 beinhaltet spezielle Methoden und Auswerteverfahren. Die Darstellung von Verfahrensweisen und Protokollen ist dabei so gewählt, dass zunächst in

großer Allgemeinheit beschrieben wird und danach anhand eines konkreten Beispiels detaillierte Protokolle bereitgestellt werden.

Kapitel 4 (Punktion) und 0 (Lipidextraktion) enthalten die Präsentation und Diskussion der erzielten Ergebnisse.

Im Rahmen dieser Dissertation sind auch mehrere Arbeiten von Studenten entstanden. Darunter sind eine Diplomarbeit und eine Bachelorarbeit. Auch wenn auf deren Ergebnisse in Kapitel 4.3 am Rande eingegangen wird, sei auf diese Arbeiten an dieser Stelle explizit verwiesen (2, 3).

2 Grundlagen und Theorie

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit Grundlagen, die für das Verständnis der restlichen Arbeit wichtigen sind. Im Mittelpunkt stehen dabei zum einen verschiedene Aspekte die Biomembranen betreffen und zum anderen die Kraftmikroskopie. Die für diese Dissertation wichtigsten Methoden und Verfahrensweisen sind bereits in diesem Kapitel in sehr allgemeiner Form dargestellt. Sie werden dann zu einem späteren Zeitpunkt in „Material und Methoden“ und den Ergebniskapiteln (Kap. 4 und 5) konkretisiert.

2.1 Kräfte in wässriger Umgebung

Im biologischen Kontext liegt die Ursache aller Kräfte zwischen Oberflächen in der Wechselwirkung von elektrischen Ladungen (4). Formal lassen sich diese Kräfte in unterschiedliche Beiträge aufspalten, die sich zum Beispiel auf Grund ihres Abstandsverhaltens oder ihrer Abhängigkeit von der Elektrolytkonzentration voneinander unterscheiden. Nachfolgend wird auf die wichtigsten dieser Beiträge in wässrigen Lösungen eingegangen.

2.1.1 DLVO-Kräfte

Die Aggregation von gelösten Kolloiden ist ein seit über einhundert Jahren bekanntes Phänomen, welches quantitativ durch die DLVO-Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) erklärt und beschrieben wurde. Die DLVO-Wechselwirkung gelöster Teilchen setzt sich demnach aus zwei Beiträgen zusammen: einer attraktiven Kraft, der van-der-Waals-Kraft, und einer repulsiven Kraft, der elektrostatischen Doppelschicht-Abstoßung (5). Bei niedrigen Salzkonzentrationen überwiegt die elektrostatische Abstoßung und die Partikel bleiben in Lösung. Wird die Salzkonzentration erhöht, so wird der elektrostatische Anteil immer mehr abgeschirmt bis die van-der-Waals-Anziehung schließlich überwiegt und die Partikel anfangen zu koagulieren. DLVO-Kräfte wirken dabei aber nicht nur zwischen einzelnen Teilchen, sondern auch zwischen nano-, mikro- und makroskopischen Objekten. Für die Kraftmikroskopie (siehe Kapitel 2.3) ist hierbei insbesondere die Wechselwirkung einer spitzen Nadel mit einer Oberfläche von Interesse (4). Im Folgenden wird auf die beiden Anteile der DLVO-Kraft genauer eingegangen.

Elektrostatische Abstoßung

Oberflächenladungen werden in Wasser auf Grund seiner relativ hohen Dielektrizitätskonstante ε leicht durch Adsorption von Ionen oder Dissoziation von Oberflächengruppen erzeugt. Diese Ladungen ziehen nun wiederum Gegenionen an, die aus entropischen Gründen jedoch nicht auch auf der Oberfläche adsorbieren, sondern über der Oberfläche eine Gegenionenwolke aufbauen. Diese Anordnung – eine geladene Oberfläche und eine darüber liegende Wolke aus Gegenionen – wird als elektrostatische Doppelschicht bezeichnet (5). Nähert man nun zwei solcher Oberflächen einander an, so überlappen sich die Gegenionenwolken woraus eine abstoßende Kraft resultiert, welche näherungsweise exponentiell abnimmt. Für die Abklingkonstante, die sogenannte Debye-Länge λ_D gilt (für einen 1:1-Elektrolyten):

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon \varepsilon_0 k_B T}{2 c_N e^2}} \quad [1]$$

Hierbei ist $k_B T$ die thermische Energie, e die Elementarladung, ε_0 die elektrische Feldkonstante und c_N die Anzahldichte der Ionen im Medium. Die Berechnung der Abstoßung basiert dabei auf den Theorien von Gouy, Chapman, Debye und Hückel und wird im Rahmen der Kontinuumtheorie unter Anwendung der Poisson-Boltzmann-Gleichung behandelt.

Für den Fall konstanter Ladungsdichten erhält man schließlich für die elektro-statische Abstoßung zwischen einer AFM-Spitze (siehe Kapitel 2.3) und einer Oberfläche in Abhängigkeit des Abstandes z folgende Abstoßungskraft (6):

$$F_{el}(z) = \frac{4\pi \sigma_{Sp} \sigma_{OF} R_{Sp} \lambda_D}{\varepsilon \varepsilon_0} e^{-z/\lambda_D} \quad [2]$$

Die Oberflächenladungsdichten von Spitze und Substrat sind dabei mit σ_{Sp} und σ_{OF} bezeichnet und der Spitzenradius mit R_{Sp} .

In der Herleitung von Formel [2] fließen Annahmen ein: Es muss $R_{Sp} \gg \lambda_D$ und $z \geq \lambda_D$ gelten. Außerdem sollten die Oberflächenpotentiale nicht größer als 50 mV sein (4–6).

Van-der-Waals-Anziehung

Klassisch beruht die *Van-der-Waals (VdW)-Wechselwirkung* w_{VdW} auf Fluktuationen der Elektronendichteverteilung eines Atoms oder Moleküls und kann in drei Komponenten aufgespalten werden, die jeweils mit $1/r^6$ abfallen (5):

$$w_{VdW}(r) = -(C_{Keesom} + C_{Debye} + C_{London}) \frac{1}{r^6} \quad [3]$$

Die Konstanten C_x bezeichnen dabei jeweils die relativen Beiträge der einzelnen Komponenten, nämlich der Keesom-Wechselwirkung zwischen zwei permanenten Dipolen, der Debye-Wechselwirkung zwischen einem Dipol und einem polarisierbaren Molekül und der London-Wechselwirkung zwischen zwei polarisierbaren Molekülen.

VdW-Kräfte sind immer präsent und sind der Grund, warum sich auch ungeladene und unpolare Teilchen anziehen. Sind jedoch andere Kräfte auch noch vorhanden, werden sie meist auf Grund ihrer relativen Schwäche von diesen überdeckt. Besitzen Atome überhaupt kein Dipolmoment, dann trägt allein die London-Wechselwirkung zur VdW-Kraft bei, wie es beispielsweise bei Edelgasatomen der Fall ist.

Für die VdW-Kraft F_{VdW} zwischen einer AFM-Spitze und einer Oberfläche ergibt sich folgender Zusammenhang (6):

$$F_{VdW} = -\frac{A_H R_{Sp}}{6z^2} \quad [4]$$

A_H ist dabei die von den Eigenschaften beider Materialien abhängige Hamakerkonstante³ (5).

DLVO-Kraft

Kombiniert man schließlich Gleichungen [2] und [4] ergibt sich somit insgesamt für die DLVO-Wechselwirkung einer AFM-Spitze mit einer Oberfläche (4, 6, 7):

$$F_{DLVO} = F_{el} + F_{VdW} = \frac{4\pi\sigma_{Sp}\sigma_{OF}R_{Sp}\lambda_D}{\epsilon\epsilon_0} e^{-z/\lambda_D} - \frac{A_H R_{Sp}}{6z^2} \quad [5]$$

³ $A_H = \pi^2 C \rho_{sp} \rho_{OF}$, wobei ρ_{sp} und ρ_{OF} jeweils die Dichten der beiden Objekte beschreiben und C eine Konstante für die Paarwechselwirkung darstellt.

2.1.2 Hydratationskräfte

Bei sehr kleinen Abständen kommt es im wässrigen Medium zwischen hydrophilen Oberflächen zu einer starken Repulsionswechselwirkung U , die eine Reichweite von 1-3 nm aufweist und exponentiell mit dem Abstand z abfällt.

$$U = C e^{-z/\lambda_H} \quad [6]$$

C liegt hier typischerweise zwischen 10^{-3} und 10 J/m^2 und λ_H zwischen 0,2 und 1,4 nm. Die genaue Ursache für die Hydratationsabstoßung ist unklar. Ein wichtiger Beitrag scheint jedoch die Verdrängung von (geordneten (8)) Wasserschichten von der Oberfläche zu sein (5).

2.1.3 Hydrophobe Kräfte

Wasser und Öl mischen sich nicht. Dieses aus dem Alltag wohlbekannte Phänomen hat seine Ursache im sogenannten hydrophoben Effekt.

Wassermoleküle bilden untereinander ein dynamisches, dreidimensionales Tetraeder-Netzwerk aus Wasserstoffbrücken-Bindungen („H-Brücken“). Jedes Wassermolekül ist jeweils zweifacher Protonendonator und –akzeptor.

Werden nun hydrophobe Moleküle (zum Beispiel Methan oder Öl-Moleküle), die nicht zu H-Brücken fähig sind, bei Raumtemperatur in wässrige Umgebung gebracht, kann die Wasserstruktur auf zwei unterschiedliche Arten gestört werden (9):

Kleine hydrophobe Moleküle ($\sim < 0,5 \text{ nm}$) können sich auf Grund ihrer geringen Größe so zwischen den Wassermolekülen einordnen, dass keine H-Brücken gebrochen werden müssen. Allerdings führen die jetzt eingeschränkten Orientierungsmöglichkeiten der umliegenden Wassermoleküle zu einer Verringerung der Entropie.

Wenn *größere hydrophobe Moleküle oder Partikel* gelöst werden, ist es den Wassermolekülen nicht mehr möglich, ein komplettes H-Brücken-Netzwerk aufrecht zu erhalten. Die Wassermoleküle ordnen sich nun so um das Molekül herum an, dass die im Mittel entgangene Anzahl an H-Brücken möglichst gering wird – eine Grenzfläche entsteht. Durch die Reduktion der mittleren Anzahl der H-Brücken dominiert hier die enthalpische Komponente.

In beiden Fällen führt die sich erhöhende freie Energie zu der Tendenz, die Oberfläche zwischen dem wässrigen Medium und den hydrophoben Molekülen zu

verringern – die Moleküle aggregieren. Diese Bestrebung lässt sich phänomenologisch durch eine Kraft beschreiben, die sogenannte hydrophobe Kraft.

Eine etwas andere Situation ergibt sich, wenn Wassertemperaturen knapp unter dem Siedepunkt betrachtet werden. Da H-Brücken bei diesen Temperaturen in wesentlich geringerem Ausmaß zwischen Wassermolekülen gebildet werden, tragen die oben genannten Effekte kaum noch zur freien Energie bei, sodass das Lösen hydrophober Moleküle sogar energetisch günstig werden kann (9, 10).

Biologisch von höchster Bedeutung ist der hydrophobe Effekt als Ursache für die spontane Assemblierung und die Stabilität von Lipidmembranen (11).

2.2 Biomembranen

Biomembranen grenzen die Kompartimente (Organellen, vesikuläre Strukturen) innerhalb einer Zelle und die Zelle selbst nach außen hin ab. In letzterem Falle werden sie dann als Zellmembranen (oder Plasmamembranen) bezeichnet und machen es erst möglich, von *einer* Zelle zu sprechen.

Sie stellen dabei jedoch keine bloßen Trennschichten dar, sondern sind vielmehr hochkomplexe Oberflächen, die in nahezu allen zellulären Prozessen eine zentrale Rolle einnehmen. Beispiele hierfür sind die zelluläre Aufnahme von Nährstoffen durch Endozytose (12), die Signalweiterleitung in Nerven (13) oder die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien (14).

Das Grundgerüst einer jeden Biomembran ist eine Doppelschicht aus amphiphilen Lipidmolekülen (Lipidmembran), die etwa 5 nm dick ist. Sie lässt auf Grund ihres Aufbaus nur bestimmte Moleküle passieren – ist also selektiv permeabel. In sie eingebettet sind Membranproteine, die eine Schlüsselrolle bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen einnehmen und deren Funktion ganz wesentlich auch von ihrer unmittelbaren Lipidumgebung beeinflusst werden kann (1, 15).

Verankert auf der Außenseite von Zellmembranen findet man die sogenannte Glykokalix, die aus langen Kohlenhydratketten besteht und wichtige Aufgaben bei der Zell-Zell-Erkennung und der Immunantwort hat (16). Auf der Innenseite knüpft das für die globale Zellmechanik wichtige Zytoskelett an die Zellmembran an (17).

Abbildung 2.1 veranschaulicht die Allgegenwärtigkeit von Biomembranen in eukaryontischen Zellen und damit ihre Bedeutung für die Zelle.

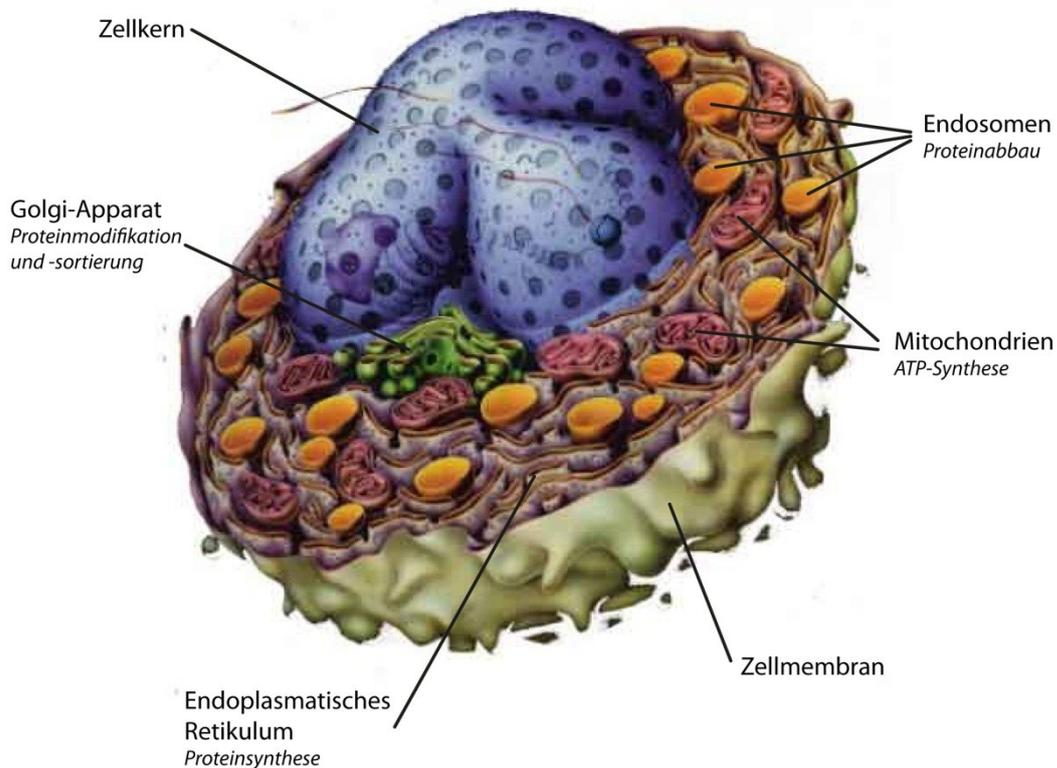


Abbildung 2.1 Aufbau einer eukaryontischen Zelle. Jede der dargestellten Organellen ist von einer Biomembran umgeben. Aus (18).

2.2.1 Fluid-Mosaik-Modell

1972 veröffentlichten Singer und Nicholson ihr Fluid-Mosaik-Modell. Es stellte die Abkehr von der Vorstellung dar, dass Biomembranen im Wesentlichen statische Strukturen sind, in denen wenig bis gar keine laterale Dynamik zu finden ist (19). Grundlage des Modells ist die Idee, dass Biomembranen zweidimensionale viskose Flüssigkeiten darstellen und dass ihre Funktionalität durch integrale Membranproteine gewährleistet wird, die in ihr gleichmäßig gelöst sind und lateral frei diffundieren können (siehe Abb. 2.2 A).

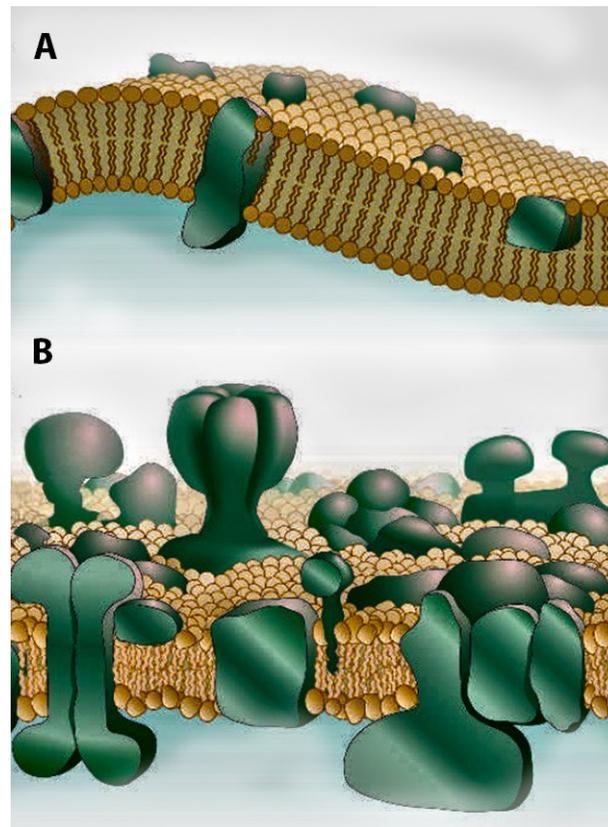


Abbildung 2.2 Modellvorstellungen von Biomembranen. Membranproteine (grün) sind in Lipidmembranen (hellbraun) eingebettet. (A) Fluid-Mosaik-Modell (1972). (B) Moderne Vorstellung von Biomembranen. Aus: (20)

2.2.2 Moderne Vorstellung von Biomembranen

Obwohl obige Vorstellung von der Organisation von Biomembranen als die erste moderne bezeichnet werden könnte, ist sie heute nicht mehr strikt gültig (20, 21): Weiterhin stellen auch in der heutigen Vorstellung Membranproteine, die in die Lipidmatrix eingebettet sind, die funktionale Komponente einer Membran dar. Jedoch geht man nun davon aus, dass auch die mechanischen Eigenschaften der Lipidmembran einen, zumindest mittelbaren, Einfluss auf die Funktionalität von Membranproteinen haben (1).

Nicht mehr aufrechterhalten werden kann die Vorstellung, dass Membranproteine quasi eine verdünnte Lösung innerhalb der Lipidmembran bilden. Vielmehr geht man heutzutage davon aus, dass die Dichte der Membranproteine auf einer Biomembran stark heterogen verteilt ist. Membranproteine lagern sich demgemäß

zu hochfunktionalen Komplexen, sogenannten Mikrodomänen, zusammen (11, 21) (Abb. 2.2 B).

2.2.3 Membranlipide

Die in eukaryontischen Zellmembranen häufigsten Lipide⁴ sind die Glycerophospholipide, die Sphingolipide und das Cholesterol, welches zur Gruppe der Steroide zählt (11).

Die Struktur dieser Membranlipide ist charakterisiert durch einen hydrophilen Teil, der kovalent mit einem hydrophoben verbunden ist. Sie sind somit amphiphil. Die amphiphile Struktur führt dazu, dass sich diese Lipide in wässriger Umgebung – und damit vom hydrophoben Effekt getrieben – spontan zu komplexen Strukturen (zum Beispiel einer Lipiddoppelschicht, Abb. 2.3) zusammenlagern können.

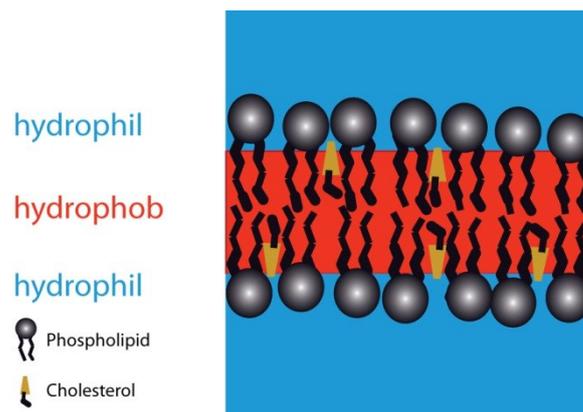


Abbildung 2.3 Auf Grund ihres amphiphilen Aufbaus lagern sich Membranlipide spontan zu Lipiddoppelschichten zusammen. Grund hierfür ist der hydrophobe Effekt, also die Tendenz, die Kontaktfläche zwischen Wasser und den hydrophoben Fettsäureketten möglichst gering zu halten.

Glycerophospholipide zeichnen sich dadurch aus, dass eine hydrophile Kopfgruppe (rechte Seite in Abb. 2.4) über eine Esterbindung mit einem Glycerol-Molekül gekoppelt ist und der hydrophobe Teil (linke Seite in Abb. 2.4) durch zwei, ebenfalls mit dem Glycerol veresterte Fettsäuren gebildet wird.

⁴ Lipide sind eine chemisch nicht einheitlich definierte, heterogene Gruppe von Molekülen, deren Gemeinsamkeit es ist, sich in unpolaren Lösungsmitteln gut, in wässrigen hingegen nur sehr schlecht zu lösen. Zu den Lipiden gehören insbesondere auch die Fette, Wachse und einige Hormone sowie andere Signalmoleküle. Im Rahmen dieser Arbeit werden darunter immer amphiphile Membranlipide verstanden.

Sowohl die Art der Kopfgruppe, wie auch die Länge und die Anzahl der ungesättigten Verbindungen der Fettsäuren haben erheblichen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Lipidmembran (siehe Abb. 2.4). Der grundsätzliche Aufbau eines Glycerophospholipids ist in Abb. 2.4 A dargestellt. Abbildung 2.4 B zeigt an Hand einiger Beispiele wie sich ihre Bezeichnungen herleiten und vermittelt einen Einblick in die Vielfalt der Glycerophospholipide, die durch Kombination von Fettsäureketten und Kopfgruppen erzeugt werden kann.

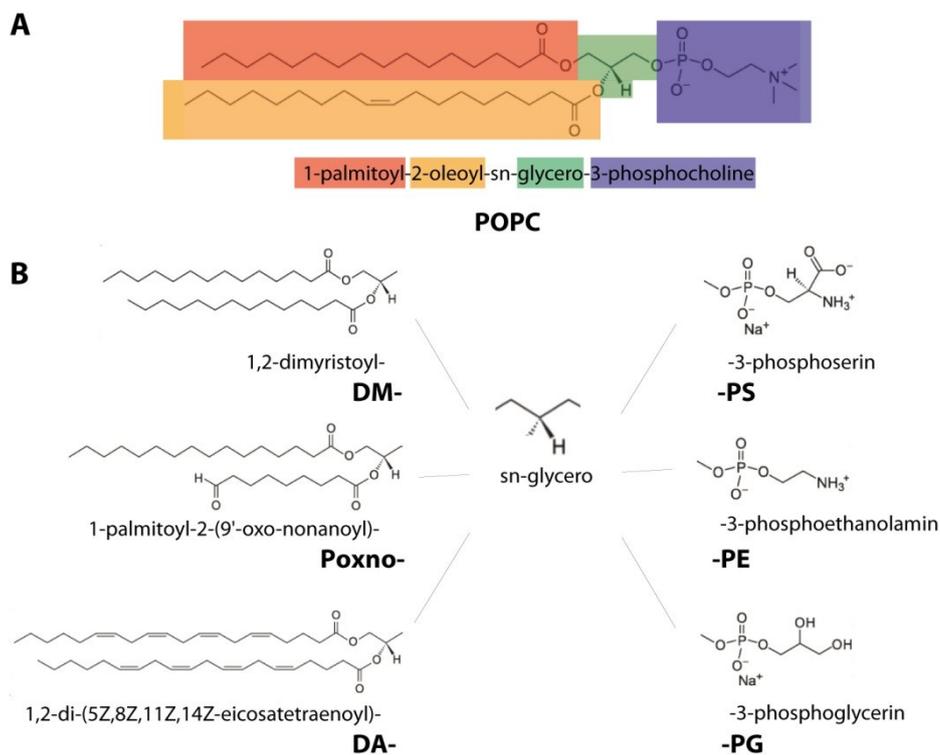


Abbildung 2.4 (A) Phospholipide bestehen aus einem Glycerol-Rückgrat, das zum einen mit einer hydrophilen Kopfgruppe, zum anderen mit zwei hydrophoben Fettsäuren verbunden ist. (B) Exemplarische Darstellung der zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten zur Bildung von Phospholipiden. Die übliche Kurzbezeichnung setzt sich dabei meist aus einer Abkürzung für die Fettsäuren gefolgt von einer Abkürzung für die hydrophile Kopfgruppe zusammen.

Auch *Sphingolipide* sind amphiphil und bestehen meist aus einer Fettsäure, die amidisch an ein Sphingosin gekoppelt ist. Weiterhin befindet sich an der primären Hydroxylgruppe des Sphingosins ein Rest, der die hydrophile Kopfgruppe bildet. Wird diese durch Phosphocholin, gebildet so handelt es sich um ein Sphingomyelin (Abb. 2.5), der in eukaryontischen Zellen am häufigsten auftretende Vertreter dieser Gruppe (16).

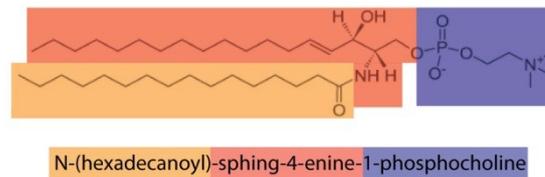


Abbildung 2.5 Sphingomyelin besteht aus einer (meist gesättigten) Fettsäure (C16-C24), die amidisch an ein Sphingosinmolekül gekoppelt ist. Seine hydrophile Kopfgruppe wird von Phosphocholin gebildet.

Cholesterol (Abb. 2.6) kommt in allen Tieren vor und ist als Membranlipid von großer Bedeutung (16, 22). Es gehört der Gruppe Sterole an und wird vom Körper unter anderem benutzt, um die Fluidität von Membranen zu regulieren. Obwohl Cholesterol ein verbreitetes Membranlipid ist, kann es selbst keine lamellaren Lipidphasen (siehe Kapitel 2.2.5) ausbilden.

Das Rückgrat des Cholesterols besteht aus vier fusionierten Ringen an deren einem Ende ein Hydroxylrest die polare Kopfgruppe bildet. Diese ist der wässrigen Phase zugewendet. Am anderen Ende befindet sich eine kurze Kohlenhydratkette, die ins Membraninnere gerichtet ist (vgl. Abb. 2.3).

Cholesterol in Membranen beeinflusst zelluläre Vorgänge durch Wechselwirkung mit Lipiden und mit Proteinen. Auf Grund seines starren Ringsystems befindet es sich bevorzugt in der Nähe von Lipiden mit gesättigten Fettsäureresten, da diese weniger flexibel sind als die von Lipiden mit ungesättigten Fettsäureresten. Dadurch erhöht sich die laterale Ordnung der Lipidmembran und damit auch ihre biophysikalischen Eigenschaften, was sich zum Beispiel in erhöhten elastischen Konstanten oder verringerter Permeabilität äußert (11, 23).

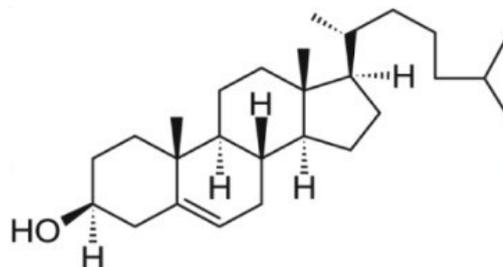


Abbildung 2.6 Die chemische Struktur des Cholesterols ist bestimmt durch ein fusioniertes Ringsystem, das mit einem Hydroxylrest und einer Iso-oktylkette verbunden ist

Neben seiner Rolle als Membranlipid nimmt Cholesterol auch Funktionen als Signalmolekül wahr und ist selbst Ausgangsstoff für die Biosynthese der Steroidhormone (16, 23).

2.2.4 Bolalipide

Bolalipide sind eine Klasse von Lipiden, die sich dadurch auszeichnet, dass jedes Molekül zwei hydrophile Kopfgruppen besitzt, die durch mindestens eine hydrophobe Kohlenhydratkette miteinander verbunden sind. Die Bezeichnung Bolalipid rührt dabei von der Ähnlichkeit zu einer südamerikanischen Jagdwaffe her, die als Bola bezeichnet wird (24).

Synthetisch hergestellte Bolalipide wurden ursprünglich entwickelt, um asymmetrische Membranen herzustellen, und wurden seitdem unter anderem als Beschichtungen für Elektroden oder Nanopartikel verwendet. In der Natur kommen Bolalipide in den Zellmembranen vieler Archaeen vor. Zusätzlich zu ihrer charakteristischen Architektur besitzen die Bolalipide dieser Organismen Etherbindungen anstelle der Esterbindungen herkömmlicher Lipide. Diese beiden Merkmale scheinen verantwortlich dafür zu sein, dass extremophile Archeen widrige Umweltbedingungen, beispielsweise heiße Schwefelsäure in vulkanischer Umgebung oder hohe Drücke, überleben (24, 25).

Gerade für oberflächengestützte Membranen in potentiellen Biosensoren sind stabile Membranen von großer Bedeutung. Bolalipide sind aus diesem Grunde sehr interessant für medizinisch-technische Anwendungen (24).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die nanomechanischen Eigenschaften von oberflächengestützten fluiden Lipidschichten untersucht, denen unterschiedliche Anteile eines speziellen synthetischen Bolalipids (2,2'-di-O-decyl-3,3'-di-O-(eicosanyl)-bis(rac-glycero)1,1'-Diphosphocholin (C₂₀BAS)) beigemischt wurde. C₂₀BAS ist ein Vertreter der sogenannten azyklischen Bolalipide, weil die Kopfgruppen nur durch *eine* Kette (C₂₀) verbunden sind.

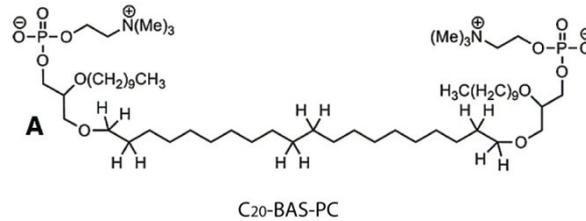


Abbildung 2.7 Chemische Struktur des in dieser Arbeit verwendeten Bolalipids C₂₀BAS (2,2'-di-O-decyl-3,3'-di-O-(eicosanyl)-bis(rac-glycerol)1,1'-Diphosphocholin)

Prinzipiell können sich Bolalipide auf zwei unterschiedliche Weisen in einer Lipidmembran anordnen: Bei der *Trans*-Form, liegen die beiden Kopfgruppen auf unterschiedlichen Seiten der Membran. Bei der *U*-Form, befinden sie sich nebeneinander auf der gleichen Seite der Membran (siehe Abb. 2.8).

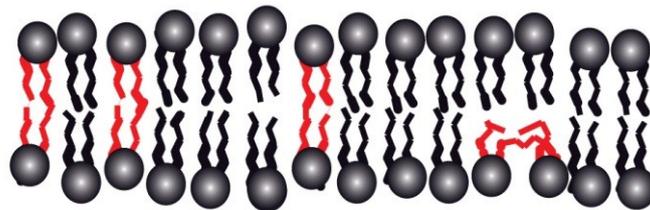


Abbildung 2.8 Mögliche Anordnungen der Bolalipide in einer Lipiddoppelschicht. Bolalipide in *Trans*-Form besitzen auf beiden Seiten der Membran jeweils einen Lipidkopf. In *U*-Form sind hingegen beide Kopfgruppen auf derselben Seite der Membran.

2.2.5 Lipidphasen

Die Tatsache, dass Lipidschichten das Grundgerüst von Biomembranen darstellen, lässt sich leicht daran erkennen, dass Lipide sich auch ohne Proteine spontan zu supramolekularen Strukturen zusammenlagern können.

Je nach Wasser/Lipid-Verhältnis, Temperatur und Lipidgeometrie ordnen sich Lipide zu unterschiedlichen Strukturen zusammen. Bei niedrigem Wassergehalt kann man sie beispielsweise mit Hilfe der Röntgenbeugung in H-, Q- und L-Phase unterscheiden (5, 11):

- In der hexagonalen Phasen (H) bilden Lipide sogenannte röhrenförmige Mizellen, die sich hexagonal zusammenlagern (Abb. 2.9 A).

- Die kubische Phase (Q) zeichnet sich dadurch aus, dass sich stark verwundene Röhren bilden, in denen hydrophile und hydrophobe Bereiche voneinander getrennt sind (Abb. 2.9 B).
- Die lamellare Phase (L), zu der auch Lipidmembranen gehören, sind Anordnungen von parallelen Doppelschichten (Abb. 2.9 C).

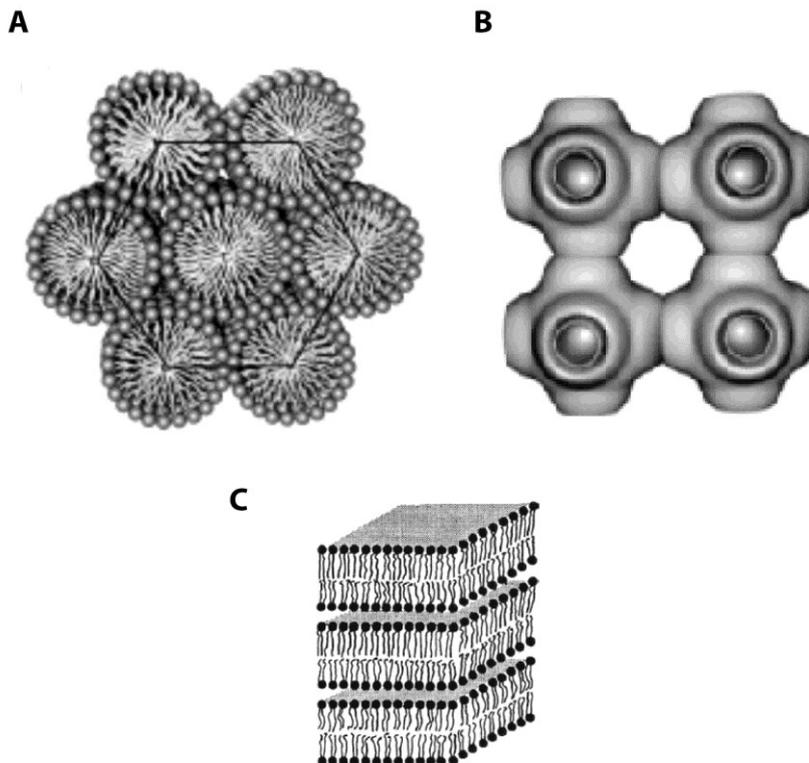


Abbildung 2.9 Lipidphasen. (A) Hexagonale Phase. (B) Kubische Phase. (C) Lamellare Phase.
Aus: (26, 27)

Im Grenzfall eines sehr geringen Wassergehaltes invertieren sich oben genannte Phasen und werden dann als HII-, QII, LII-Phasen bezeichnet.

Im Fall sehr großer Verdünnung bilden sich entweder Mizellen oder geschlossene Schalen mit einer oder mehreren Doppelschichten (lamellare Phase).

Die lamellare Phase kann noch einmal in Unterphasen unterteilt werden. Man unterscheidet zunächst den flüssig-ungeordneten Zustand (L_{α} -Phase) vom festgeordneten Zustand (L_{β} -Phase). Entscheidend dafür, welcher Zustand

eingenommen wird, sind vor allem die Temperatur und die Anzahl der ungesättigten Bindungen in den Fettsäureketten⁵.

Eine Art Zwischenzustand zwischen L_{α} -Phase und L_{β} -Phase stellt der von Cholesterol hervorgerufene, sogenannte flüssig-geordnete Zustand (L_O -Phase, *liquid ordered*) dar. Er zeichnet sich dadurch aus, dass die Lipide weiterhin frei diffundieren können, ihre Fettsäureketten (siehe Kapitel 2.2.3) nun aber einen größeren Ordnungsparameter aufweisen (gestreckter sind). Bei Vorhandensein einer L_O -Phase wird die L_{α} -Phase auch als L_D -Phase (*liquid disordered*) bezeichnet. Die L_{β} -Phase wird manchmal auch als S_O -Phase (*solid ordered*) oder Gelphase bezeichnet (11).

Die treibende Kraft hinter der Bildung dieser Lipidstrukturen ist der hydrophobe Effekt, der hier den Hauptbeitrag zur freien Energie leistet und sich darin manifestiert, dass jedes Lipid bestrebt ist, die Kontaktfläche zwischen seinem hydrophoben Teil und dem umgebenden Wasser möglichst gering zu halten. Die hydrophilen Kopfgruppen bilden dann geschlossene Oberflächen aus (9).

Eine genauere Diskussion des Einflusses der Molekülgeometrie auf das Phasenverhalten und damit die Art der gebildeten Komplexe findet sich in (5). Abbildung 2.9 zeigt einige der wichtigsten Lipidphasen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fokussieren sich auf die L_{α} -Phase.

2.2.6 Modellmembranen

Der Aufbau und die Abläufe in und auf einer Biomembran sind so komplex, dass es sinnvoll erscheint, bestimmte Aspekte ihrer Eigenschaften mit eigens dafür entwickelten Modellsystemen zu untersuchen. Ein sehr einfaches derartiges Modellsystem ist eine Lipidmembran ohne Membranproteine, die nur aus einer oder sehr wenigen Arten von Lipidmolekülen zusammengesetzt ist. An diesem lässt sich zum Beispiel das Phasenverhalten oder die elastischen Eigenschaften der Lipidkomponenten von Biomembranen studieren. Zu den erfolgreichsten Lipidmembran-Modellsystemen zählen künstlich hergestellte Vesikel verschiedener Größe ((28, 29)) (s. Abb. 2.10 A), frei stehende „schwarze Membranen“ für

⁵ Die Temperatur und die Sättigung der Fettsäuren sind auch die entscheidenden Parameter, die den Aggregatzustand eines Fettes festlegen: Bei Raumtemperatur ist ein gesättigtes Fett fest, ein ungesättigtes dagegen flüssig und wird als Öl bezeichnet. Die Parallele zu den Lipidphasen ist jedoch nicht zufällig. Vielmehr kann das Innere einer Lipidschicht als zweidimensionales Öl (oder Fett) aufgefasst werden (siehe unten).

elektrophysiologische Untersuchungen (2, 30) (s. Abb. 2.10 B), Lipidmonolagen in Filmwaagen-Experimenten (31) (s. Abb. 2.10 C) und oberflächengestützte Lipidschichten (32, 33) (s. Abb. 2.10 D).

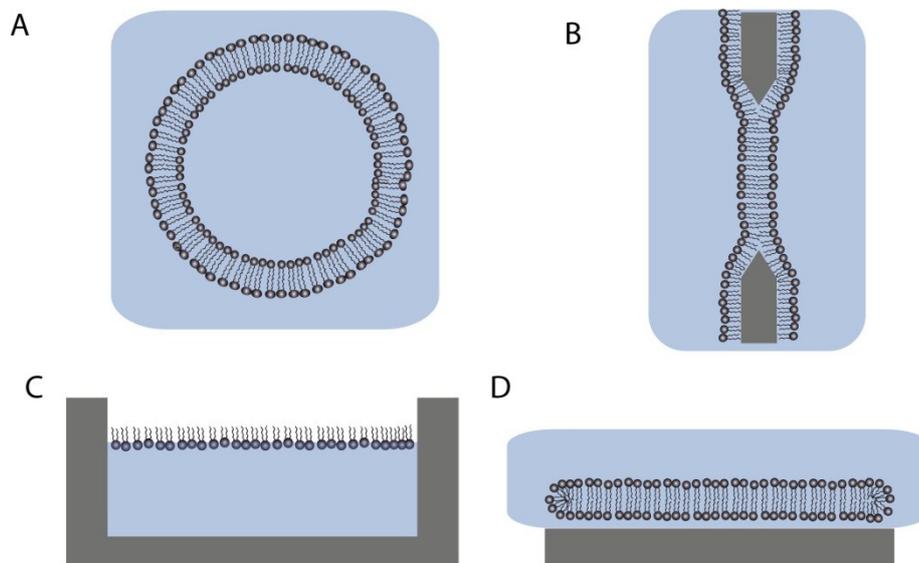


Abbildung 2.10 Die wichtigsten Arten von Modellmembranen. (A) Vesikel, (B) freistehende „schwarze Membranen“, (C) Lipidmonoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche (Filmwaage), (D) oberflächengestützte Lipidmembranen.

Speziell die oberflächengestützten Lipiddoppelschichten bereiteten den Weg für die Untersuchung von Lipidmembranen durch hochauflösende, oberflächensensitive Methoden, wie die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) (34), die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) (35) oder die Kraftmikroskopie (AFM) (34, 36, 37).

Sie werden durch Fusion von einschaligen Lipidschalen mit hydrophilen Oberflächen hergestellt.

Oberflächengestützte Lipidmembranen aus einer ternären Lipidmischung können sowohl L_0 - wie auch L_D -Phasen besitzen und werden oft als einfache Modellsysteme für die Untersuchung von Membran-Mikrodomänen verwendet. Die Phasenseparation in solchen Membranen liegt jedoch im thermodynamischen Gleichgewicht vor und darf aus diesem Grunde nicht als 1:1 Modell für sogenannte *Raft*-Domänen (38, 39) in Zellmembranen verwendet werden. Vielmehr können derartige Modellmembranen hilfreich sein bestimmte Aspekte der Lipid-

Lipid-Wechselwirkung besser zu verstehen und damit auch, wie Heterogenität in Zellmembranen entsteht (40, 41).

Meist bestehen sie aus 1) Cholesterol 2) einem Phospholipid mit hoher Hauptphasenübergangstemperatur T_M (z. B. Sphingomyelin oder DPPC) und 3) einem Phospholipid mit niedriger T_M (z. B. DOPC oder POPC). Die Temperatur und die Mol-Verhältnisse werden dabei so gewählt, dass sich Phasenseparation ergibt. Die L_O -Phase ist dann reich, die L_D -Phase arm an Cholesterol.

Der Ausbildung dieser beiden flüssigen Phasen liegt vermutlich die bevorzugte Wechselwirkung zwischen Cholesterol und Sphingomyelin zu Grunde (42–45), welche wiederum wahrscheinlich hauptsächlich durch die präferierte Wechselwirkung des starren Cholesterol-Ringsystems mit geordneten Fettsäureketten bedingt ist. Umstritten ist jedoch, welche weiteren Beiträge zu dieser Wechselwirkung beitragen (H-Brücken, hydrophober Effekt, van-der-Waals-Kräfte) (43, 46, 47).

Abbildung 2.11 zeigt rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen einer einfachen (2.11 A) und einer ternären Lipidmembran (2.11 B). Abbildungen 2.11 C und D zeigen die zugehörigen dreidimensionalen Darstellungen.

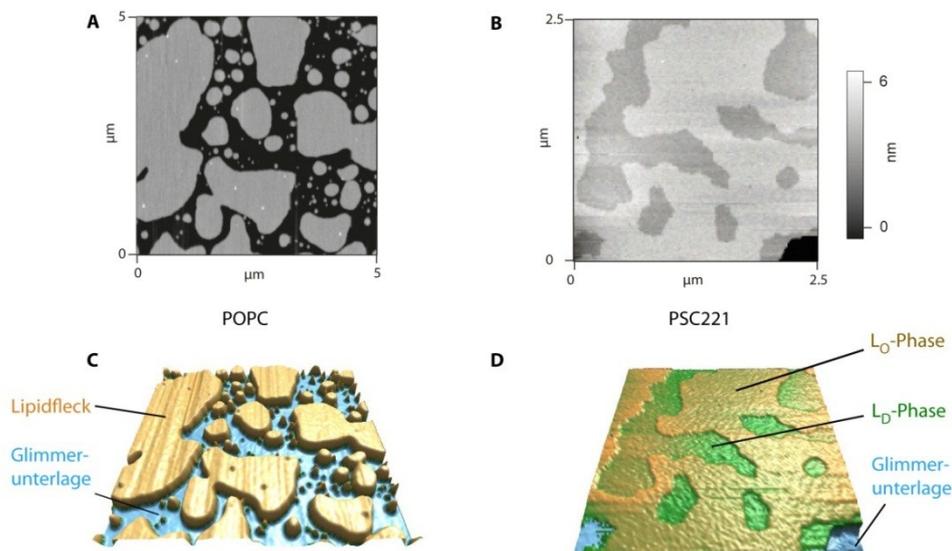


Abbildung 2.11 Neben oberflächengestützten Lipidmembranen aus einer Lipidsorte, werden auch Lipidmembranen aus ternären Lipidmischungen als Modellsysteme eingesetzt.

(A) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einzelner POPC-Lipidmembranflecken. (B) Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer phasenseparierten PSC221-Membran. Die dunklen Bereiche zeigen die etwas dünnere L_D -Phase an, die helleren Bereiche die etwas dickere L_O -Phase. Der ganz dunkle Bereich rechts unten stellt eine nicht von einer Lipidmembran bedeckte Stelle der Glimmerunterlage dar. (C,D) Dreidimensionale Repräsentationen der in A und B dargestellten Abbildungen.

2.2.7 Elastische Eigenschaften von Lipidmembranen

Wie oben erwähnt spielen die mechanischen Eigenschaften von Biomembranen eine zentrale Rolle für die Funktion vieler Proteine. Betrachtet man Lipidschichten in erster Näherung als dünne Platten, so lassen sich ihre Eigenschaften zunächst mit drei Konstanten beschreiben: dem Kompressionsmodul, dem Schermodul und dem Biegemodul. Diese Moduln sind gewissermaßen „Federkonstanten“ für bestimmte Deformationen der Membran.

Tabelle 1 zeigt an unterschiedlichen Lipidmembranen gemessene Werte für Kompressions- und Biegemoduln.

Streckdeformation /Kompression

Ein zunächst spannungsfreies Stück einer Lipidmembran mit Fläche A_0 werde auf die Fläche $A > A_0$ gestreckt. In niedrigster Ordnung kann die damit verbundene Energieänderung folgendermaßen geschrieben werden.

$$G_{dehn} = \frac{1}{2} k_A \frac{(A - A_0)^2}{A_0} \quad [7]$$

k_A ist hierbei der (Flächen-)Kompressionsmodul.

Die zu dieser Dehnung korrespondierende Spannung σ ist per Definition die Ableitung der Energie nach der Fläche:

$$\sigma := \frac{\partial G_{dehn}}{\partial A} = k_A \frac{(A - A_0)}{A_0} =: k_A u \quad [8]$$

Wobei $u = A/A_0 - 1$ die dimensionslose Spannung darstellt. Gleichung [8] stellt ein Hooke'sches Gesetz für isotrope Streckungen der Membran dar, wobei k_A die „Federkonstante“ ist. Der Kompressionsmodul kann experimentell zum Beispiel mit der Mikropipetten-Aspirationstechnik bestimmt werden und liegt für fluide Lipidmembranen in der Größenordnung von 100 mN/m (11).

Biegedeformation

Um einer planaren Lipidmembran eine Krümmung mit den beiden Hauptkrümmungsradien R_1 und R_2 aufzuprägen, muss eine Biegeenergie

$$\Delta G_{bieg} = \frac{1}{2} \kappa_c \iint dO \{R_1^{-1} + R_2^{-1}\}^2 \quad [9]$$

pro Flächeneinheit aufgebracht werden. κ_c ist dabei der Biegemodul. Für fluide Lipidmembranen werden Biegemodule typischerweise im Bereich von $\sim 10^{-19}$ J gemessen (11).

Scherdeformation

Scherdeformationen muss nur dann berücksichtigt werden, wenn sie eine Rückstellkraft erfahren⁶, was in den meisten fluiden Modellmembranen (siehe oben) nicht der Fall ist. Es wird deshalb hier nicht weiter darauf eingegangen und statt dessen auf (11) verwiesen.

Bezug zum Young'schen Modul

Um aber die elastischen Eigenschaften von Lipidmembranen mit anderen biologischen oder künstlichen Materialien vergleichen zu können, ist es hilfreich die oben beschriebenen Module durch den Young'sche Modul Y auszudrücken. Folgende Zusammenhänge aus der Theorie elastischer Schalen (48–50) eignen sich für diesen Zweck:

$$k_A = \frac{Yt}{(1 - \nu^2)} \quad [10]$$

$$\kappa_c = \frac{Yt^3}{24(1 - \nu^2)} \quad [11]$$

Die Dicke der Lipidmembran ist mit t bezeichnet und das Poisson-Verhältnis mit ν (11, 48).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Young'sche Modul verwendet, um aus ihm Kompressions- und Biegemodul abzuleiten.

⁶ etwa durch die Verbindung zu einem Zytoskelett

Tabelle 1 Einige elastische Moduln von Lipidschichten. T : Temperatur in °C. κ_C : Biegemodul in 10^{-19} J. k_A : Kompressionsmodul in mN/m. Werte aus (11).

Lipid	T (°C)	κ_C (10^{-19} J)	k_A (mN/m)
DMPC (PC:C 14:0) (L_α)	30	1,2	145
DMPC (PC:C 14:0) (L_β)	8	12	855
SOPC (PC:C 18:0;C18:1) (L_α)	35	1,5	200
DAPC (PC:C 14:4) (L_α)	20	0,5	60
DMPC/Cholesterol 3:2	20	4,0	685
SPHM/Cholesterol 1:1	15		1720
SOPC/Cholesterol 1:1	15		865

2.3 Kraftmikroskopie

Eine spitze Nadel am Ende einer Blattfeder, ein System zur Detektion der Verbiegung der Blattfeder, Piezo-Stellelemente und ein Regelkreis – viel mehr wird nicht benötigt, um die Topographie von beliebigen Oberflächen durch zeilenweises Abtasten mit der Nadel nanometergenau zu erfassen. Ein solches Gerät wird als (Raster-)Kraftmikroskop oder als AFM⁷, die Methode als (Raster-)Kraftmikroskopie bezeichnet. Sie hat sich seit ihrer Erfindung Mitte der 1980er Jahre zu einer Methode entwickelt mit der die Topographie von Oberflächen untersucht werden kann. Das Einsatz-Spektrum reicht dabei von der Abbildung einzelner Atome bis hin zu lebenden Zellen in physiologischer Salzlösung. Dies macht das Kraftmikroskop zu einem universellen Werkzeug moderner Oberflächenforschung und insbesondere zu einer wichtigen Methode, um oberflächengestützte Lipidmembranen zu untersuchen.

Darüber hinaus kann das AFM als Kraftmesser verwendet werden, indem die Verbiegung der Blattfeder mit Hilfe des Hooke'schen Gesetzes in eine Kraft umgerechnet wird.

Im Folgenden wird zunächst auf den grundsätzlichen Aufbau eines AFMs eingegangen. Danach werden die zwei wichtigsten Modi für die Abbildung von Oberflächen beschrieben, um anschließend die Kraftmessung mit dem AFM, die sogenannte Kraftspektroskopie, darzustellen.

⁷ Engl.: *Atomic Force Microscope*

2.3.1 Grundsätzlicher Aufbau

Die wichtigsten Komponenten eines AFMs sind in Abbildung 2.12 dargestellt. Eine Blattfeder (BF), an deren Ende eine Spitze (S) angebracht ist, kann sich in Abhängigkeit von der auf sie wirkenden Kraft nach oben oder unten verbiegen. Die Verbiegung wird dabei mit Hilfe eines Lasers (L) und einer segmentierten Photodiode (PD) gemessen.⁸ Die zu untersuchende Oberfläche kann durch Piezo-Aktuatoren (PA_{xyz}) in alle drei Raumrichtungen relativ zur Spitze verschoben werden. Für manche Anwendungen ist es nötig, die Blattfeder in Schwingung zu versetzen. Dies wird mittels eines Oszillators (O) erreicht, der sich meist in der Nähe der Basis der Blattfeder befindet. Sämtliche Mess- und Steuersignale laufen in einer rechnergestützten Regelungseinheit zusammen.

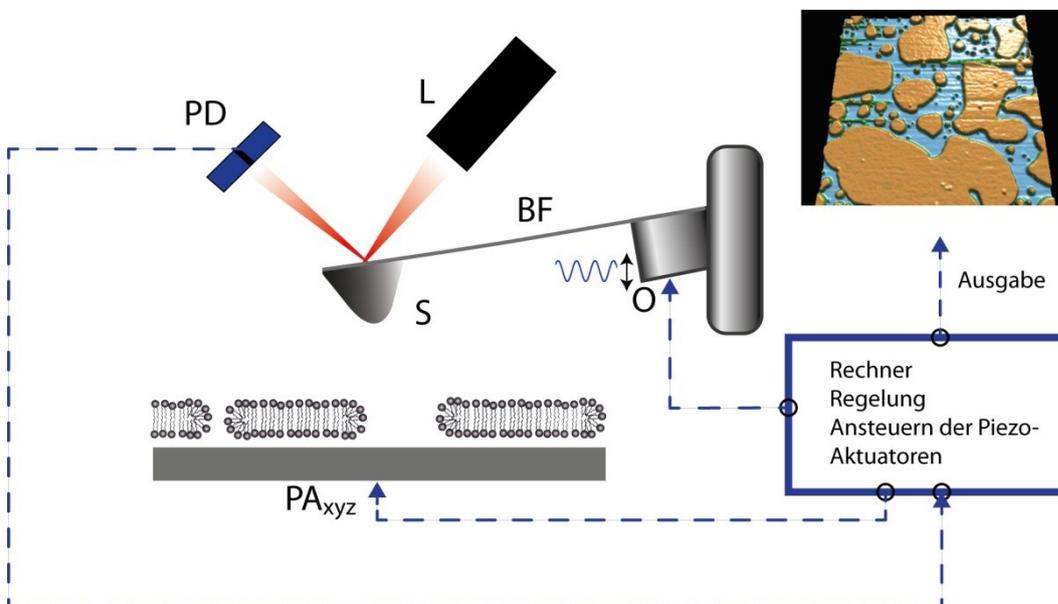


Abbildung 2.12 Grundsätzlicher Aufbau eines (Raster-)Kraftmikroskops. Durch die Wechselwirkung der Spitze mit dem Substrat kommt es zu einer Verbiegung der Blattfeder (BF). Diese Verbiegung wird über ein Lichtzeigersystem bestehend aus einem Laser (L) und einer segmentierten Photodiode (PD) detektiert. Eine mit dem Rechner verbundene Regelungseinheit übernimmt gegebenenfalls die Nachführung der Piezo-Aktuatoren (PA_{xyz}) sowie die Ausgabe der Daten. Im intermittierenden Kontaktmodus wird die Blattfeder zusätzlich durch einen Oszillator (O) zu Schwingungen angeregt.

2.3.2 Abbildungsmodi

Im *Kontaktmodus* wird die AFM-Spitze der zu untersuchenden Oberfläche angenähert, bis sie mit ihr in Kontakt kommt und die Blattfeder dadurch leicht nach oben verbogen wird. Ein Regelkreis hält nun diese Verbiegung und damit

⁸ Eine Kraft auf die Spitze wird also letztlich durch eine Spannungsänderung in der Photodiode detektiert.

die Normalkraft auf die Oberfläche konstant. Um nun eine Abbildung zu erhalten, wird die Spitze mit Hilfe der x- und y-Piezo-Aktuatoren zeilenweise über die Oberfläche gerastert, wobei der Regelkreis weiterhin die Verbiegung der Blattfeder konstant hält. Dies führt dazu, dass die AFM-Spitze dem Verlauf der Oberfläche folgt. Die Steuersignale, die für diese Nachführung nötig sind, werden dann verwendet, um die Oberflächentopographie zu rekonstruieren⁹. Da die Kraft auf die Oberfläche konstant gehalten wird, spricht man bei diesem Modus auch vom *constant force mode*. Durch den dauernden Kontakt mit der Oberfläche kann es jedoch zu Verschleißerscheinungen der Spitze kommen, die meist zu vergrößerten Spitzenradien oder kontaminierten Spitzen führen, was sich in einer schlechter werdenden Abbildungsqualität äußert. Gleichzeitig können zu hohe Normalkräfte auch laterale Kräfte erzeugen, die die Oberfläche verändern oder gar zerstören können. Diese Schwierigkeiten können mit dem sogenannten intermittierenden Kontaktmodus – oft auch als *Tapping*-Modus bezeichnet – weitgehend vermieden werden. Wie die Bezeichnung bereits andeutet, befindet sich die Spitze bei diesem Modus nicht mehr ständig in Kontakt mit der Oberfläche. Dies wird erreicht, indem die Blattfeder zu kleinen Oszillationen nahe ihrer Resonanzfrequenz angeregt wird. Kommt es zu Wechselwirkungen mit der Oberfläche, wird die Resonanzfrequenz verschoben, was eine Änderung der Schwingungsamplitude wie auch der Phase nach sich zieht. Analog zum Kontaktmodus, bei dem die Normalkraft der Blattfeder vom Regelkreis konstant gehalten wird, wird nun die Schwingungsamplitude als Regelgröße verwendet und konstant gehalten. Die dazu notwendigen Veränderungen in der Position des z-Piezo-Aktuators wird auch in diesem Abbildungsmodus dazu verwendet, um die Oberflächentopographie zu rekonstruieren. Der *Tapping*-Modus könnte somit auch als „Modus konstanter Amplitude“ bezeichnet werden.

Abbildung 2.13 zeigt exemplarisch die hochauflösenden Abbildungsfähigkeiten eines Rasterkraftmikroskops im Vergleich mit konventioneller Epifluoreszenzmikroskopie (s. Abb. 2.13).

⁹ Eine Ausnahme stellt der Modus konstanter Höhe (*constant height mode*) dar, da in diesem Betriebsmodus die Kraft nicht geregelt wird. Vielmehr wird in diesem Modus die Verbiegung der Blattfeder an einem Ort direkt zur Bildrekonstruktion verwendet.

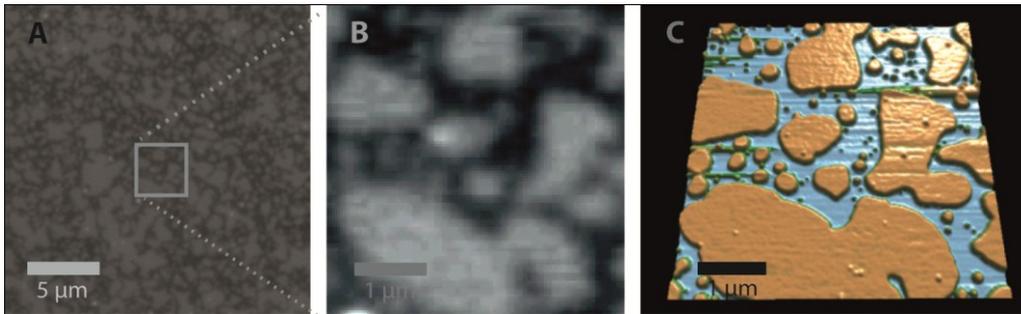


Abbildung 2.13 (A) Fluoreszenzmikroskopische Abbildung einer POPC-Lipidmembran. Die hellen Stellen sind Lipidflecken, die dunkleren Flächen sind Bereiche, auf denen sich keine Lipidschicht gebildet hat. (B) Vergrößerter Ausschnitt des in (A) markierten Quadrats. (C) Dreidimensionale rasterkraftmikroskopische Darstellung des in (A) markierten Quadrats.

2.3.3 Kraftspektroskopie

Die Verbiegung der Blattfeder kann auch dazu genutzt werden, um Kräfte (pN – μ N) zu messen. Oft handelt sich bei derartigen Messungen um Experimente an einzelnen Molekülen (siehe Kapitel 2.7).

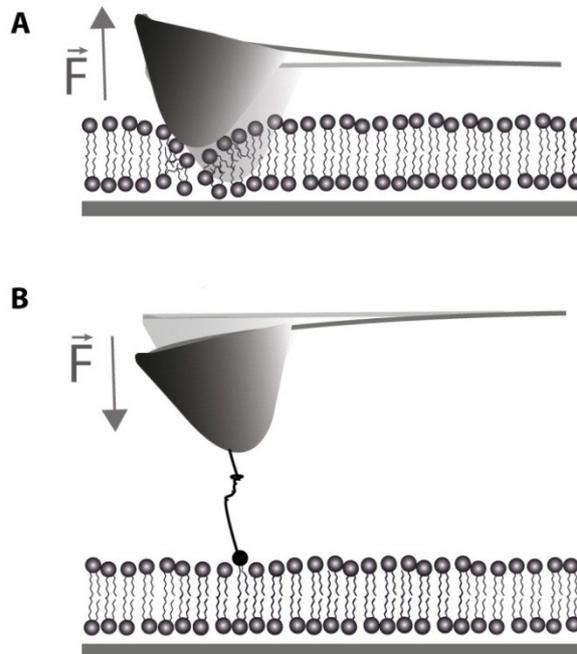


Abbildung 2.14 Die beiden in dieser Arbeit verwendeten kraftspektroskopischen Methoden. (A) Bei der Punktion (PKT) wird die Blattfeder durch den Kontakt mit der Lipidmembran nach oben verbogen. (B) Bei der Lipidextraktion (ELEX) wird sie durch die Kraft, die notwendig ist, um das Lipid aus der Membran herauszuziehen, nach unten verbogen.

So wurden beispielsweise die Kräfte bestimmt, die nötig sind, um eine kovalente Bindung zu brechen (51), den B-S-Übergang in doppelsträngiger DNS herbeizuführen (52) oder die reversible Entfaltung des Muskelproteins Titin zu messen (53).

Werden die Experimente in Abhängigkeit der Kraftladungsrate dF/dt durchgeführt und dargestellt, erhält man ein Kraftspektrum und spricht dann von dynamischer Kraftspektroskopie. Im Folgenden werden die beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kraftspektrometrischen Methoden grundsätzlich beschrieben (Abb. 2.14). Methodische und experimentelle Details folgen dann in den Kapiteln 0, 4 und 0.

Membranpunktion

Durch die Bestimmung von elastischen Lipidmembraneigenschaften wurden bereits wertvolle Beiträge zum Verständnis von Biomembranen geleistet. Meist wurden dafür jedoch makroskopische Methoden verwendet, die die elastischen Eigenschaften über eine große Fläche hinweg gemittelt bestimmen (54). Molekularbiologische Vorgänge finden jedoch auf einer sehr viel kleineren Größenordnung, nämlich der der Proteine, statt.

Aus diesem Grunde ist es interessant und wichtig zu fragen, welche elastische Beschaffenheit Membranen auf dieser Größenordnung aufweisen und ob die makroskopisch ermittelten Werte für die elastischen Konstanten auch auf der Nanoebene Bestand haben. Zu diesem Zweck können AFM-Punktionsmessungen verwendet werden. Die oberflächengestützten Lipidmembranen können dabei grundsätzlich als Flecken ($\varnothing > 100$ nm) (Abb. 3.1 B) oder als geschlossene Schichten vorliegen (Abb. 3.1 C).

Der Ablauf einer einzelnen Messung kann allgemein folgendermaßen beschrieben werden.

Eine AFM-Spitze wird einer Lipidmembran vertikal mit konstanter Geschwindigkeit angenähert (Abb 2.15 A 1→2). Ab einem bestimmten Abstand befindet sich die Spitze nah genug an der Membran, um mit ihr wechselwirken zu können. Dies führt dazu, dass die Membran elastisch komprimiert wird (Abb. 2.15 A 2→3). Im Bereich niedriger Kräfte tragen hierzu vor allem DLVO- und Hydratisierungskräfte bei. Mit zunehmender Kraft wird die Membran dann vor allem durch sterische Wechselwirkungen zwischen ihr und der AFM-Spitze komprimiert und gleichzeitig steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Membran

dem auf sie ausgeübten Druck nachgibt und somit *punktiert* wird (Abb. 2.15 A 3→4).

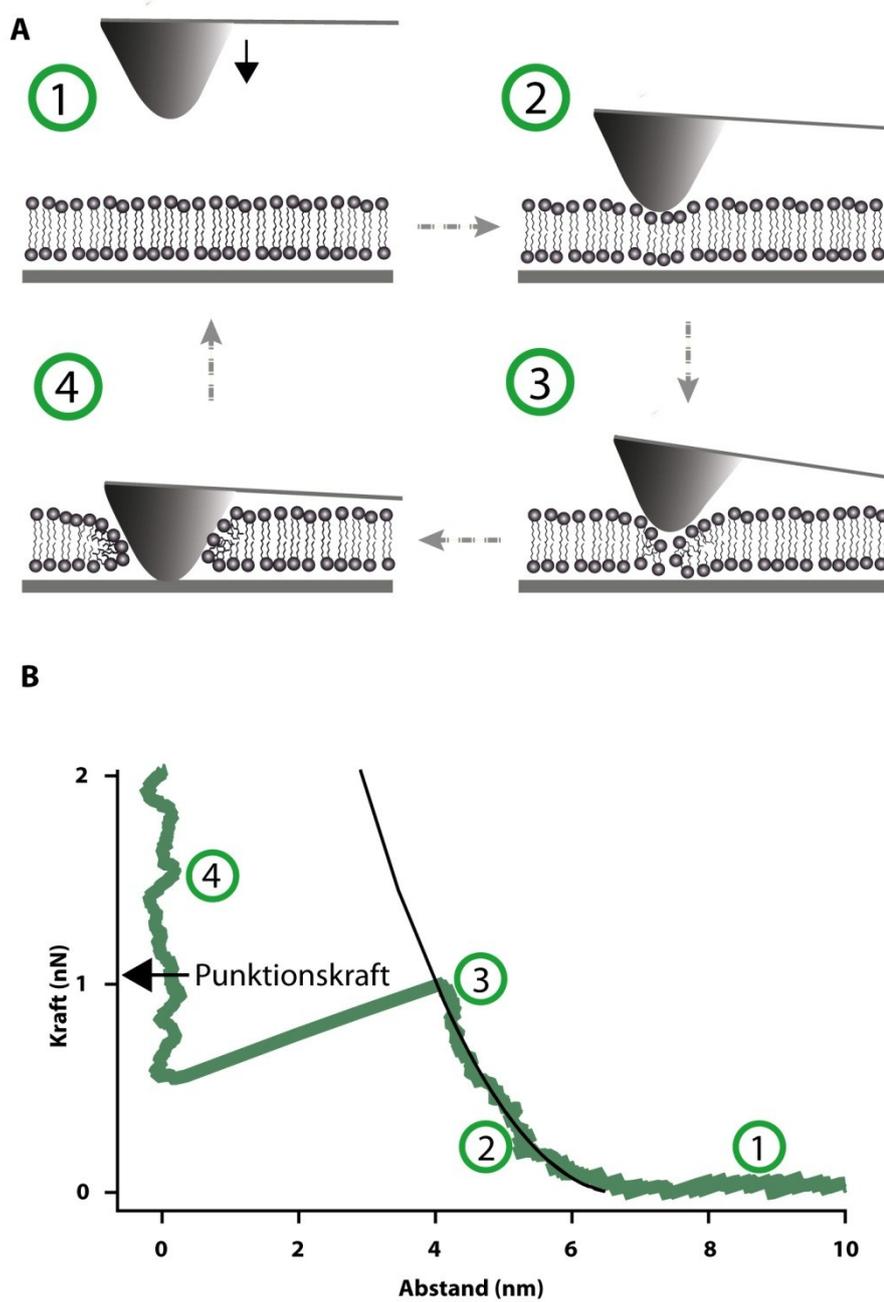


Abbildung 2.15 (A) Schematische Darstellung des Ablaufs einer Punktionsmessung (Beschreibung siehe Haupttext). (B) Die Auftragung der Kraft über dem Abstand zur Oberfläche wird als Punktionskurve bezeichnet. Aus dem Vergleich des elastischen Bereichs mit einem Modell (schwarze Linie) können elastische Konstanten abgeleitet werden.

Die Kraft, bei der die AFM-Spitze die Membran dann schließlich punktiert, wird als Punktionskraft bezeichnet. Anschließend wird die Spitze wieder in ihre Ausgangsposition zurückgefahren und ist bereit für eine neue Punktionskurve (Abb. 2.15 A 4→1). Auf Grund der Fluidität der Lipidmembran schließt sich der punktierte Bereich innerhalb sehr kurzer Zeit wieder von selbst.

Wie aus den Punktionskurven Informationen über die Lipidmembran gewonnen werden wird in Kapitel 0 näher beschrieben.

Mit Hilfe dieser Methode konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Temperatur und die Pufferzusammensetzung wesentliche Faktoren darstellen, die die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen bestimmen (6, 7, 55–57).

Meist sind einfache Lipiddoppelschichten Gegenstand der Untersuchungen. Es können jedoch auch phasenseparierte Membranen (siehe Abb. 7.2) und sogar multilamellare Lipidsysteme (siehe Abb. 7.4) untersucht werden.

Ein weiteres Beispiel ist die Untersuchung des Effekts von Ethanol auf die nanoelastischen Eigenschaften von fluiden Lipidmembranen, der im Rahmen dieser Arbeit durch die Auswertung von Punktionskurven untersucht wurde (siehe dazu Kapitel 4.1 und (58)).

Einzellipidextraktion

Wie bereits dargelegt wurde, ist die Effizienz von Membranproteinen abhängig von der „richtigen“ Umgebung, d. h. unter anderem auch von der Zusammensetzung der Biomembran, in die sie eingebettet sind.

Um unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen aufrecht zu erhalten, ist ein ständiger Transport von und zu biomembran-umhüllten Kompartimenten notwendig (59). Dies kann in Zellen entweder durch den Monomer-Austausch einzelner Lipidmoleküle (59, 60) oder durch vesikulären Transport von staten gehen. Auch beim vesikulären Transport stellt die Desorption einzelner Lipide einen wichtigen Schritt dar, da dadurch vermutlich die Vesikelfusion erst initiiert wird (61).

Die Stabilität der Verankerung eines Lipids und damit seine Neigung zur spontanen oder katalysierten Desorption aus der Lipidmembran stellt also eine wichtige biologische Größe dar, die mit der AFM-Einzellipidextraktion direkt untersucht werden kann.

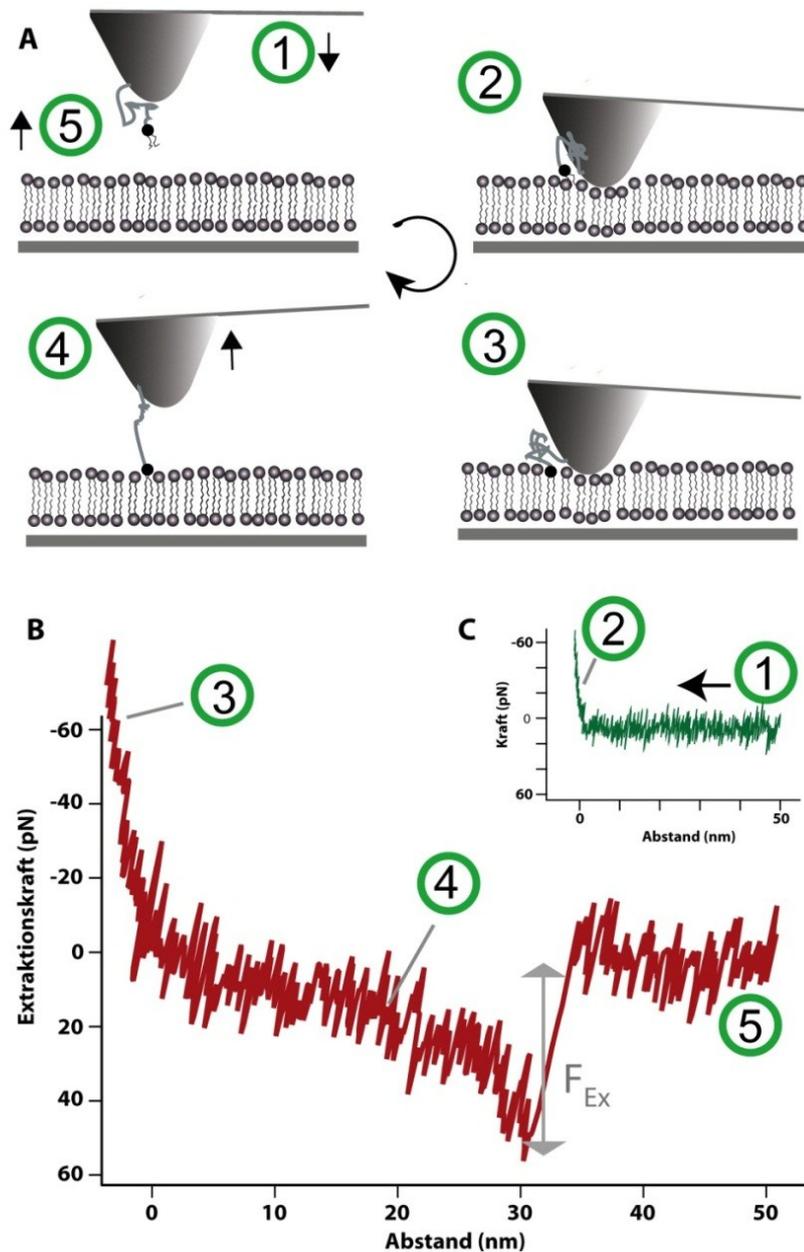


Abbildung 2.16 (A) Schematische Darstellung des Ablaufs einer Einzelliglipidextraktion (A) (Beschreibung siehe Haupttext). (B) Die Auftragung der Kraft über dem Abstand wird als Extraktionskurve bezeichnet. (C) In der Annäherungskurve (Hinfahrkurve) ist keine Wechselwirkung zu erkennen (C).

Der Ablauf eines Extraktionszyklus kann dabei folgendermaßen beschrieben werden. Eine AFM-Spitze, die zuvor chemisch so modifiziert wurde, dass an ihr ein oder wenige Lipide kovalent über ein flexibles Verbindungsmolekül (Linker) gebunden sind, wird einer Lipidmembran vertikal angenähert (Abb. 2.16 A 1→2) und schließlich in Kontakt mit ihr gebracht. Der Kontakt ist dabei definiert über

eine konstant gehaltene Kontaktkraft (die klein genug sein muss, um die Membran *nicht* zu punktieren) und die Kontaktzeit, die typischerweise mehrere Sekunden beträgt (Abb. 2.16 A 2→3). Danach entfernt sich die AFM-Spitze wieder von der Oberfläche (Abb. 2.16 A 3→4) und , wenn sich während der Kontaktzeit das an die Spitze angebundene Lipid in die Lipidmembran eingebaut hat, wird es nun wieder aus der Lipidmembran extrahiert (Abb. 2.16 A 4→5). Die Kraft, die für die Extraktion notwendig ist, wird durch die Verbiegung der Blattfeder gemessen (Abb. 2.16 A 3→4). Die Extraktionskurve endet dort wo sie begonnen hat (Abb. 2.16 A 1, 5). Abbildung 2.16 B und C zeigen die zu den einzelnen Zyklusphasen gehörenden Positionen auf den Kraft-Abstands-Kurven, wobei die Abb. 2.16 C die Kraft während der Annäherung an die Lipidmembran darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird sowohl dieser Zyklus also auch die graphische Auftragung eines Extraktionsereignisses im Kraft-Abstandsdiagramm (Abb. 2.16 B) als Extraktionskurve bezeichnet.

2.4 Lebensdauer molekularer Bindungen unter externer Kraft

2.4.1 Bell-Modell

Aufbauend auf den Überlegungen von Zhurkov (62) hat Bell 1978¹⁰ ein kinetisches Modell für die Lebensdauer τ von molekularen Bindungen in Abhängigkeit einer Kraft F vorgeschlagen (63).

$$\tau_{Bell}(F) = \tau_{Bell}(0)e^{\frac{x_{\beta}F}{k_B T}} \quad [12]$$

bzw.
$$\ln \tau_{Bell}(F) = \ln \tau_{Bell}(0) + \frac{x_{\beta}}{k_B T} F \quad [13]$$

Es handelt sich hierbei um ein einfaches Zwei-Zustands-Modell mit einem dreieckförmigen Energieprofil (siehe Abb. 2.17). $\tau_{Bell}(0)$ stellt hierbei die Lebensdauer der Bindung bei Abwesenheit einer Kraft, x_{β} den Abstand zum Übergangszustand und $k_B T$ die thermische Energie dar. Man sieht, dass jede (näherungsweise) so beschreibbare molekulare Bindung irgendwann – selbst ohne externe Kraft – bricht. Grund hierfür sind allgegenwärtige thermische

¹⁰ Ein wesentlicher Beitrag Bells in diesem Zusammenhang war es, auf die zentrale Bedeutung mechanischer Kräfte in biologischen Systemen hinzuweisen (98).

Schwingungen, die dem System in jedem Moment eine gewisse, ständig fluktuierende, Energie übertragen. Irgendwann reicht die Energie aus, um die Energiebarriere zu überwinden – die Bindung bricht.

Die Zeit bis die Bindung bricht – die Lebensdauer – wird exponentiell verkürzt wenn die Aktivierungsenergie entlang der Reaktionskoordinate reduziert wird. Dies kann beispielweise durch einen Katalysator oder wie im hier betrachteten Fall durch eine extern angelegte Kraft erfolgen. Diese verformt die Energielandschaft und senkt auf diese Weise die Aktivierungsenergie für die Dissoziation nach und nach ab bis thermische Fluktuationen zu einer Überwindung der Aktivierungsenergie führen. Der Bruch der Bindung wird also auch bei einer von außen angelegten Kraft als von den thermischen Fluktuationen verursacht betrachtet. Aus diesem Grund nennt man derartige Vorgänge auch thermisch aktiviert und die Parameter, die diese Aktivierung beschreiben, werden deshalb auch als thermische Aktivierungsparameter bezeichnet. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass das System sich zu jedem Zeitpunkt als adiabatisch beschreiben lässt. Dies bedeutet, dass in jedem Zeitintervall genügend viele thermische Fluktuationen stattfinden müssen. Auf der Zeitskala der kraftspektrometrischen Experimente scheint dies gegeben zu sein (64). Im Grenzfall extrem kurzer Zeitskalen müssen auch dissipative Effekte in Betracht gezogen werden.

Im Kontext der Beschreibung von Lipidextraktionsmessungen mit dem *Bell*-Modell entspricht $\tau_{Bell}(0)$ der mittleren Verweildauer eines Lipids in der Membran. x_β kann in erster Näherung als die Länge des Lipids (entlang der Extraktionsstrecke) aufgefasst werden und sollte deshalb in der Größenordnung von 1 - 2 nm liegen.

Will man $\tau_{Bell}(0)$ und x_β nun aus kraftspektrometrisch gewonnenen Daten erhalten, muss der Tatsache Rechnung getragen werden, dass eine durch eine Feder vermittelte mechanische Kraft niemals instantan angelegt werden kann.

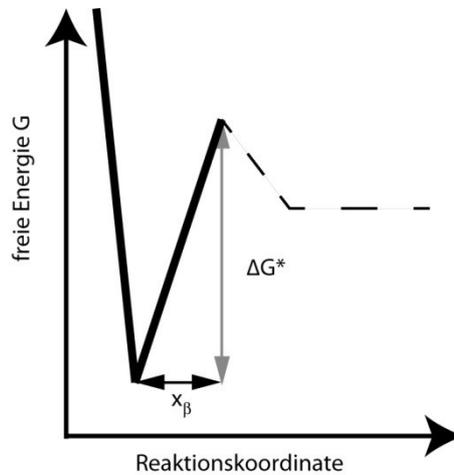


Abbildung 2.17 Schematische Darstellung eines dreieckförmigen Potentials wie es sich aus dem *Bell-Modell* ergibt. x_β bezeichnet den Abstand zum Übergangszustand. E_A ist die Aktivierungsenergie. Die Reaktionskoordinate stellt im Falle der Einzelligidextraktion die Extraktionsrichtung (z-Achse) dar.

Vielmehr wird immer eine gewisse Zeit benötigt, um eine bestimmte Kraft aufzubauen. Die Geschwindigkeit mit der dies geschieht wird als Kraftladungsrate $dF/dt =: \dot{F}$ bezeichnet.

2.4.2 Kraftabhängige Lebensdauer

Durch statistische Analyse der Bindungsbruchereignisse ist es möglich neben der Bindungsstärke weitere Informationen über die Energiebarriere des Übergangs zu erhalten.

Für die Wahrscheinlichkeitsverteilung $\frac{dP(F)}{dF}$ der Abrisskräfte kann folgende Abhängigkeit von der kraftabhängigen Lebensdauer geschrieben werden (64, 65):

$$\frac{dP(F)}{dF} = \frac{\exp(-\int_0^F [\dot{F}(F')\tau(F')]^{-1} dF')}{\dot{F}(F)\tau(F)} =: p(F) \tag{14}$$

Invertierung von Gleichung [14] ergibt dann die kraftabhängige Lebensdauerverteilung.

$$\tau(F) = \int_F^\infty p(f)df / (\dot{F}(F)p(F)) \tag{15}$$

$$\text{mit} \quad \dot{F}(F) = v \left[\frac{1}{k} + \frac{2\beta LL_p(1 + \beta FL_p)}{3 + 5\beta FL_p + 8(\beta FL_p)^{5/2}} \right]^{-1} \quad [16]$$

Wobei L_p und L die Persistenzlänge und Konturlänge gemäß WLC-Modell (s. u.) beschreiben. k bezeichnet die Federkonstante der Blattfeder und $\beta = k_B T$ die thermische Energie.

Im Experiment werden Moleküle oft über flexible Verbindungspolymere, an die AFM-Spitze angebunden. Da diese Polymere stark nichtlineare Federn darstellen, muss darauf geachtet werden, dass für die Kraftladungsrate \dot{F} nicht die nominale sondern die tatsächliche Kraftladungsrate verwendet wird (66, 67).

Die rechte Seite von Gleichung [16] stellt dazu einen näherungsweisen Ausdruck für die kraftabhängige Kraftladungsrate bereit, der sich aus der Annahme eines WLC-Modells für die Streckung ergibt (64). Die Vorgehensweise nach Gleichung [15] wird im Folgenden als Methode A bezeichnet.

Hat man es mit Datensätzen zu tun, die mehrere Ausreißer enthalten oder nicht hinreichend glatt sind (etwa weil sie auf nur wenigen Messungen beruhen), so ist es vorzuziehen, statt Gleichung [15], folgenden Ausdruck für die kraftabhängigen Lebensdauern zu verwenden (64).

$$\tau(\langle F \rangle) \approx \frac{3}{4} \delta F / \dot{F}(\langle F \rangle) \quad [17]$$

Hierbei bezeichnet $\langle F \rangle$ die mittlere Kraft, $\dot{F}(\langle F \rangle)$ die Kraftladungsrate gemäß Gleichung [16] bei dieser Kraft und δF den Interquartilenabstand zwischen 1. und 3. Quartile der Verteilung. Die Bestimmung von $\tau(\langle F \rangle)$ nach Gleichung [17] wird im Folgenden als Methode B bezeichnet.

2.4.3 Drei Modelle

Bei Gleichung [15] und [17] handelt es sich also um die errechneten kraftabhängigen Lebensdauern, die sich aus der gemessenen, diskreten, Kraftverteilung $p(F)$ ergeben. Diese Transformation – vom Krafthistogramm zur diskreten Verteilung der kraftabhängigen Lebensdauern – erfolgt noch ohne Annahme eines $\tau(F)$ -Modells. Erst im Anschluss wird die Verteilung mit einem

Modell für $\tau(F)$ angepasst. Die Parameter eines solchen Modells beschreiben dann die Lebensdauer der molekularen Bindung sowie Details der Energielandschaft. Für die Messungen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden das *Bell*-Modell (Gleichung [12]) und für die Extraktion von Cholesterol noch zusätzlich zwei Modelle verwendet, die folgendermaßen geschrieben werden können (s. Abb. 2.18).

$$\tau(F) = \tau_0 \left(1 - \frac{\nu F x_\beta}{\Delta G^*}\right)^{1-\frac{1}{\nu}} \exp \left[-\beta \Delta G^* \left(1 - \left\{1 - \frac{\nu F x_\beta}{\Delta G^*}\right\}^{\frac{1}{\nu}}\right) \right] \quad [18]$$

Hierbei ist $\beta = 1/k_B T$. Der Faktor ν legt dabei die Art des Potentials fest: Für $\nu = 1/2$ liegt ein harmonisches Potential mit einer scharfen Kante vor. Wird $\nu = 2/3$ gesetzt, so setzt sich das zu Grunde liegende Energieprofil aus linearen und kubischen Termen zusammen. Für $\nu = 1$ ergibt sich daraus wieder das *Bell*-Modell (64).

Im Folgenden werden diese beiden Modelle als *Harm*- und *Kub*-Modell bezeichnet. Zusätzlich zu x_β und τ_0 enthalten diese Modelle noch die freie Aktivierungsenergie ΔG^* als Fit-Parameter.

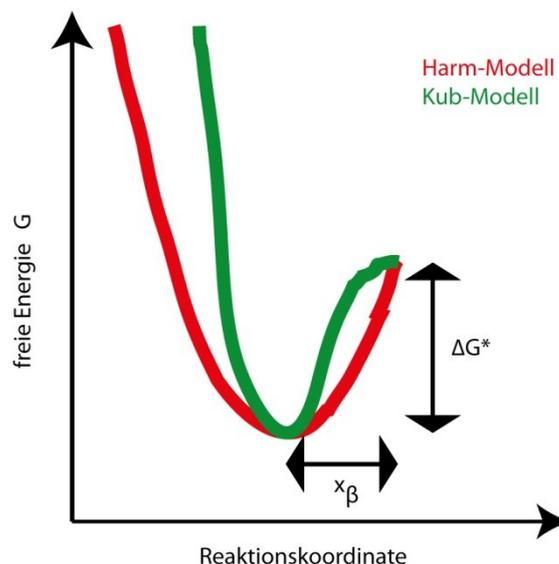


Abbildung 2.18 Schematische Darstellung der den Modellen zu Grunde liegenden Energieprofile. *Harm*-Modell (rot): Ein harmonisches Potential mit einer scharfen Kante. *Kub*-Modell (grün): Zusammengesetzt aus linearen und kubischen Termen.

Gründe für die Verwendung des *Bell*-Modells sind, dass es nur zwei Fit-Parameter benötigt und zunächst davon auszugehen ist, dass auf Grund des dominierenden hydrophoben Effekts die Energielandschaft linear ansteigt. Einen weiteren Grund für seine Verwendung stellt die Tatsache dar, dass in einer der wenigen Publikationen zu Einzellipidextraktionen auch Evans (68) dieses Modell verwendet hat und die Ergebnisse deshalb leichter miteinander zu vergleichen sind.

Der Grund für die Anwendung der *Harm*- und *Kub*-Modelle (Gleichung [18]) liegt darin, dass sich die bei der Extraktion von Cholesterol gefundenen zeitabhängigen Kraftverteilungen nicht als mit einem einfachen *Bell*-Modell beschreibbar erweisen werden (siehe Kapitel 5.3).

Im Folgenden wird meist statt $\tau(F)$ der natürliche Logarithmus der Lebensdauern $\ln\tau(F)$ verwendet. In dieser Auftragung stellt das *Bell*-Modell eine Gerade dar. Abweichungen von einer linearen Verteilung deuten daher auf Abweichungen vom *Bell*-Modell hin.

Abbildungen 2.19 (Methode A) und 2.20 (Methode B) fassen die Vorgehensweisen zur Bestimmung der thermischen Aktivierungsparameter, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, zusammen.

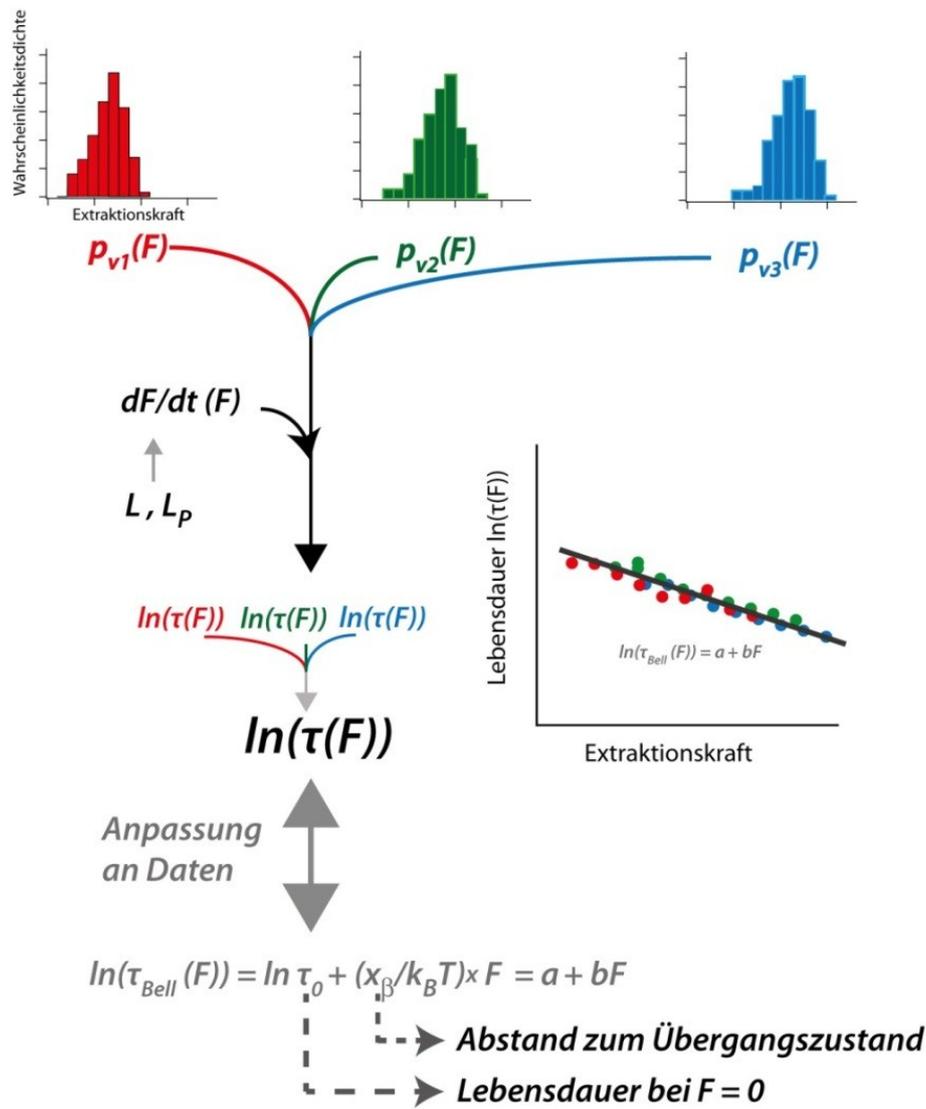


Abbildung 2.19 Bestimmung der thermischen Aktivierungsparameter nach Methode A. Die zu den einzelnen normierten Krafthistogrammen, $p(F)$, korrespondierenden kraftabhängigen Lebensdauer-
 verteilungen, $\tau(F)$, werden in ein einziges $\ln\tau(F)$ -Diagramm eingetragen und dann mit einem Modell,
 zum Beispiel dem *Bell*-Modell, angepasst. L und L_p bezeichnet die Kontur- und Persistenzlänge des
 verwendeten Verbindungspolymers.

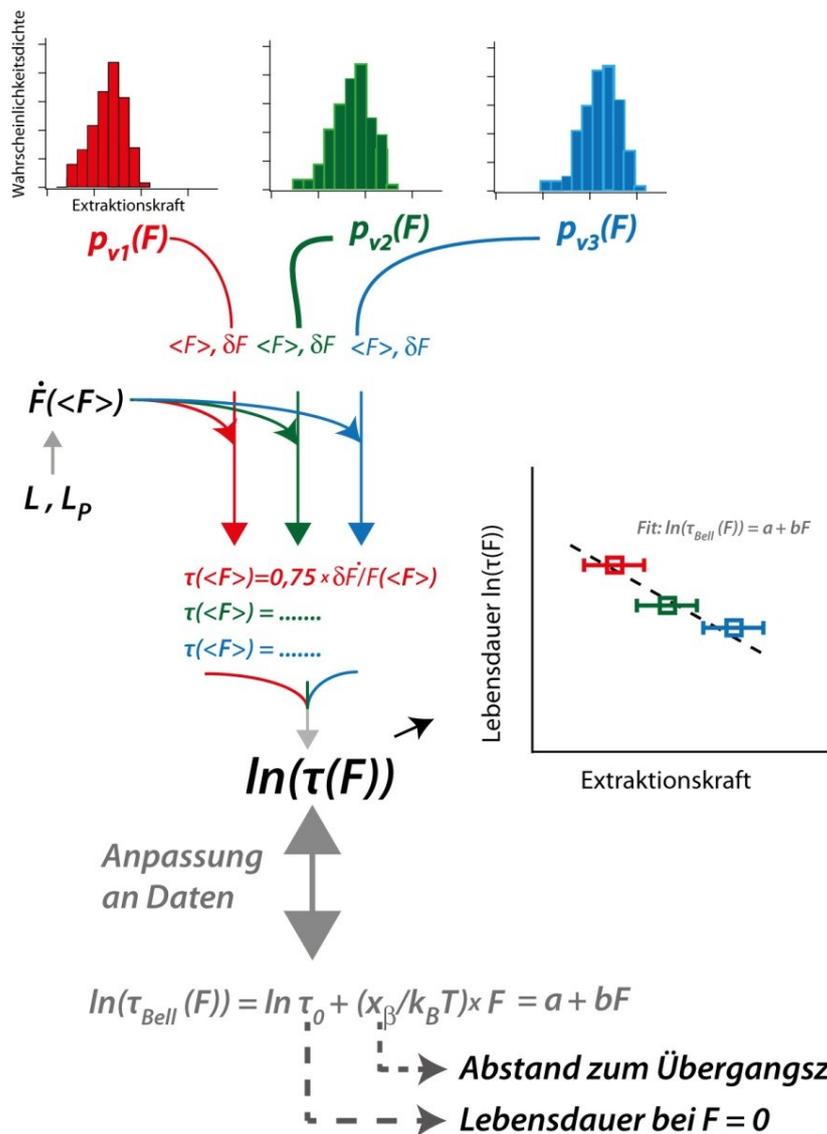


Abbildung 2.20 Bestimmung der thermischen Aktivierungsparameter nach Methode B. Aus jeder Kraftverteilung wird die mittlere Kraft $\langle F \rangle$ und, als Maß für die Breite der Verteilung, der Interquartilenabstand (zwischen erster und dritter Quartile), gewonnen. Zusammen mit der Kraftladungsrate ergibt sich daraus nach Gleichung [17] für jede Kraftverteilung ein Punkt im $\tau(F)$ -Diagramm. Anpassung des Bell-Modells an diese Verteilung führt auf die das Modell beschreibenden Parameter x_β und $\tau_{Bell}(0)$. L und L_p bezeichnen die Kontur- und Persistenzlänge des verwendeten Verbindungspolymers.

Grundsätzlich könnte die Wahrscheinlichkeitsdichte-Verteilung $p(F)$ (Gleichung [14]) auch direkt an die normierten Krafthistogramme angepasst werden. Diese Vorgehensweise wäre äquivalent zu Methode A mit anschließendem Anpassen eines Modells für $\tau(F)$. Das Anpassen eines Modells an eine $\tau(F)$ -Verteilung in die

mehrere Kraftistogramme eingegangen sind (vgl. Kapitel 5.2 und 5.3) entspricht dann dem simultanen Fitten von mehreren Kraftistogrammen.

2.4.4 Freie Aktivierungsenergie

Um auch bei Anwendung des *Bell*-Modells eine Aktivierungsenergie ΔG^* zu erhalten, kann diese folgendermaßen mit Hilfe der Arrheniusgleichung geschätzt werden (69):

$$\Delta G^* = -k_B T \ln(A \cdot \tau(0)) \quad [19]$$

Wobei $\tau(0)$ die kräftefreie Lebensdauer und A den Arrhenius-Vorfaktor bezeichnen. Für Lipide kann $A = 10^7$ (5) angenommen werden.

Für das Verhältnis der Lebensdauern aus zwei verschieden tiefen Potentialen (bei Annahme des gleichen Arrhenius-Vorfaktors) gilt daher:

$$\frac{\tau_{LO}(0)}{\tau_{LD}(0)} = \exp\left(\frac{\Delta G^*_{A,LO} - \Delta G^*_{A,LD}}{k_B T}\right) \quad [20]$$

und somit

$$\Delta \Delta G^* = k_B T \cdot \ln \frac{\tau_{LO}(0)}{\tau_{LD}(0)} \quad [21]$$

für den Unterschied der freien Aktivierungsenergien. Hierbei ist zu bemerken, dass der im Allgemeinen schlecht bestimmte Arrhenius-Vorfaktor A herausgekürzt wird.

2.5 Wechselwirkung zwischen Lipidmembranen und Proteinen

Membranen sind nicht nur der *Ort*, an dem Membranproteine ihre Aufgaben verrichten, sondern sie können auch als *Modulator* der Funktion der Membranproteine dienen (1). In diesem Sinne bilden Membranprotein und die sie umgebende Lipidmembran eine Funktionseinheit. Die Beeinflussung geht dabei in beide Richtungen. So können Proteine die Eigenschaften von Lipidmembranen ändern (70) und andersherum wird die Funktionalität von Proteinen durch Membranen beeinflusst (71).

Ein hervorragendes Beispiel für Modulation von Proteineigenschaften durch den Zustand der Lipidmembran ist der mechanosensitive Kanal *MscL*. Dessen Öffnungswahrscheinlichkeit, oder in anderen Worten sein Leitwert, hängt von der lateralen mechanischen Spannung der Membran ab, in die er eingebettet ist (1).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich einige Moleküle, die die Membranproteinaktivität beeinflussen können, wie zum Beispiel Spinnengifte, eine ganze Reihe von Substraten haben können und möglicherweise nicht nur ein spezielles Protein beeinflussen. Dies legt einen unspezifischen Wirkmechanismus nahe. Man geht in diesem Zusammenhang davon aus, dass die Einlagerung dieser Moleküle die elastischen Eigenschaften der Membran modifizieren kann. Somit ergibt sich ein indirekter Mechanismus, bei dem eine Wirkung auf Membranproteine indirekt erfolgt und durch die Membran vermittelt wird (1, 58).

Es ist zu erwarten, dass sich solche Interaktionen nicht nur auf explizit mechanosensitive Membranproteine beschränken, sondern dass die Funktionalität eines jeden Membranproteins von den elastischen Membraneigenschaften beeinflusst werden kann (1).

Es gibt zahlreiche Methoden und Modellsysteme zur Bestimmung dieser Membraneigenschaften, die sehr wichtige Beiträge zum Verständnis biologischer Membranen geleistet haben. Fast alle dieser Methoden messen diese Eigenschaften jedoch auf einer Skala, die mehrere Größenordnungen über den tatsächlichen Lipidschicht-Membranprotein-Wechselwirkungen liegen. Aus diesem Grunde ist es interessant zu fragen, wie sich die Situation „vor Ort“, d. h. auf der Größenordnung der interessierenden Wechselwirkung darstellt (siehe Kapitel 4 und 0).

2.6 Wechselwirkung von kleinen Molekülen mit Lipidmembranen

Jedoch sind nicht nur Proteine in der Lage, mechanische Lipidmembraneigenschaften zu modulieren, sondern auch kleine Moleküle, wie zum Beispiel Ethanol oder DMSO (58, 72–74).

Dies hat sich die Natur zu Nutze gemacht, um zum Beispiel die Zellmembranen von Pflanzen vor Schädigung durch zu geringe Temperaturen zu schützen indem große Mengen an Trehalose produziert werden, die dann kryoprotektiv wirken. Der zu Grunde liegenden Mechanismen ist noch weitgehend unklar, scheint jedoch damit zu tun zu haben, dass durch wegfallende Wassermoleküle nicht

mehr vorhandene Wasserstoffbrücken auf der Oberfläche der Membranen durch Trehalose ersetzt und die Membran dadurch stabilisiert wird (73, 74).

Auch kleine amphiphile Moleküle könnten eine unspezifische Wirkung auf die Funktion von Membranproteinen haben. Der hypothetische Mechanismus hinter diesem Konzept ist die Einlagerung dieser Moleküle in die Biomembran und eine dadurch bedingte Veränderung der mechanischen Membraneigenschaften. Auf diese Weise könnte sich das laterale Druckprofil in der Membran so ändern, dass dadurch wiederum die Funktionalität von Membranproteinen modifiziert wird (75–77) (s.oben).

Untersuchungen haben gezeigt, dass Ethanolmoleküle sich während der Wechselwirkung mit Lipidmembranen hauptsächlich in der Ebene der Kopfgruppen anreichern und Wasserstoffbrückenbindungen mit den Phosphat- und Carbonylgruppen ausbilden während das hydrophobe Ende des Ethanols sich zu den Fettsäureketten hin orientiert (78, 79). Dies scheint wiederum Einfluss auf die Packungsdichte der Lipide zu haben und damit verantwortlich zu sein für bereits beobachtete ethanolkonzentrations-abhängige Änderungen in Fluidität, Permeabilität und Elastizität von Lipidmembranen (72, 80, 81).

Überraschenderweise gibt es trotz der enormen Anzahl an Untersuchungen, die sich mit der physiologischen und biochemischen Wirkung von Ethanol auseinandersetzen, nur sehr wenige Veröffentlichungen den Einfluss von Ethanol auf die Mechanik von Lipidmembranen quantitativ erfassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung kleiner amphiphiler Moleküle auf die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen anhand des Ethanols untersucht (58).

2.7 Exkurs: Einzelmolekülmethoden – Wenn jedes Molekül zählt

Der folgende Abschnitt orientiert sich an einem im Rahmen dieser Dissertation erschienenen Veröffentlichung (82).

Als Sakman und Neher 1976 ihre Strommessungen an einzelnen Proteinen (Ionenkanälen) veröffentlichten, war dies der Beginn einer neuen Art und Weise, die Funktion und Mechanik von Molekülen zu erforschen. Ihnen gelang es, mithilfe der *Patch-Clamp*-Technik Ströme durch einzelne Ionenkanäle zu messen. Damit konnten sie nicht nur unterscheiden, ob sich ein einzelnes Kanalprotein in einem offenen oder geschlossenen Zustand befindet, sondern auch die Dynamik und damit die Lebensdauer der Zustände direkt bestimmen (83). Seither hat sich

das Repertoire an Einzelmolekülmethoden stark vergrößert, wobei insbesondere in den letzten zehn Jahren die Kraft- und Fluoreszenzmessungen wertvolle Beiträge zum Verständnis molekularer Prozesse geleistet haben. Diese Methoden sind zum Beispiel in (84) ausführlich beschrieben.

Im Folgenden soll mit zwei Analogien vermittelt werden, was der wesentliche Vorteil der Einzelmolekülmethode im Vergleich zu den bisher standardmäßig eingesetzten Ensemble-Methoden ist.

Angenommen in Deutschland, Österreich und der Schweiz lebten jeweils zweitausend Alpenschneehühner; in Marokko, Tunesien und Ägypten dagegen keine. Man könnte nun mit Recht behaupten, dass es in den betrachteten Ländern durchschnittlich eintausend Alpenschneehühner gibt. Letztere Aussage hat aber kaum praktischen Wert, da bei einer Mittelwertbildung implizit von einer monomodalen Verteilung ausgegangen wird, die Verteilung in obigem Beispiel jedoch bimodal ist, also zwei Population enthält (Länder mit zweitausend Alpenschneehühner und Länder ohne Alpenschneehühner). Bei Ensemble-Messungen erhält man aber gerade oft nur den Mittelwert und geht somit zunächst auch hier von einer monomodalen Verteilung aus. Da bei Einzelmolekülmessungen im Wesentlichen keine Mittelung stattfindet (bei genügend hoher Auflösung), können damit auch Zustände eindeutig identifiziert werden, die selten sind oder weit vom Mittelwert entfernt liegen (Abb. 2.21 A). Durch geschickte Ensemble-Messungen an Sub-Populationen (in unserem Exempel beispielsweise die Zählungen in jeweils drei Ländern) oder Modellannahmen können mehrmodale Verteilungen mittlerweile aber auch gut erfasst werden.

Entscheidende Vorteile der Einzelmolekülmethoden gibt es jedoch bei der Betrachtung von Zustandsänderungen:

Würde das Licht aller Ampeln einer großen Stadt gleichzeitig beobachtet werden, so könnte festgestellt werden, dass beispielsweise 55 % der Gesamtintensität von rotem, 10 % von gelbem und 35 % von grünem Licht herrühren (Abb. 2.21 B). Da sehr viele Ampeln gleichzeitig gemessen werden, bleibt diese Verteilung konstant. In einer solchen Ensemble-Messung ist es fast unmöglich zu unterscheiden, was der Grund für diese Verteilung ist. Es könnten einerseits 55 % der Ampeln ständig rot, 10 % gelb und 35 % grün sein. Dies würde man als Statische Heterogenität (*static disorder, static heterogeneity*) bezeichnen. Andererseits könnten aber die Ampelphasen auch ständig wechseln, so dass jede Ampel im Schnitt

55 % rot, 10 % gelb und 35 % grün ist. Dies würde man als Dynamische Heterogenität (*dynamic disorder*, *dynamic heterogeneity*) bezeichnen.

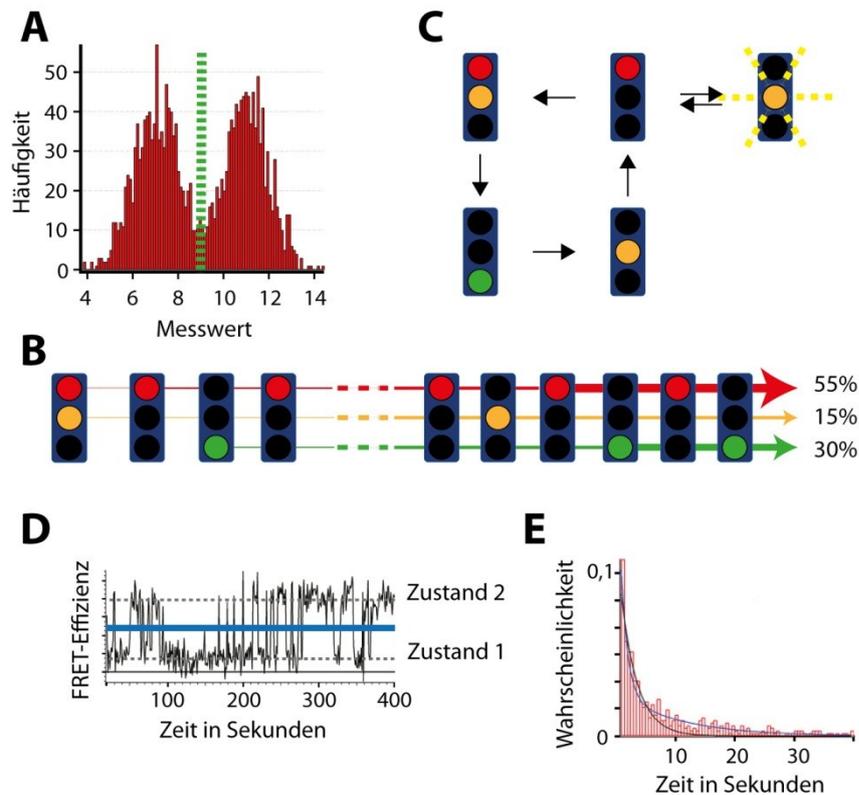


Abbildung 2.21 (A) Der Mittelwert (gestrichelte Linie) einer Verteilung beschreibt ein System nur dann sinnvoll, wenn die Verteilung monomodal ist und nicht wie in der Abbildung bimodal. (B) Die Ampelphasen stehen in der Analogie für die verschiedenen Zustände, in denen sich ein Molekül befinden kann. Bei einer Ensemble-Messung werden alle Zustände gleichzeitig gemessen und gemittelt. Damit können seltene Zustände und dynamische Informationen oft nur unzureichend bestimmt werden (siehe Haupttext). (C) Einzelmolekülmessungen erlauben die Messung von Zustandsänderungen jeweils einzelner Moleküle. Damit lassen sich auch sehr seltene Zustände identifizieren, die durch die Mittelwertbildung bei Ensemble-Messungen nicht mehr erkennbar wären. Außerdem kann die Dynamik im thermodynamischen Gleichgewicht beobachtet werden (siehe Haupttext). (D) Mit Einzelmolekülmethoden lassen sich bei genügend hoher Auflösung Zustandsänderungen in Echtzeit im thermodynamischen Gleichgewicht verfolgen. Wäre die Zeitauflösung nicht hoch genug oder würde ein Ensemble anstatt eines einzelnen Moleküls gemessen werden, würde man nur einen mittleren Wert erhalten (blaue Linie). Die abgebildete Messung zeigt die FRET-Effizienz über der Zeit. (E) Dadurch, dass nur ein einzelnes Molekül betrachtet wird, erhält man die Lebensdauer eines Zustandes ohne vorherige Synchronisierung und im Gleichgewicht. Aus: (82).

Viel mehr könnte deshalb über Ampelphasen bzw. Ampelzustände in Erfahrung gebracht werden, wenn die Aktivität vieler einzelner Ampeln untersucht werden würde: Man würde zunächst einmal bemerken, dass die einzelnen Ampeln tatsächlich eine Dynamik aufweisen und nicht etwa ständig 55 % der Ampeln auf

Rot stehen. Auch fände man heraus, dass es nicht drei (*rot, gelb, grün*), sondern vier Ampelzustände gibt (*rot, rot-gelb, grün, gelb*) und diese sich ineinander umwandeln, also eine Dynamische Heterogenität vorliegt (Abb. 2.21 C). Weil jede Ampel für sich betrachtet wird, ist es sogar möglich, sehr seltene Zustände, beispielsweise den gelb-blinkenden (bei Ausfall einer Ampel), zu finden. Man könnte schließlich zwei Populationen von Ampeln unterscheiden, z. B. solche an Hauptstraßen, die nur 45 % der Zeit eines Zyklus‘ auf Rot stehen, und solche an untergeordneten Straßen, die 65 % auf Rot stehen.

Natürlich können diese Analogien nicht alle Details erfassen, aber sie zeigen, dass es sich trotz des erhöhten experimentellen und finanziellen Aufwandes lohnt, Einzelmolekülmethoden komplementär zu den etablierten Methoden zu verwenden. Denn durch sie werden Dynamiken, seltene Zustände und mechanische Eigenschaften sichtbar gemacht, die sonst oft im Ensemble versteckt blieben.

Im Folgenden sollen noch einige Details näher beleuchtet werden. Prinzipiell ist es auch mit Ensemble-Messungen möglich an dynamische Informationen zu gelangen, dazu ist aber in der Regel eine Synchronisierung notwendig (z. B. bei *stopped flow*-Messungen). Solch eine Synchronisierung beinhaltet notwendigerweise, dass das zu untersuchende System aus dem thermodynamischen Gleichgewicht gebracht wird (und die Relaxation zurück ins Gleichgewicht beobachtet wird). Bei einfachen Dynamiken funktioniert diese Methode sehr gut, aber generell ist es problematisch, vom Nichtgleichgewicht auf das Gleichgewicht zu schließen. Im Gegensatz dazu stellt sich das Problem der Synchronisierung bei Beobachtung einzelner Moleküle erst gar nicht (Abb. 2.21 D und 2.21 E), denn hier kann die Dynamik direkt im thermodynamischen Gleichgewicht beobachtet werden. Nicht zu vernachlässigen sind auch einige praktische Aspekte, so spart man in der Regel wertvolles Probenmaterial und macht die Systeme direkt vergleichbar mit Molekulardynamik-Simulationen (85).

Exemplarisch sind in Abbildung 2.22 fünf Einzelmolekültechniken dargestellt. Damit konnten in den letzten Jahren Resultate erzielt werden, die ohne Verwendung von Einzelmolekülmethoden nicht möglich wären: Mit kraftmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 2.22 A) ist es möglich, die Haftung (86) oder die mechanische Stabilität und Struktur von Proteinen (87) zu bestimmen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass es sich bei dem Muskelprotein Titinkinase um einen Kraftsensor handelt, der bei mechanischer

Spannung eine Signalkaskade auslöst, die letztendlich die Bildung neuer Muskeln reguliert (88).

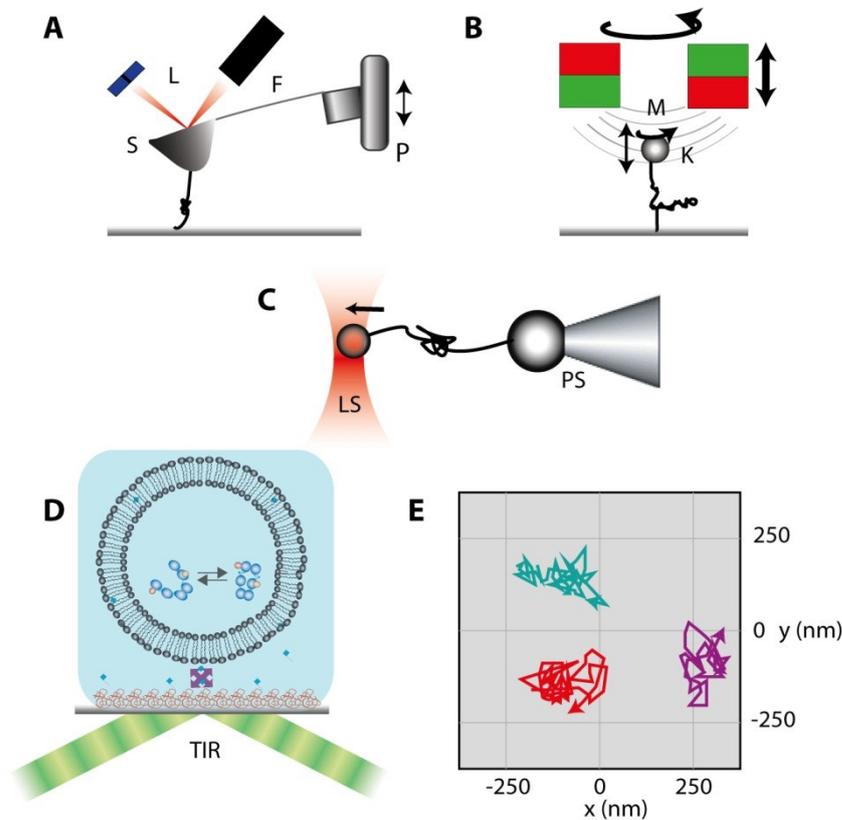


Abbildung 2.22 Einzelmolekülmethoden. (A) In einem Kraftmikroskop wird ein Molekül zwischen einem Federbalken (F) mit einer feinen Spitze (S) und einer Oberfläche eingespannt. Mit Hilfe eines Piezomotors (P) wird eine vertikale Kraft auf das Molekül ausgeübt und mit einem Lichtzeigersystem ausgelesen (L). (B) In einer magnetischen Falle ist das zu untersuchende Molekül auf der einen Seite an einer paramagnetischen Kugel (K) und auf der anderen Seite an einer Oberfläche befestigt. Mit Hilfe eines statischen Magnetfelds (M) können auf die Kugel und damit das Molekül Kräfte (hier in vertikaler Richtung) und Drehmomente ausgeübt werden. (C) In einer optischen Falle wird das zu untersuchende Molekül zwischen zwei Kugeln eingespannt. Beide Kugeln befinden sich entweder im Fokus zweier Laserstrahlen (LS) oder eine der Kugeln (große graue Kugel) ist wie hier gezeigt an einer Pipettenspitze (PS) befestigt. Die Kraft (hier in horizontaler Richtung) auf das Molekül wird über die Messung der Kugelauslenkung im Laserstrahl bzw. durch die Ablenkung des Laserstrahles bestimmt. (D) Einzelmolekül-FRET erlaubt Echtzeitbeobachtungen von Konformationsänderungen in Molekülen. In der Abbildung geschieht die Anregung über eine Totalinterne Reflexionsgeometrie (TIR). (E) *Molecular Tracking* ermöglicht die Nachverfolgung der Bewegung einzelner Fluorophore weit unterhalb des Beugungslimits. Dazu wird zu jedem Zeitpunkt das Zentrum des beugungslimitierten Punkts bestimmt. Die dabei erzielbaren räumlichen Auflösungen liegen bei wenigen Nanometern. Aus: (82).

Mit sogenannten magnetischen Pinzetten (Abb. 2.22 B) war es beispielsweise möglich zu zeigen, dass die Helikase EcoR124I keine DNS entwindet, wie zuvor aus Ensemble-Messungen vermutet wurde (89) oder das Verpacken einer einzelnen doppelsträngigen DNS in einen Bakteriophagen zu verfolgen (90).

Optische Pinzetten (Abb. 2.22 C) ermöglichten einzelne *Escherichia coli* Ribonuklease H Enzyme zu entfalten und wieder rückfalten zu lassen, wobei der bei der Rückfaltung entdeckte Zwischenzustand dem zuvor in Ensemble-Messungen gefundenen *molten globule*-Zustand entsprach. Damit wurde in eindrucksvoller Weise demonstriert, wie sich Einzelmolekül- und Ensemble-Messungen komplementieren können (91).

Während die drei genannten Methoden kraftspektroskopische Ansätze darstellen, gehören Einzelmolekül-Förster Resonanz-Energie-Transfer (*smFRET*) und *Molecular Tracking* zu den fluoreszenzspektroskopischen Methoden (Abb. 2.22 D, 2.22 E) (92).

Mit Hilfe von *smFRET* ist es zum Beispiel vor kurzem gelungen das Bewegungsmuster des molekularen Chaperons und Hitzeschock-Proteins Hsp90 aufzuklären und als Wippbewegung zu identifizieren (93). Mit *Molecular Tracking* ist es möglich, den Pfad, den ein Molekül auf Grund von (gerichteter) Diffusion zurücklegt, im Nanometerbereich zu rekonstruieren, also weit unterhalb des Beugungslimits. Damit wurde beispielsweise gezeigt, in welcher Art und Weise sich Myosin V entlang von Aktinfilamenten bewegt (94). Allen Messungen auf der Ebene einzelner Moleküle gemeinsam ist, dass die mit ihnen erhaltenen Messwerte stark von Fluktuationen dominiert werden. Diese stellen jedoch nicht nur störendes Rauschen dar, sondern sind eine intrinsische Eigenschaft des jeweiligen Systems, deren Messung weitere Informationen liefern kann. Als ausgezeichnete Übersichtsartikel zu Fluoreszenz-Fluktuationen ist (95) zu empfehlen.

Die methodische Vielfalt innerhalb der Einzelmolekülmethoden hat sich in letzter Zeit rasant vergrößert. Die gewonnen Erkenntnisse tragen dabei wesentlich zu einem verbesserten Verständnis von biomolekularen Systemen und deren Dynamik bei und werden auch in Zukunft Einblicke in die funktionellen Grundbausteine des Lebens liefern, die mit Ensemble-Methoden allein nicht zu gewinnen wären.

2.8 Die Parkinson'sche Krankheit und Alpha Synuclein

In der vorliegenden Arbeit wird damit begonnen, die Wirkung des mit der Parkinson'schen Krankheit (Schüttellähmung) in Verbindung stehenden Proteins Alpha-Synuclein auf Lipidschichten zu untersuchen. Des Weiteren wurden im Rahmen zweier betreuter Arbeiten (einer Bachelor- (3) und einer Diplomarbeit

(2)) mehrere Methoden verwendet und getestet, um Alpha-Synuclein-Aggregationsansätze zu charakterisieren. Nachfolgend wird deshalb kurz auf die Parkinson'sche Krankheit, das Protein Alpha-Synuclein sowie seine potentiell zytotoxische Wirkung eingegangen.

Der folgende Abschnitt orientiert sich inhaltlich an (3).

James Parkinson (1755-1824) veröffentlichte 1817 eine Abhandlung mit dem Titel *"An Essay on the Shaking Palsy"* (96). Er beschreibt darin die Kardinalsymptome (Bradykinese (Bewegungsverlangsamung), Ruhetremor (Zittern) und Rigor (Muskelsteifheit)) der später nach ihm benannten Krankheit.

Die Symptome sind auf ein Ungleichgewicht der Neurotransmitter Dopamin und Acetylcholin im Gehirn, vorwiegend in der Substantia Nigra, zurückzuführen. Die Substantia Nigra ist verantwortlich für die neuronale Modulation der Basalganglien. Diese stellen das subcorticale Bindeglied zwischen assoziativem und motorischem Cortex dar. Acetylcholin wirkt dabei stimulierend auf die Neuronen der Basalganglien ein, während Dopamin eine dämpfende Funktion wahrnimmt (97, 98).

Notwendige histologische Kriterien für die Diagnose von Morbus Parkinson sind charakteristische intrazelluläre Schädigungsmuster, die als Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten bezeichnet werden. Sie kommen häufig in der Nähe des Zellkerns vor, sind eosinophil und bestehen aus Protein-Aggregaten (99). Mithilfe von immunhistochemischen Methoden konnte gezeigt werden, dass diese Strukturen hauptsächlich aus dem Protein Alpha-Synuclein bestehen (100). Morbus Parkinson wird somit den Synucleinopathien zugeordnet (101).

Struktur

Alpha-Synuclein ist ein 140 Aminosäuren großes, intrinsisch ungeordnetes Protein.

Seine Primärstruktur weist einige Besonderheiten auf. So gibt es ein kurzes Residuen-Motiv welches sich nicht vollständig konserviert wiederholt und mit der Konsensus-Sequenz K[A,T]K[E,Q][G,Q]V beschrieben werden kann. Die Wiederholungen treten ausschließlich in der N-terminalen Hälfte des Proteins auf. In Anwesenheit von Lipidschichten kann sich das N-terminale Ende zu einer amphipathischen α -Helix umordnen und so in die Membran inserieren. Die hydrophoben Bereiche sind demnach in die Lipidschicht integriert, während die Seitenketten der polaren Abschnitte von der Membran weg zeigen (102).

Im Gegensatz zum eher basischen N-terminalen Teil des Alpha-Synucleins ist die C-terminale Domäne (Residuen 96-140) stark negativ geladen (103). Der hydrophobe Abschnitt zwischen Residuen 66 und 95 wird auch als NAC-Domäne (Non-amyloid β Component) bezeichnet. Dieser wird eine wichtige Rolle bei der Fibrillenbildung zugeschrieben (104).

Aus der Sekundärstrukturvorhersage (Abb. 2.23) geht hervor, dass der α -helikale Bereich womöglich bis in die hydrophobe NAC-Domäne reicht.

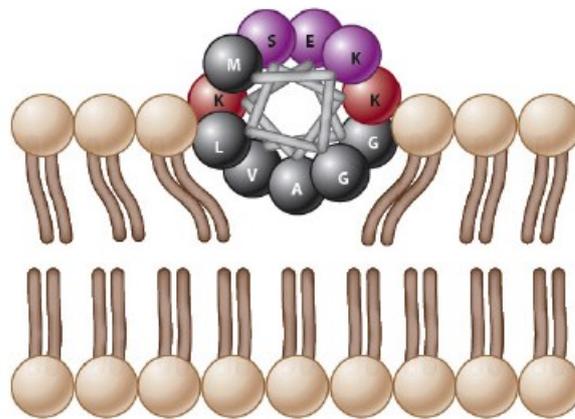


Abbildung 2.23 Helikale Edmundson-Darstellung des Anfangsteils der N-terminalen Domäne des Alpha-Synucleins in einer Lipidmembran. Hydrophobe Aminosäuren sind schwarz dargestellt, hydrophile sind violett und rot gekennzeichnet. Zwei gegenüberliegende, positiv geladene Lysine (rot) wechselwirken außerdem mit den negativen Phospholipidköpfen. Aus: (101).

Aggregation und Fibrillenbildung von Alpha-Synuclein

Alpha-Synuclein ist in der Lage, Aggregate zu bilden, wobei zunächst zwischen Oligomeren und Fibrillen unterschieden wird (101).

Fibrillen können aus tausenden Alpha-Synuclein-Monomeren zusammengesetzt sein. Sie bilden längliche Strukturen aus, die unter dem Elektronenmikroskop oder dem Rasterkraftmikroskop beobachtet werden können. Diese sogenannten Fibrillen erreichen Längen von bis zu 10 μm . Der Durchmesser beträgt typischerweise 10 nm. Die Monomere selbst weisen innerhalb von Fibrillen im Bereich von 70 zentralen Aminosäuren eine geordnete Sekundärstruktur auf, wohingegen der N- und C-Terminus nahezu ungefaltet bleibt (105). Es handelt sich bei der konformationellen Umordnung um die Ausbildung einer *Cross- β* -Struktur.

Die oligomere Spezies von Alpha-Synuclein besteht aus vergleichsweise wenigen Einzelmolekülen. Oligomere könnten zum einen Vorstufen für die Fibrillenbildung sein, zum anderen aber auch eine eigenständige Rolle in der Entstehung der Parkinson'schen Krankheit inne haben (28). Um diese Aggregate unter Laborbedingungen besser untersuchen zu können, wurden zahlreiche sogenannte Aggregationsprotokolle entwickelt, um diese in vitro in größeren Mengen herzustellen. So wurde durch kürzlich erschienene Studien nahe gelegt, dass die Oligomerisierung durch Kationen wie Cu^{2+} oder Fe^{3+} induziert werden (106).

Mögliche Funktionen und Rolle der Pathogenese von Morbus Parkinson

Während bis vor einigen Jahren noch davon ausgegangen wurde, dass die fibrillären Formen des Alpha-Synucleins für die Pathogenese der Parkinson-Krankheit verantwortlich sind, herrscht heute weitgehende Einigkeit darüber, dass bereits die viel kleineren oligomeren Spezies einen toxischen Effekt auf die Zelle haben (107). Der toxische Effekt könnte dadurch entstehen, dass sich Alpha-Synuclein-Oligomere in Lipidmembranen einlagern und in der Folge Poren bildet (108).

Eine Porenbildung durch Alpha-Synuclein, beispielsweise in der Zellmembran, würde zu einem massiven Einstrom von Ca^{2+} -Ionen führen. Dies hätte einen Zusammenbruch der zellulären Signaltransduktion und daraus resultierend schließlich den Zelltod zur Folge (109, 110).

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Materialien, Protokolle, Techniken und Methoden beschrieben. Auf Grund der vielfältigen Möglichkeiten Arbeitsschritte durchzuführen, werden Protokolle zuerst in allgemeiner Form beschrieben und im Anschluss anhand eines oder mehrerer Beispiele konkretisiert.

3.1 Material

Lipide (bezogen von Fa. Avanti Polar Lipids, USA)

- DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin)
- Ei-Sphingomyelin (hauptsächlich Hexadecanoyl-Sphingomyelin)
- Cholesterol (Baumwolle)
- Rhodamin-PE (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(Lissamin-Rhodamin-B-Sulfonyl))
- POPC (1-Palmitoyl-2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin)
- POPE (1-Palmitoyl-2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin)

Lipide (bezogen von Fa. Nanocs, USA)

- Cholesterol-PEG-NHS (5kDa)
- DSPE-PEG-NHS (5kDa)

Sonstige wichtige Chemikalien

- HPLC-Wasser *Biochrom (Berlin)*
- Hepes
- Ethanol (reinst) *Merck (Darmstadt)*
- Chloroform (HPLC-Grad) *Sigma-Aldrich (USA)*

3.2 Handhabung von Lipiden

3.2.1 Herstellung von Lipidvesikeln

Lipide werden meist als Pulver oder in Chloroform gelöst gekauft und bei nicht mehr als -20°C gelagert. Für die Herstellung von Lipidmischungen werden die in

Chloroform gelösten Lipide in Braunglasfläschchen gemischt. Dabei ist darauf zu achten, dass eventuell nicht alle Lipide in Chloroform gut lösbar sind. In diesem Fall empfiehlt es sich, noch etwas Methanol zum Ansetzen der Mischung zu verwenden. Um das Lösungsmittel zu entfernen, wird es zunächst durch Abblasen mit einem inerten Gas grob verdampft, um anschließend unter Vakuum auch noch die letzten Spuren zu entfernen. Zurück bleibt ein Lipidfilm, der hygroskopisch ist und in vielen Fällen anfällig für Oxidation durch Luftsauerstoff. Aus diesem Grund sollte das Braunglasfläschchen sofort nach Beendigung des Vakuumprozesses mit einem inerten Gas gespült, luftdicht verschlossen und eingefroren werden. Alternativ kann der Lipidfilm auch sofort mit einer wässrigen Lösung hydratisiert werden. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass die Temperatur der Hydratisierungslösung größer ist als die höchste Hauptübergangstemperatur jeder einzelnen Lipidkomponente. Zusätzlich kann die Lösung noch Gefrier-Tau-Zyklen unterworfen werden. Durch die Hydratisierung, das Schütteln und gegebenenfalls die Gefrier-Tau-Zyklen ergeben sich nun sogenannte multilamellare Vesikel (MLV). Dies sind mehrere Mikrometer große, zwiebelartig aufgebaute, d. h. mehrschichtige, Lipidvesikel. Die MLV werden nun bei -20°C eingefroren oder gleich weiterverwendet, um aus ihnen sogenannte unilamellare, also einwandige, Vesikel herzustellen. Dazu existieren zwei häufig gebrauchte Methoden: Beschallung und Extrusion. Bei der Beschallung werden die MLV durch Schall in kleinere einwandige Vesikel aufgebrochen. Die mit dieser Methode hergestellten Vesikel werden als kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUV) bezeichnet. Bei der Extrusionsmethode wird die MLV-Lösung mehrfach durch einen Polykarbonat-Filter gepresst, wobei die Anzahl der Extrusionsschritte groß genug und ungeradzahlig sein sollte, da dadurch vermieden wird, dass sich eventuell noch vorhandene größere Lipidaggregate in der am Ende entnommenen Lösung befinden.

Mit Dynamischer Lichtstreuung (DLS, siehe Kapitel 3.5 und Abb. 3.4) kann die Größenverteilung der hergestellten Vesikel überprüft werden. Der Durchmesser sollte monomodal verteilt sein und für SUV etwa bei 30 nm, für LUV etwa im Bereich der Porengröße des verwendeten Filters liegen. Die Vesikellösungen sollten bei 4°C gelagert und innerhalb von zwei Wochen verbraucht werden.

Protokoll**Herstellung unilamellarer DOPC-Vesikel**

1. DOPC in Chloroform in einem Braunglasfläschchen lösen, sodass die Endkonzentration 1 mg/mL beträgt.
2. In Chloroform gelöstes Rhodamin-PE (RhPE) dazugeben, sodass der RhPE-Anteil 0,1 mol% beträgt.
3. Lösung mit trockenem Stickstoff abblasen bis kein Chloroform mehr sichtbar ist.
4. Braunglasfläschchen für sechs Stunden ins Vakuum geben (~ 0,1 mbar), um Chloroformspuren zu beseitigen.
5. Um den erhaltenen Lipidfilm zu hydratisieren, 1 mL Reinstwasser in das Braunglasfläschchen geben und 15 Minuten schütteln.
6. 21-malige Extrusion bei Raumtemperatur (Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids) der LUV-Lösung durch einen 100 nm-Polykarbonat-Filter (Nucleopore, Fa. Whatman, Piscataway, NJ, USA).
7. Kontrollmessung mit Dynamischer Lichtstreuung: Vesikeldurchmesser sollten etwa 70 bis 110 nm betragen und monomodal verteilt sein.
8. Lagerung bei 4°C.

Protokoll**Herstellung unilamellarer PSC221-Vesikel (DOPC:Sphingomyelin:Cholesterol 2:2:1 (mol))**

1. PSC in Chloroform/Methanol (4:1 vol:vol) in einem Braunglasfläschchen lösen, sodass die Endkonzentration 1 mg/mL beträgt.
2. In Chloroform gelöstes Rhodamin-PE (RhPE) dazugeben, sodass der RhPE-Anteil 0,1 mol% beträgt.
3. Lösung mit trockenem Stickstoff abblasen, bis kein Chloroform mehr sichtbar ist.
4. Braunglasfläschchen für sechs Stunden ins Vakuum bei 0,1 mbar um Chloroformspuren zu beseitigen.
5. Um den erhaltenen Lipidfilm zu hydratisieren, 1 mL 50°C warmes Reinstwasser in das Braunglasfläschchen geben und 15 Minuten schütteln.
6. 21-malige Extrusion (Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids) der LUV-Lösung durch einen 100 nm-Polykarbonat-Filter (Nucleopore, Fa. Whatman, USA) bei 50 – 60°C.
7. Kontrollmessung mit Dynamischer Lichtstreuung: Vesikeldurchmesser sollten etwa 70 bis 110 nm betragen und monomodal verteilt sein.
8. Lagerung bei 4°C.

3.2.2 Herstellung von oberflächengestützten Lipiddoppelschichten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden frisch gespaltene Glimmeroberflächen und die Fusionsmethode (111) verwendet, um oberflächengestützte Lipiddoppelschichten herzustellen. Dazu wird in einem ersten Schritt ein Glimmerplättchen vorsichtig mit einem Klebeband oder einem Skalpell gespalten. Die sich dadurch ergebende Oberfläche ist atomar glatt, stark hydrophil und negativ geladen. Im nächsten Schritt wird die Glimmeroberfläche mit einer Lösung unilamellarer Vesikel inkubiert (Abb. 3.1 A) und danach mit hinreichend Medium gespült. Während der Inkubation fusionieren die Vesikel mit der Oberfläche und bilden eine mehr oder weniger defektfreie Lipidschicht - in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, der Inkubationstemperatur und anwesenden Ionen (Abb. 3.1 B und C). Nachdem die Lipidschicht hergestellt wurde, ist eine optische Kontrolle mit einem Fluoreszenzmikroskop hilfreich, um sicherzustellen, dass sich keine nicht-fusionierten Vesikel mehr in der Lösung befinden oder auf der Oberfläche adhärirt sind. Sollten noch derartige Vesikel zu sehen sein, so kann zum einen noch besser gespült werden.

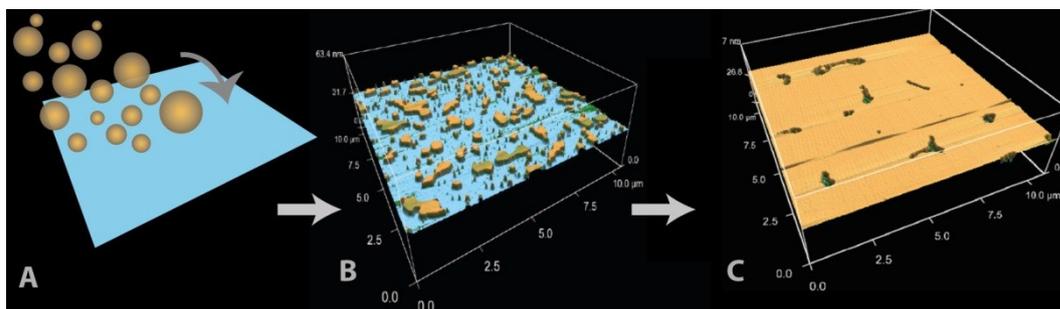


Abbildung 3.1 Prinzip der Vesikelfusion. (A) Unilamellare Vesikel werden eine gewisse Zeit auf einer frisch gespaltenen Glimmerschicht inkubiert. Je nachdem, wie lange gewartet wird, bevor mit lipidfreier Lösung gespült wird, erhält man entweder einzelne Lipidflecken (B) oder eine durchgehende Lipidschicht (C).

Zum anderen hat sich gezeigt, dass 30 bis 60 Minuten bei 50 bis 60°C im Ofen dazu beitragen können, die Anzahl noch adhärenter und gelöster Vesikel deutlich zu reduzieren. Anschließend sollte die Lipidschicht wieder langsam abgekühlt und noch einmal gespült werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen Lipidmembranen aus DOPC, DOPS, POPC, C₂₀BAS, SM und Cholesterol zum Einsatz, wobei sich die Lipidschichten immer in der fluiden Phase befanden. In einigen Experimenten ternäre Lipidmembranen

verwendet, die unter den experimentellen Bedingungen phasensepariert (L_O -Phase, L_D -Phase) vorlagen. Sie bestanden aus Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Cholesterol im Verhältnis 2:2:1 (mol) (kurz: PSC221).

Protokoll

Herstellung einer oberflächengestützten DOPC-Lipiddoppelschicht

1. Glimmerplättchen in Fluidzelle mit wasserunlöslichem Kleber befestigen.
2. LUV-Lösung auf 0,1 mg/mL mit Reinstwasser verdünnen und 2 mM $CaCl_2$ dazu geben.
3. Glimmerplättchen ($\sim 1\text{ cm}^2$) mit einem sauberen Skalpell frisch spalten. Die gewonnene Oberfläche sollte glatt und sauber aussehen.
4. 50 μL LUV-Lösung auf das Glimmerplättchen geben und 2 Minuten bei Raumtemperatur einwirken lassen.
5. Mit 50 mL Reinstwasser spülen.
6. Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop.
7. Mit 50 mL Puffer spülen.
8. 45 Minuten bei 50°C in den Ofen.
9. Langsam abkühlen lassen.
10. Mit 100 mL Puffer spülen.

3.3 Kraftmikroskopie

Für alle AFM-Experimente kam ein MFP-3D-AFM (Fa. Asylum Research, USA) zum Einsatz. Sowohl die Datenerfassung als auch die Auswertung basierten auf der Plattform IGOR Pro 6 (Fa. Wavemetrics, USA). Für die Auswertung wurden selbst entwickelte Programmroutinen verwendet.

Alle Punktionsexperimente wurden mit DNP-S Chips (Fa. Bruker, USA) durchgeführt. Ihre Spitzen weisen einen nominalen Krümmungsradius von 10 nm auf und kamen sowohl für Abbildungen wie auch für die Punktionskurven selbst zum Einsatz. Die Blattfedern dieser Chips besitzen eine nominale Federkonstante zwischen 0,1 und 0,3 nN/nm.

Für die Extraktionsexperimente wurden MLCT-Chips verwendet (Abb. 3.2). Ihre Spitzen weisen einen nominalen Krümmungsradius von bis zu 40 nm auf und wurden gleichfalls sowohl für die Abbildungen wie auch für die Extraktionskurven verwendet. Die Blattfedern dieser Chips besitzen nominale Federkonstanten zwischen 0,01 und 0,5 nN/nm.

Alle Abbildungen wurden im *Tapping*-Modus durchgeführt. Die Federkonstanten wurden mit Hilfe der Methode des thermischen Rauschens (112, 113) bestimmt.

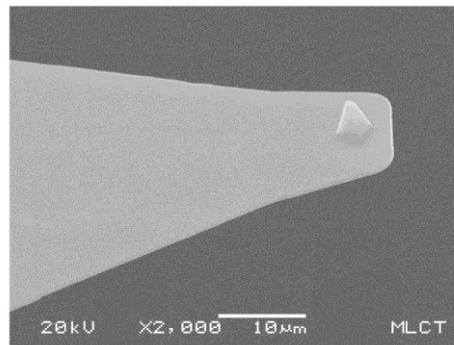


Abbildung 3.2 MLCT-Blattfeder mit Spitze im Rasterelektronenmikroskop.

3.3.1 Kraft-Abstands-Kurven

Während einer Kraftkurve werden zunächst die zurückgelegte Strecke des z-Piezos¹¹ und die Verbiegung der Blattfeder gemessen. Um daraus den tatsächlichen Abstand der Spitze von der Oberfläche zu erhalten, muss die Verbiegung der Blattfeder („*Defl*“) berücksichtigt werden, wozu wiederum die Kenntnis der Empfindlichkeit des Lichtzeigersystems (invOLS¹²) nötig ist. Die invOLS ist dabei die Proportionalitätskonstante zwischen der Verbiegung der Blattfeder in nm und der damit korrespondierenden Spannungssignaländerung in Volt („*DeflV*“), wie sie mit der segmentierten Photodiode gemessen wurde. Experimentell wird sie ermittelt, indem die AFM-Spitze auf ein hartes Substrat gedrückt wird. Der Kehrwert der Steigung des daraus resultierenden *DeflV*-z-Piezo-Signals ist dann die invOLS. Ist also die Verbiegung der Blattfeder am Ort der Spitze (in nm) bekannt, kann daraus die von der Spitze tatsächlich zurückgelegte Strecke bestimmt werden. Im Falle der Punktionsexperimente bietet sich hierfür das Kurvenstück nach der Punktion an, wenn sich die Spitze also auf dem harten Glimmer befindet und gilt $\Delta z\text{-Piezo} = \Delta\text{Defl}$. Zusammen mit der bereits vor oder nach dem Experiment bestimmten Federkonstante, können auf diese Weise Kraft-Abstands-Kurven gewonnen werden.

¹¹ Die von den Piezostellelementen zurückgelegte Strecke wird mit kapazitiven Sensoren gemessen, da Piezoaktuatoren oftmals stark nichtlinear sind.

¹² invOLS: inverted optical lever sensitivity

Bei den Extraktionsexperimenten wird die InvOLS vor dem Experiment bestimmt. Nach dem eigentlichen Experiment wird dann noch die Federkonstante durch Aufnahme eines thermischen Rauchspektrums und mehrmaliger Messung der zugehörigen InvOLS ermittelt. Bei Experimenten mit hohen ($>2\mu\text{m/s}$) Geschwindigkeiten müssen zusätzlich hydrodynamische Effekte berücksichtigt werden.

3.3.2 Funktionalisierung von AFM-Spitzen

Die chemische Ankopplung eines oder weniger Lipide an eine AFM-Spitze erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von NHS¹³-Aktivester-Chemie. In einem ersten Schritt wird ein Siliziumnitrid-Chip mit einem organischen Lösungsmittel vorgereinigt, um eventuell vorhandene leichte Kontaminationen zu entfernen. Dann wird die Oberfläche mit Hilfe eines Plasmaprozesses aktiviert, d. h. die Dichte der Silanol-Gruppen auf der Chipoberfläche und damit auf der zu funktionalisierenden Spitze wird erhöht. Als nächstes werden Aminosilane naß-chemisch an die Silanolgruppen angekoppelt, sodass nun Aminogruppen auf der Oberfläche der Spitze zur Verfügung stehen. Diese „Aminierung“ der Oberfläche macht es nun möglich, Aktivester, also Polymere, welche eine NHS-Gruppe tragen, anzubinden. Geschieht dies im wässrigen Milieu, muss berücksichtigt werden, dass die Hydrolyse wie auch die Reaktivität von NHS-Estern stark pH-Wert-abhängig sind. Wird die Reaktion in organischen Lösungsmitteln wie beispielsweise Chloroform durchgeführt wird meist noch Triethylamin dazu gegeben (0,5 - 5 vol%). Nach einer Inkubationszeit, die je nach gewählten Reaktionsbedingungen wenige Minuten oder mehrere Stunden betragen kann, werden die Chips noch gründlich gespült und so bald wie möglich zum Messen verwendet.

¹³ N-Hydroxysuccinimid kann Moleküle oder Oberflächen aminoreaktiv machen.

Protokoll**Funktionalisierung einer AFM-Spitze mit einem PEG-Lipid**

1. Chips (MLCT, Fa. Bruker, USA) 30 Sekunden in Ethanol schwenken. Anschließend Ethanol mit Filterpapier vorsichtig abnehmen.
2. Oberfläche mit Sauerstoffplasma für 15 Minuten bei 20 % Leistung und 0,25 mbar Prozessdruck aktivieren. Plasmaanlage: Modell Femto, Fa. Diener.
3. Während des Plasmaprozesses die Vectabond®-Lösung (APTES) vorbereiten. Dazu 50 µL Vectabond® in 5 mL Aceton lösen.
4. Chips nach Plasmaprozess kurz (1 s) in Aceton schwenken und dann für 15 Minuten in der vorbereiteten Vectabond®-Lösung inkubieren.
5. Chips mehrmals gründlich in Aceton schwenken (2x15 Sekunden) und dann für 30 Min bei 70°C in den Ofen.
6. Abwiegen und Lösen von Lipid-PEG-NHS (5 kDa) und mPEG5kDa-NHS (Fa. Rapp-Polymere, Tübingen) in Chloroform (inkl. 3 % Trimethylamin). Konzentrationen ~ 50mg/mL.
7. Gewünschte Mischungsverhältnisse beider Lösungen herstellen.
8. Chips über Nacht in Chloroform gesättigter Atmosphäre inkubieren.
9. Chips gründlich mit Chloroform, Ethanol und warmem Reinstwasser (in dieser Reihenfolge) spülen bzw. mit Chloroform spülen und darin lagern bis Chips benötigt werden.

3.3.3 Auswertung von Punktionsexperimenten

Unter Punktionskraft versteht man die maximale Kraft, die die Spitze auf die Lipidschicht ausüben kann, bevor es zur Punktion kommt. Um die elastischen Eigenschaften der Lipidmembranen aus den Punktionskurven zu bestimmen, könnte prinzipiell das Hertz-Modell (114) für sphärische Indenter verwendet werden. Dieses geht jedoch davon aus, dass der Radius der Kugel (der hier dem Krümmungsradius R der AFM-Spitze entspricht) sehr viel kleiner ist als die Dicke des deformierten Substrats. Da jedoch die Dicke von Lipidmembranen und der Radius von AFM-Spitzen in der gleichen Größenordnung liegen, würde der Young'sche Modul systematisch überschätzt werden. Aus diesem Grund wird ein modifiziertes Hertz-Modell (115) verwendet. Es basiert auf dem ursprünglichen Hertz-Modell, das um einen semiempirischen Term erweitert wurde, der der endlichen Dicke t der Lipidschicht explizit Rechnung trägt:

$$F = \frac{16Y}{9} R^{1/2} (z - z_0)^{3/2} [1 + 0.884\chi + 0.781\chi^2 + 0.386\chi^3 + 0.0048\chi^4] \quad [22]$$

mit $\chi = (R \times (z - z_0))^{1/2} / t$. Fit-Parameter sind hierbei der Young'sche Modul Y und der Punkt z_0 , an dem die elastische Deformation gemäß Modell beginnt (Abb. 2.15 B).

Aus der Literatur lässt sich entnehmen, dass sich in wässriger Lösung zwischen der Oberfläche, hier frisch gespaltener Glimmer, und der proximalen Seite der Lipidmembran eine Wasserschicht von etwa 1 nm Dicke bildet (32, 116–118). Die Schichtdicke der Lipidmembran t kann dann aus der Differenz zwischen z_0 und der Dicke der Wasserschicht $d_{WL} = 1$ nm gewonnen werden ($t = z_0 - d_{WL}$) (Abb. 3.3). Darüber hinaus wird angenommen, dass die Wasserschicht von der hydrophilen Glimmeroberfläche sowie der hydrophilen Unterseite der Lipidschicht derart stabilisiert wird, dass sie als hart im Vergleich zur Lipidschicht angesehen werden kann. Kommt es schließlich zur Punction, bricht sie auf Grund der nicht mehr vorhandenen, stabilisierenden Lipidschicht instantan zusammen.

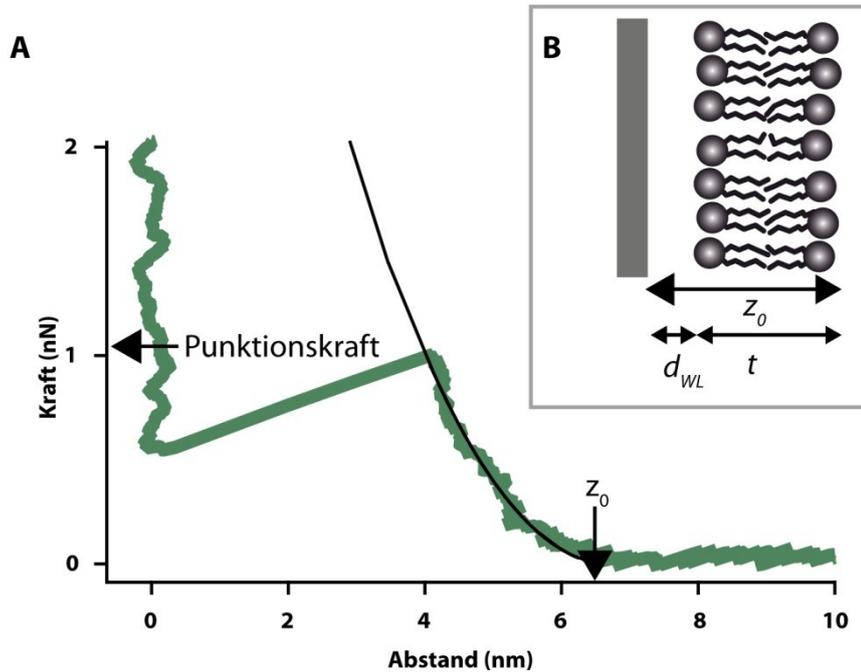


Abbildung 3.3 (A) Punctionskurve. Der Punkt z_0 an dem die Verbiegung der Membran gemäß Modell beginnt, wird als Abstand der Oberseite der Lipidmembran von der Oberfläche angenommen. (B) Oberflächengestützte Lipidmembran. Der Abstand der Oberfläche der Oberseite der Membran z_0 setzt sich aus der Dicke der Membran t und der Dicke einer Wasserschicht d_{WL} zusammen.

Das modifizierte Hertz-Modell wird schließlich an den Bereich der elastischen Deformation angepasst. Als Fit-Grenzen werden dabei auf der einen Seite der Ort der Maximalkraft verwendet. Auf der anderen Seite der Ort, an dem die elastische Deformation 0,1 nN erreicht hat (wo davon ausgegangen werden kann, dass die DLVO- und Hydratationskräfte genügend klein sind (6, 119)).

Der Young'sche Modul und die Dicke der Lipidmembran werden benutzt, um den Kompressionsmodul k_A sowie den Biegemodul κ_c aus der Theorie dünner Platten zu gewinnen (siehe dazu auch (48–50) und Kapitel 2.2.7).

3.3.4 Auswertung von Einzelligextraktions-Experimenten

Identifikation von Extraktionskurven

Um Artefakte zu minimieren wird zunächst festgelegt, dass die Abrisslänge einer Kurve die nominale Konturlänge des Verbindungspolymers nicht überschreiten darf. Konkret bedeutet dies zum Beispiel im Falle eines PEG(6kDa)-Verbindungspolymers, dass die Abrisslänge unter 41 nm liegen muss, wobei von einer Länge von 0,3 nm pro PEG-Grundeinheit (44 Da) ausgegangen wird. Im Anschluss werden die geglätteten Kraft-Abstands-Kurven innerhalb dieser Grenze auf Abrisse hin untersucht und die Kraft am Ort des Abrisses als „Extraktionskraft“ in die Statistik aufgenommen. Des Weiteren kann die Kraftladungsrate aus der zeitlichen Zunahme der Kraft am Ort des Abrisses bestimmt werden.

Die Lipidextraktionsmessungen in Kapitel 0 erfordern es zum Teil sehr kleine Kräfte nahe des Systemrauschens zu messen. Um dies zu berücksichtigen wurde die Empfindlichkeit des Messaufbaus mit 10 pN abgeschätzt. Darunterliegende Kräfte wurden daher für die Bestimmung der thermischen Aktivierungsparameter (siehe unten) nicht berücksichtigt.

Bestimmung der thermischen Aktivierungsparameter

Die Bestimmung der thermischen Aktivierungsparameter erfolgte so wie in Kapitel 2.3.3 dargestellt:

Zunächst werden die Extraktionskräfte F ermittelt und in einem oder mehreren normierten Histogrammen $p(F)$ dargestellt, sodass $\int_0^\infty p(F)dF = 1$ gilt. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass die Streckung der Extraktionskurven mit einem WLC-Modell beschrieben werden kann. Daraus lässt sich dann jeder Kraft unmittelbar eine Kraftladungsrate $\dot{F}(F)$ zuordnen (64, 69). Mit Gleichung [15]

kann nun von jeder $p(F)$ -Verteilung auf die korrespondierende Verteilung der kraftabhängigen Lebensdauern $\tau(F)$ übergegangen werden (Methode A, siehe Kapitel 2.4).

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, kann Gleichung [15] so vereinfacht werden, dass sie auch für Kraftverteilungen mit Ausreißern anwendbar ist (Gleichung [17]). Es geht in diesem Fall dann nicht mehr die ganze Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung eine sondern nur noch die mittlere Kraft und der Interquartilenabstand, ein Maß für die Breite der Verteilung. Jede Kraftverteilung $p(F)$ trägt aus diesem Grund bei Anwendung von Gleichung [17] auch nur einen Punkt, nämlich $\tau(\langle F \rangle)$, zum $\tau(F)$ -Diagramm bei (Methode B, siehe Kapitel 2.4).

Die Bestimmung der thermischen Aktivierungsparameter, die die komplette Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $p(F)$ benutzt (Gleichung [15]), wird als „Methode A“ bezeichnet. Das Vorgehen gemäß Gleichung [17] wird als „Methode B“ bezeichnet.

3.4 Elektrophysiologische Messungen

In einer im Rahmen dieser Dissertation angefertigte Diplomarbeit wurde ein Messaufbau realisiert, der elektrophysiologische Messungen an schwarzen Membranen gestattet. Details zum Messaufbau selbst, zu den Messprotokollen und den erfolgreichen Testmessungen mit Gramacidin sind der Arbeit zu entnehmen (2).

3.5 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (DLS, Abb. 3.4) ist eine Methode, um den hydrodynamischen Radius von Partikeln zu bestimmen. Ein Laserstrahl wird dazu in die Lösung mit den zu vermessenden Partikeln geleitet und das gestreute Licht in einem Detektor registriert. Durch Autokorrelation des zeitlichen Verlaufs der Intensitätsfluktuationen im Detektorsignal und Anwendung der Stokes-Einstein-Beziehung kann die Größenverteilung der Partikel gewonnen werden. Für Details siehe (2, 3, 120). Idealerweise sollten die Partikel monomodal verteilt sein. Ihr Durchmesser sollte deutlich unter der der Wellenlänge des Lasers liegen, jedoch groß genug sein, um die Streuintensität nicht zu klein werden zu lassen.

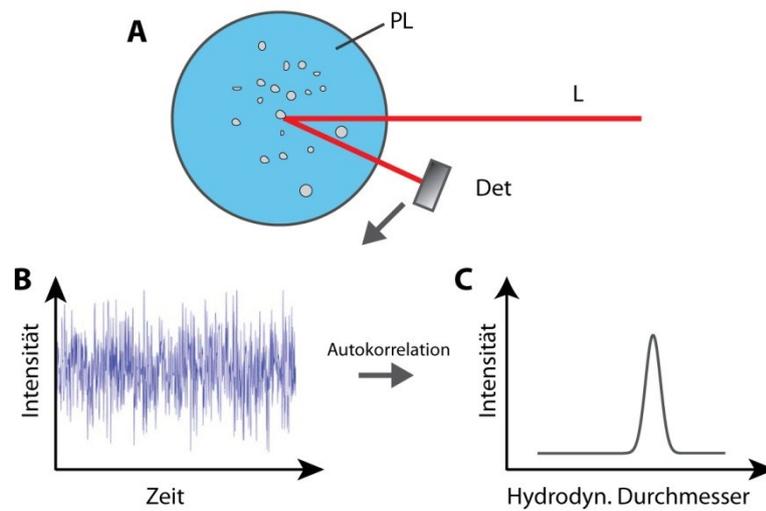


Abbildung 3.4 Prinzip der Dynamischen Lichtstreuung. (A) Das von einer Partikellösung (PL) gestreute Licht eines Lasers (L) wird von einem Detektor (Det) als fortlaufende Intensitätsfluktuation (B) registriert. (C) Diese wird autokorreliert und ergibt nach Anwendung der Stokes-Einstein-Beziehung den mittleren hydrodynamischen Durchmesser der gelösten Partikel.

3.6 Alpha-Synuclein

Synthese von Alpha-Synuclein

Die Methoden für die rekombinante Expression und Aufreinigung der Alpha-Synuclein-Monomere, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, wird in (2, 3) beschrieben.

Aggregationsansatz

Wie bereits erwähnt, wurden im Rahmen einer Bachelor- und einer Diplomarbeit Verfahren etabliert, um Aggregationsansätze zu charakterisieren. Die verwendeten Aggregationsprotokolle sind in (3) beschrieben.

4 Nanomechanische Eigenschaften von Lipidmembranen (PKT)

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der nanomechanischen Messungen präsentiert und diskutiert. Jedes Unterkapitel ist dabei einem speziellen Experiment gewidmet. Die Experimente unterscheiden sich hinsichtlich der Art und Weise, wie eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften der Lipidmembran hervorgerufen wird:

Im ersten wird der Einfluss kleiner amphiphiler Moleküle am Beispiel des Ethanols untersucht.

Im zweiten Unterkapitel steht die Frage, wie die Lipidzusammensetzung selbst Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften nimmt, im Mittelpunkt. Zu diesem Zweck werden Messungen an Lipidmembranen mit unterschiedlich großen Anteilen an Bolalipiden miteinander verglichen.

Schließlich wird noch die Modulation der Lipidmembranstabilität durch Proteine, anhand der Interaktion des Proteins Alpha-Synuclein, mit anionischen Lipidschichten demonstriert.

4.1 Wirkung von Ethanol auf Lipidmembranen

Der folgende Abschnitt folgt inhaltlich einer im Rahmen dieser Dissertation erschienenen Publikation (58).

Mit Hilfe der in (58) beschriebenen nanomechanischen Punktionsexperimente wurde untersucht, welchen Einfluss Ethanol auf die in Kapitel 0 beschriebenen elastischen Parameter (Punktionskraft, Membrandicke, Young'scher Modul, Biegemodul und Kompressionsmodul) einer fluiden Lipiddoppelschicht (DOPC) hat. Die elastischen Eigenschaften wurden aus den Punktionskurven durch Anpassung des modifizierten Hertz-Modells gewonnen. Des Weiteren wird die Dicke (~ 1 nm (32, 116–118)) einer *Wasserschicht* zwischen Glimmer und der proximalen Seite der Lipidmembran berücksichtigt. Für *Wasser-Ethanol*-Mischungen lassen sich in der Literatur keine Angaben für die Dicke einer solchen Schicht finden. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Dicke dieser Schicht durch Ethanol stark herabgesetzt werden könnte. Aus diesem Grund werden im Folgenden (bei Anwesenheit von Ethanol) zwei Fälle unterschieden. *Fall 1*: Es gibt eine 1 nm dicke Schicht. *Fall 0*: Keine derartige Schicht ist vorhanden (bevorzugtes Modell).

Die Punktionsmessungen wurden für eine Konzentrationsreihe mit ein und derselben Spitze mit einer Geschwindigkeit von 500 nm/s durchgeführt. Dass sich

die Spitze während der Messung nicht wesentlich veränderte, wurde verifiziert, indem am Ende jeder Reihe noch einmal bei der zu Beginn verwendeten Konzentration gemessen wurde.

Es war zu beobachten, dass Ethanol die Lipidmembranen empfindlich für mechanische Einwirkungen macht. Dies äußerte sich darin, dass Lipidmembranen in einigen Fällen bereits durch den Austausch des Mediums oder die Einwirkung der AFM-Spitze selbst zerstört wurden. Die Ergebnisse der besten Messungen sind unten dargestellt. Jeder Datenpunkt setzt sich aus 200 bis 400 Punktionskurven zusammen.

Vor und nach den Messungen wurden die Lipidschichten im *Tapping*-Modus abgebildet, um auszuschließen, dass sie durch die Punktionen beschädigt wurden (Abb. 4.1 A, B).

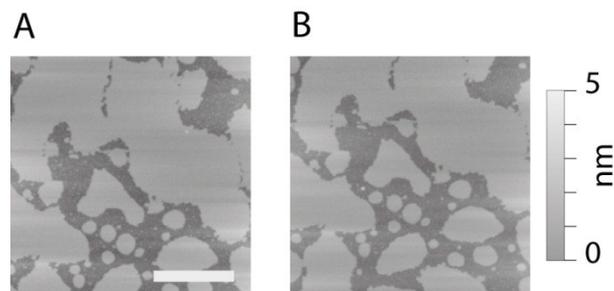


Abbildung 4.1 (A) Lipidmembran vor und (B) nach Durchführung mehrerer hundert Punktionskurven bei 20 % Ethanol über die gesamte abgebildete Fläche. Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .

4.1.1 Ergebnisse

Wie Abbildung 4.2 A zeigt, nimmt die Punktionskraft fast linear mit der Ethanolkonzentration ab. Sie fällt von 1,0 nN in reinem Wasser auf 0,3 nN in 40 %iger Ethanollösung. In Abb. 4.2 B ist der ethanolabhängige Rückgang der Dicke der Membran dargestellt. Es ergibt sich ein Rückgang der Membrandicke um 1,9 nm (*Fall 0*) beziehungsweise 2,8 nm (*Fall 1*), wenn die Ethanolkonzentration von 0 auf 40 % erhöht wird.

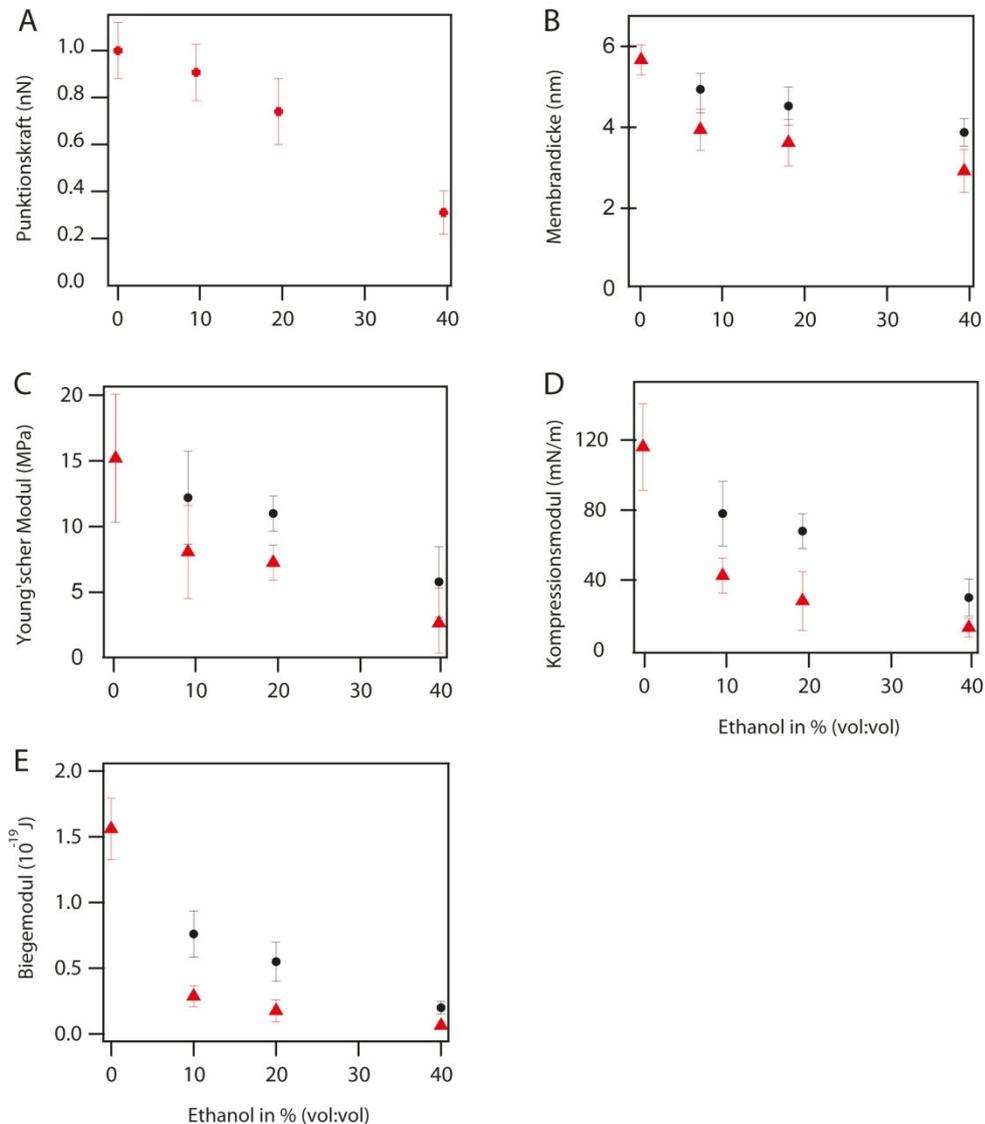


Abbildung 4.2 Ergebnisse für die nanomechanischen Messungen auf DOPC-Lipidmembranen in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration. (A) Punktionskraft. (B) Membrandicke. (C) Young'scher Modul. (D) Kompressionsmodul. (E) Biegemodul. (B) – (E) Schwarze Kreise: *Fall 0*. Rote Dreiecke: *Fall 1*.

Der Young'sche Modul wird ebenfalls in beiden Fällen verringert und zwar von 15,2 MPa in reinem Wasser auf 5,5 MPa (*Fall 0*) beziehungsweise 2,7 MPa (*Fall 1*) (Abb. 4.2 C) bei 40 % Ethanol. Ausgehend von der Dicke der Lipidmembran und dem Young'schen Modul wurden noch zwei weitere elastische Parameter bestimmt: Der Kompressionsmodul (Abb. 4.2 D) und der Biegemodul (Abb. 4.2 E). Der Kompressionsmodul geht von 116 mN/m in reinem

Wasser auf 30 mN/m (*Fall 0*) bzw. 27 mN/m (*Fall 1*) in Anwesenheit von 40 % Ethanol zurück. Ebenso fällt der Biegemodul von $1,56 \cdot 10^{-19}$ J auf $0,20 \cdot 10^{-19}$ J in *Fall 0* bzw. $0,06 \cdot 10^{-19}$ J in *Fall 1* ab.

Der teils nichtlineare Rückgang beider Werte bei Ethanolzugabe (in beiden Fällen) ist formal eine direkte Konsequenz der Ethanolabhängigkeit der Membrandicke und des Young'schen Moduls.

Tabelle 2 Zusammenfassung der elastischen Parameter.

Ethanol- konzentration	Punktionskraft (nN)	Dicke der Lipid-membran (nm)		Young'scher Modul (MPa)	
		<i>Fall 1</i>	<i>Fall 0</i>	<i>Fall 1</i>	<i>Fall 0</i>
0 %	1.00 ± 0.17	5.7 ± 0.5		15.2 ± 4.0	
10 %	0.91 ± 0.17	3.9 ± 0.7	4.7 ± 0.7	8.1 ± 2.2	12.2 ± 3.5
20 %	0.74 ± 0.20	3.6 ± 0.8	4.3 ± 0.7	7.3 ± 2.3	11.0 ± 1.3
40 %	0.31 ± 0.13	2.9 ± 0.8	3.8 ± 0.5	2.7 ± 1.6	5.5 ± 2.7

Ethanol- konzentration	Kompressionsmodul (mN/m)		Biegemodul (10^{-19} J)	
	<i>Fall 1</i>	<i>Fall 0</i>	<i>Fall 1</i>	<i>Fall 0</i>
0 %	116 ± 35		1.56 ± 0.23	
10 %	43 ± 10	78 ± 18	0.29 ± 0.08	0.76 ± 0.18
20 %	28 ± 17	68 ± 10	0.18 ± 0.08	0.55 ± 0.21
40 %	13 ± 5	30 ± 10	0.06 ± 0.03	0.20 ± 0.07

4.1.2 Diskussion

Diese Messungen stellen, nach bestem Wissen des Autors, die erste systematische Untersuchung der konzentrationsabhängigen Modifizierung der mechanischen Eigenschaften von oberflächengestützten Lipiddoppelschichten durch Ethanol dar. Um deshalb eine qualitative und quantitative Einordnung der Ergebnisse zu erleichtern, werden sie zum einen mit Messungen verglichen, die ebenfalls die Wirkung von Ethanol auf Lipidschichten zum Thema hatten, jedoch sowohl ein anderes Lipidsystem (Vesikel) als auch eine andere Technik (Mikropipetten-Aspiration) verwendeten (54, 72). Zum anderen erfolgt ein Vergleich (der Messungen in reinem Wasser) mit bereits publizierten Untersuchungen auf

oberflächengestützten Lipidmembranen. Da jede einzelne Punktionsmessung nanoskopisch, d. h. über eine nur wenige Quadrat-Nanometer große Fläche stattfindet, ist insbesondere der Vergleich mit mikroskopischen Messungen (s. o.) interessant (54, 72, 121).

Die Punktionskräfte befinden sich in einem Bereich der typisch für Messungen auf fluiden DOPC oder DOPC-reichen oberflächengestützten Lipidmembranen ist (57). Auch ist der Rückgang der für eine Punktion erforderlichen Kräfte bei steigender Ethanolkonzentration konsistent mit Messungen der Zerreißspannung von Vesikeln in Mikropipetten-Aspirations-Experimenten (72). Die beobachtete Verringerung der Membrandicke t stimmt sehr gut mit einem in (122) durch AFM-Abbildungen gefundenen Rückgang von 1,6 nm überein, wenn die Ethanolkonzentration von 0 auf 34 % erhöht wird.

In einer jüngst erschienenen Studie (123) wird der Young'sche Modul der fluiden Phase einer oberflächengestützten Lipidmembran mit 19,3 MPa angegeben, was sehr gut mit den in dieser Arbeit gemessenen 15,3 MPa (Abb. 4.2 C) übereinstimmt. Dass es Öfteren auch höhere Young'sche Module auf fluiden oberflächengestützten Lipidmembranen berichtet werden, hängt vor allem damit zusammen, dass in diesen Untersuchungen meist das ursprüngliche Hertz-Modell verwendet wird, welches die Schichtdicke nicht berücksichtigt beziehungsweise von einer unendlich dicken Lipidschicht ausgeht (56).

Dies unterstreicht den Einfluss der Schichtdicke und legt nahe, diese in Modellen (wie in der vorliegenden Arbeit geschehen) explizit zu berücksichtigen.

Der Kompressionsmodul k_A und der Biegemodul κ_c werden, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, aus dem Young'schen Modul und der Membrandicke durch Anwendung der Theorie elastischer Schalen gewonnen. Der für k_A in reinem Wasser gefundene Wert stimmt dabei sehr gut mit dem in (123) mittels *Peak-Force*-AFM auf oberflächengestützten Lipidmembranen ermittelten überein. Die mit der Ethanolkonzentration abnehmende Tendenz von sowohl Biege- wie auch Kompressionsmodul, stimmt qualitativ sehr gut mit den Ergebnissen von Mikropipetten-Aspirations-Experimenten an Vesikeln überein (54). Quantitativ wurden für den Kompressionsmodul ein wenig kleinere absolute Werte und eine schneller abfallende Tendenz des Biegemoduls auf oberflächengestützten Lipidmembranen gemessen. Berücksichtigt man jedoch, dass beide Experimente, die nanomechanische Punktion und die Mikropipetten-Aspiration, auf sowohl

vollständig verschiedenen Techniken wie auch auf unterschiedlichen Lipidsystemen beruhen, ist der Grad der qualitativen und quantitativen Übereinstimmung durchaus überraschend und kann als Bestätigung der Validität der nanomechanischen Punktion verstanden werden.

Die gewonnenen Resultate stützen folgende Modellannahme zur Wirkung von Ethanol auf Lipidschichten (Abb. 4.3):

Ausgangspunkt ist hierbei eine Lipidschicht (oberflächengestützte Lipiddoppelschicht, Lipid-Vesikel etc.), die sich in einer wässrigen Lösung befindet. Gibt man nun Ethanol zu dieser Lösung, adsorbieren die (amphiphilen) Ethanolmoleküle an die Lipid-Wasser-Grenzschicht. Ihre Oberflächendichte scheint dabei in etwa proportional zur Volumen-Konzentration zu sein (72). Dabei verdrängen sie Wassermoleküle und orientieren sich so, dass ihre Methylgruppe in den hydrophoben Bereich der Lipiddoppelschicht ragt (78), während sie gleichzeitig Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonyl- und Phosphatgruppen bilden (124). Diese Adsorption scheint nun zu einer erhöhten effektiven Kopfgruppenfläche zu führen (54) und als Folge davon zu einer verringerten Wechselwirkung der Kopfgruppen untereinander. Dies wird auch nahegelegt von den sich mit der Ethanolkonzentration verringernden Punktionskräften (Abb. 4.2 A). Betrachtet man Lipiddoppelschichten als inkompressibel, so müsste eine Vergrößerung der Fläche mit einer Verringerung der Schichtdicke einhergehen. Auch dies konnte mit Punktionsmessungen bestätigt werden (Abb. 4.2 B). Weiterhin führt der vergrößerte Abstand der Kopfgruppen dazu, dass sich der Ordnungsparameter der Kohlenwassertoffketten verringert (125), was zu einem Rückgang des Young'schen Moduls führt und mit Punktionsmessungen in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abb. 4.2 C).

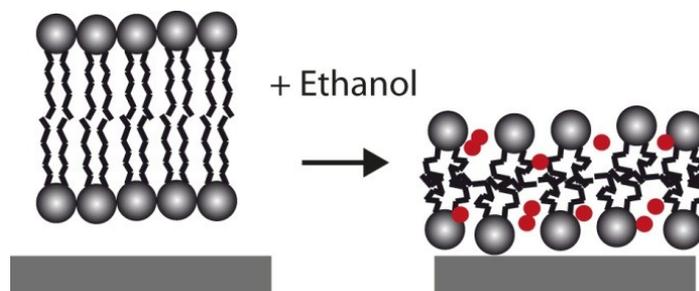


Abbildung 4.3 Modellvorstellung für die Wechselwirkung von Ethanol (rot) mit Lipidmembranen.

Um elastische Eigenschaften aus Punktionskurven gewinnen zu können, müssen diese mit einem Modell verglichen werden. Ein sehr einfaches und häufig verwendetes Modell ist das Hertz-Modell (114), welches jedoch von einer unendlich dicken Probe ausgeht. Dies bedeutet, dass der damit erhaltene Young'sche Modul bei sehr geringen Probendicken systematisch überschätzt wird. Dies wäre auch bei den nur ~ 5 nm dicken Lipidschichten der Fall. Aus diesem Grund wurde ein Modell gewählt, das das Hertz-Modell um einige Terme erweitert und der geringen Dicke der Probe (also der Lipidschicht) explizit Rechnung trägt. Dieses Modell wird im Rahmen dieser Arbeit als modifiziertes Hertz-Modell bezeichnet (115) und ist in Kapitel 0 näher beschrieben.

Obwohl es immer noch eine relativ geringe Komplexität aufweist und auch nicht explizit für die Beschreibung von Lipiddoppelschichten gedacht ist, funktioniert es sehr gut, denn die ermittelten Young'schen Module sind in sehr guter Übereinstimmung mit denen anderer Messungen (123).

Die Kenntnis der Dicke der Lösungsmittelschicht d_{LM} zwischen der Festkörperoberfläche und der „Unterseite“ der Lipiddoppelschicht ist unerlässlich, um die korrekte Membrandicke zu ermitteln (siehe Abb.). Wie oben erwähnt, kann davon ausgegangen werden, dass d_{LM} für wässrige Lösungen etwa 1 nm beträgt. Jedoch fehlen derartige Angaben für ethanolhaltige wässrige Medien. Aus diesem Grunde wurden die beiden oben beschriebenen Fälle unterschieden.

Die nichtlineare, sprunghafte Verringerung des Abstandes der ersten Deformation (wenn die Ethanolkonzentration von 0 auf 10 % (Abb. 4.4) erhöht wird) legt nahe, dass hierfür möglicherweise nicht allein die dünner werdende Lipidschicht verantwortlich ist.

Zusätzlich könnte eine Verringerung oder ein Verschwinden der Lösungsmittelschicht hierzu beitragen, was für Fall 0 sprechen würde. Dies wäre auch in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Hydratationskraft und damit die Zahl der H-Brücken zwischen zwei Siliziumoxidoberflächen in Wasser stark reduziert werden, wenn Ethanol (ab 10 %) dem Wasser beigemischt wird (126).

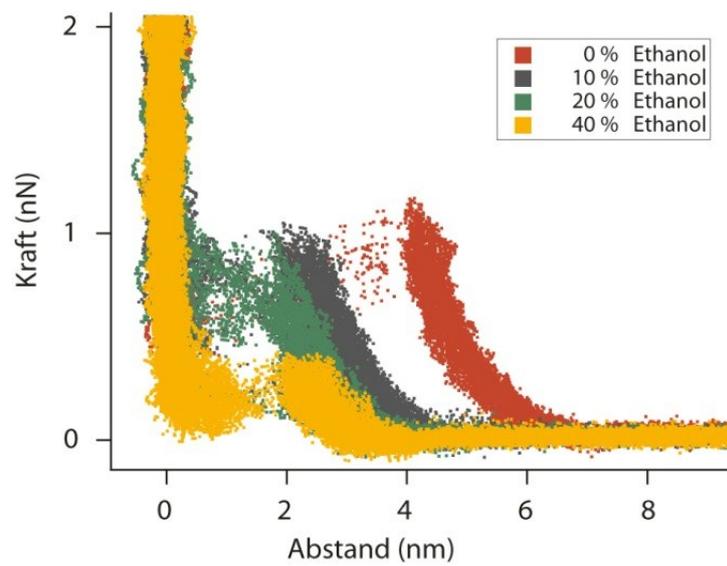


Abbildung 4.4 Überlagerung von mehr als 750 Punktionskurven, die in unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen aufgenommen wurden. Der deutliche Rückgang des Abstandes z_0 , wenn die Ethanolkonzentration von 0 % auf 10 % erhöht wird, spricht für *Fall 0* (siehe Haupttext).

4.2 Bolalipide

Bereits in Kapitel 2.2.4 wurde angesprochen, dass Bolalipide sich als Beschichtung von Elektroden und Sensoren eignen. Daher ist es erstaunlich, dass nur wenige Arbeiten oberflächengestützte Bolalipidschichten untersuchten und es, nach Wissen des Autors, keine Studie gibt, die die mechanischen Eigenschaften von oberflächengestützten Bolalipidschichten zum Thema hat.

In dieser Arbeit werden Punktionsmessungen verwendet, um die mechanische Stabilität von oberflächengestützten DOPC-Lipidmembranen mit unterschiedlichen Anteilen eines Bolalipids ($C_{20}BAS$, siehe Kapitel 2.2.4) zu charakterisieren.

Es ist dabei zu beachten, dass sich die Angaben zum Bolalipidanteil, X_{Bola} , auf das Verhältnis der Molekülzahlen beziehen und nicht auf das der Kopfgruppen. So bedeutet etwa $X_{Bola} = 50$ mol %, dass die Hälfte aller Lipide Bolalipide sind und damit etwa 66 % aller Kopfgruppen zu Bolalipiden gehören. Alle Prozentangaben in diesem Kapitel sind als Mol-Prozent-Angaben zu verstehen. Die Messungen wurden in einer Pufferlösung (20 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Hepes) bei 27°C durchgeführt. Die Herstellung der Lipide sowie der Lipidschichten erfolgte wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Die Auswertung erfolgte in der gleichen Weise wie die der Daten aus Kapitel 4.1.

4.2.1 Ergebnisse

Wie Abb. 4.5 A zeigt, nimmt die Punktionskraft mit steigendem Bolalipidanteil zu und zwar von etwa 1 nN bei $X_{Bola} = 0$ % bis fast 2 nN bei $X_{Bola} = 50$ %. In Abb. 4.5 B ist der Rückgang der Membrandicke von 5,1 nm auf 4,3 nm dargestellt. Der Young'sche Modul steigt linear von 15 MPa (0 %) auf 29 MPa (50 %) an (Abb. 4.5 C). Ausgehend vom Young'schen Modul und der Membrandicke wurden Kompressions- und Biegemodul bestimmt (siehe Gleichungen [11] und [12]). Während der Kompressionsmodul einen Anstieg von 108 mN/m auf 164 mN/m verzeichnet, verhalten sich die Werte für den Biegemodul indifferent um $1,25 \times 10^{-19}$ J (Abb 4.5 D und E). Abbildung 4.6 zeigt rasterkraftmikroskopische Aufnahmen bei verschiedenen Bolalipidanteilen. Abbildung 4.7 zeigt die entsprechenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Beide Male ist keine Phasenseparation erkennbar.

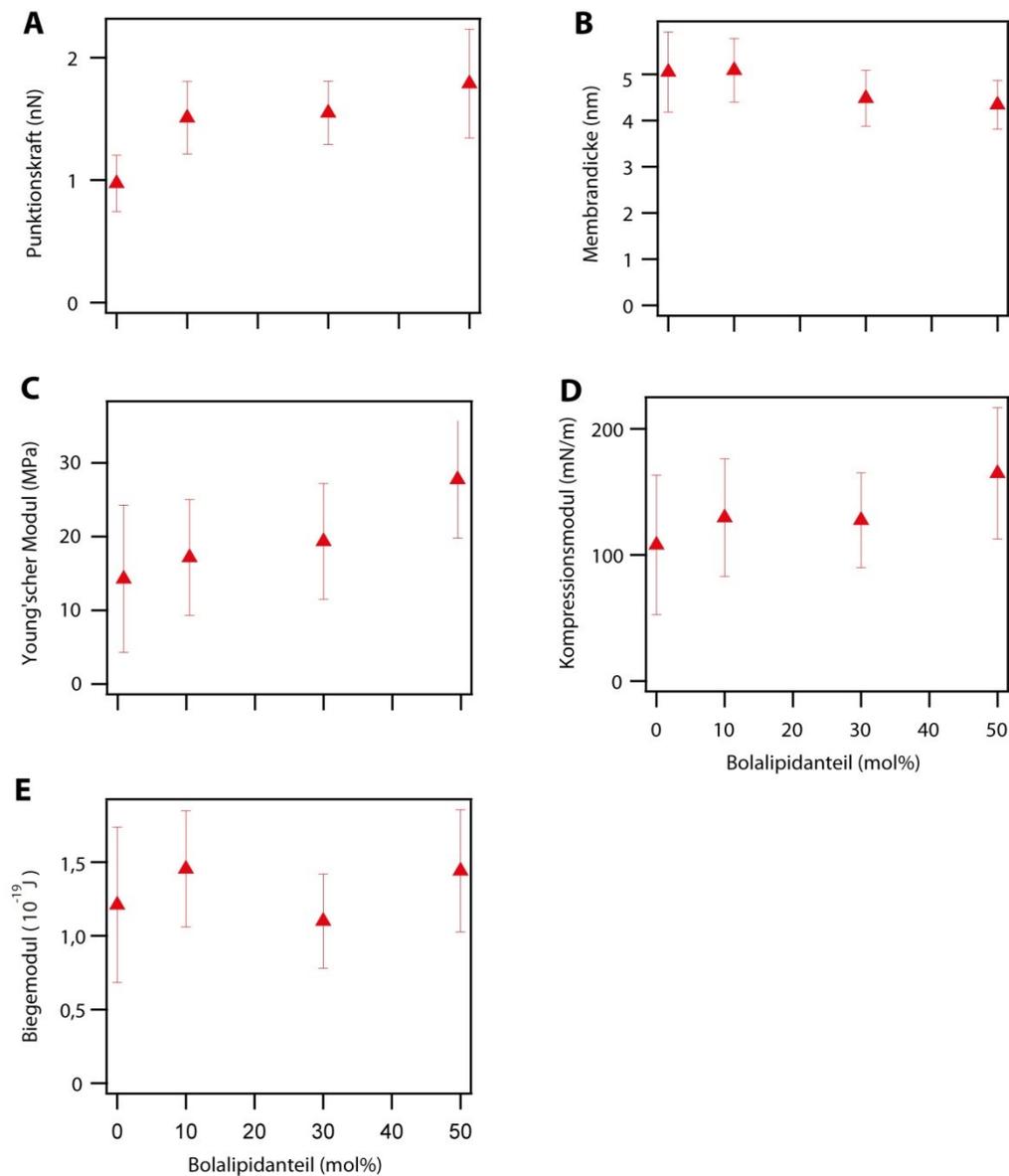


Abbildung 4.5 Ergebnisse für die nanomechanischen Messungen auf DOPC-C₂₀BAS-Lipidmembranen in Abhängigkeit der Bolalipidkonzentration. (A) Punktionskraft, (B) Membrandicke, (C) Young'scher Modul, (D) Kompressionsmodul, (E) Biegemodul.

Abbildung 4.8 zeigt die Punktionskraftverteilungen für verschiedene Bolalipidkonzentrationen. Die monomodalen Verteilungen der Punktionskräfte deuten darauf hin, dass keine Phasenseparation bei den jeweiligen Konzentrationen vorliegt.

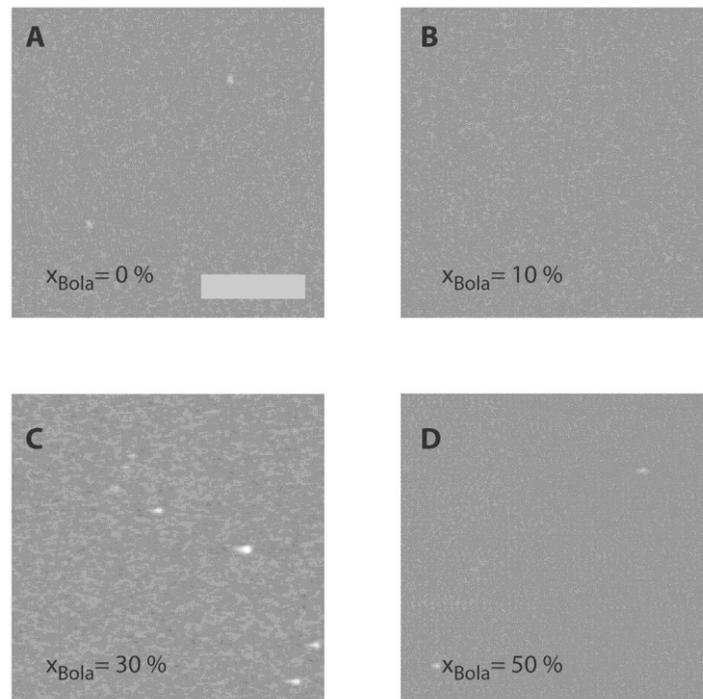


Abbildung 4.6 Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von Lipidmembranen mit unterschiedlichen Anteilen x_{Bola} an C_{20}BAS (A: 0 %, B:10 %, C: 30 %, D: 50 %). Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 0,5 μm .

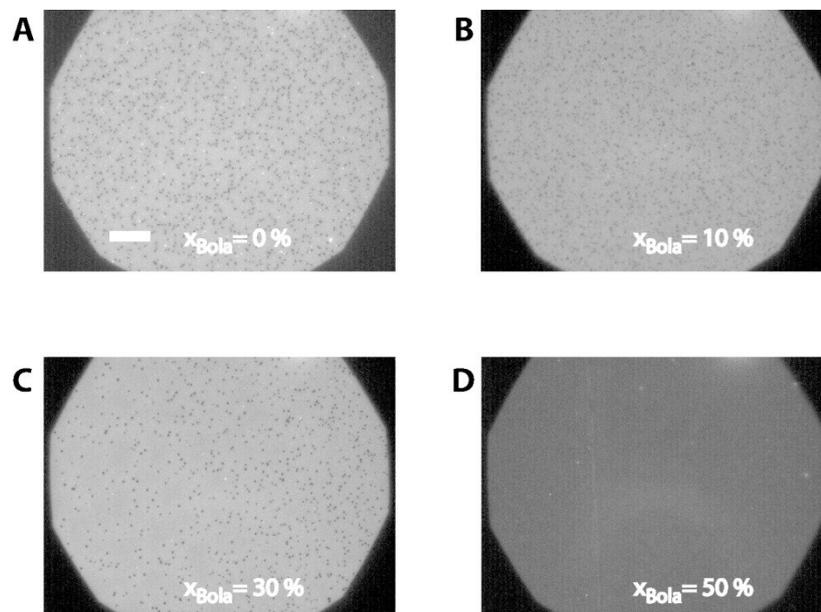


Abbildung 4.7 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidmembranen mit unterschiedlichen Anteilen x_{Bola} an C_{20}BAS (A: 0 %, B:10 %, C: 30 %, D: 50 %). Bei den zahlreichen dunkleren Bereichen handelt es sich um Stellen, an denen sich keine Lipidschicht gebildet hat. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 15 μm .

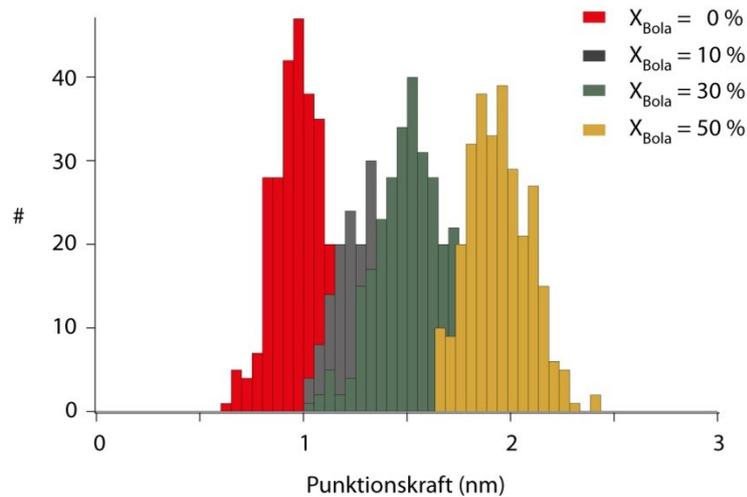


Abbildung 4.8 Verteilung der Punktionskräfte für Punktionskurven auf oberflächengestützten Lipidmembranen mit unterschiedlichen DOPC/C₂₀BAS-Verhältnissen.

4.2.2 Diskussion

Zunächst kann festgestellt werden, dass alle Werte für die reinen DOPC-Lipidschichten (0 % Bolalipide) sehr gut mit anderen Messungen (siehe Kapitel 4.1.1 und (11, 72, 123)) übereinstimmen. Die Erhöhung der Punktionskraft mit der Konzentration der Bolalipide weist auf eine mit dem Bolalipidanteil ansteigende mechanische Stabilität hin.

Der kleine, jedoch signifikante Rückgang der Membrandicke in Abhängigkeit von X_{Bola} (0,8 nm bei $X_{\text{Bola}} = 50\%$) ist nicht überraschend und lässt sich mit der deutlich kleineren hydrophoben Länge eines C₂₀BAS-Moleküls im Vergleich zur Länge zweier DOPC-Moleküle erklären. Diese Verringerung der Membrandicke ist auch in Übereinstimmung mit SAXS-Messungen an einem C₂₀BAS-POPC-System, die bei $X_{\text{Bola}}=50\%$ einen Rückgang von 0,6 nm ergaben (127).

Da die Permeabilität einer Lipidmembran für hydrophobe Substanzen direkt proportional zu ihrer Dicke ist (18), ist auch ein leichter Anstieg der hydrophoben Permeabilität zu erwarten.

NMR- und SAXS-Messungen lieferten Indizien dafür, dass sich in einer POPC-C₂₀BAS bei Raumtemperatur eine Mikrophasenseparation in eine bolalipid-reiche und eine bolalipid-arme Phase ergibt (128), die mit den unterschiedlichen hydrophoben Längen der verwendeten Lipide begründet wird. Die Autoren geben als minimalen Domänenradius einen Wert von 50 nm an.

Nun konnte in im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Messungen auf vier Größenordnungen keine Phasenseparation gefunden werden: Auf der Größenordnung von 10 μm zeigen Fluoreszenzmessungen homogene Lipidschichten, die man so nicht in einer phasenseparierten Lipidmembran erwarten würde, da sich die fluoreszierenden Lipide unterschiedlich stark in den verschiedenen Phasen anreichern.

Auf der Größenordnung von 1 μm zeigen rasterkraftmikroskopische Aufnahmen keine unterschiedlich hohen Bereiche wie man sie bei einer Phasenseparation erwarten würde.

Schließlich ergibt die Analyse der Punktionskraft-Histogramme monomodale Verteilungen. Im Falle einer Phasenseparation würden beide Phasen vermutlich unterschiedliche Punktionskraftverteilungen erzeugen. Aus diesem Grund müsste ein derartiges Histogramm bimodale Züge tragen, was jedoch bei allen getesteten Konzentrationen nicht der Fall ist. Eine derartige Bimodalität ergibt sich beispielsweise, wenn eine Punktionskurven zeilenweise über einem phasenseparierten Bereich durchgeführt werden (siehe Abb. 7.1, 7.2, 7.3). Die obere Grenze für die Radien eventuell vorhandener Nanodomänen kann also mit dem Spitzenradius und damit 10 nm abgeschätzt werden¹⁴.

Möglicherweise ergibt sich jedoch, im Gegensatz zu einer POPC-C₂₀BAS-Mischung (s.o.), bei einer DOPC-C₂₀BAS-Lipidmembran (wie in dieser Doktorarbeit verwendet) auch keine Phasenseparation im gemessenen Temperaturbereich. Grund dafür könnte die erhöhte Flexibilität des DOPC auf Grund der beiden ungesättigten Fettsäureketten sein, die es den Lipiden ermöglicht, die hydrophobe Fehlanpassung auf Grund der unterschiedlichen Längen sehr gering zu halten.

Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass sich die Lipidschicht, in der fluiden Phase befindet. Dafür spricht, dass DOPC und C₂₀BAS Hauptübergangstemperaturen von -20°C und +17°C besitzen und damit deutlich unter der Temperatur des Experiments (27°C) liegen. Dies ist insbesondere für biotechnologische Anwendungen (in denen gegebenenfalls auch Membranproteine in die Membran eingebaut werden sollen) von größter Bedeutung.

Die Zunahme des Young'schen Moduls weist auf eine erhöhte Robustheit gegen vertikale Deformation hin. Die schwache aber signifikante Zunahme des

¹⁴ Es handelt sich hierbei um eine sehr konservative Abschätzung, da die Projektionsfläche der AFM-Spitze auf die Lipidschicht zu jedem Zeitpunkt einen Radius von weniger als 10 nm hat.

Flächenkompressionsmoduls wurde auch schon mit anderen Bolalipiden in Molekulardynamik-Simulationen gezeigt (129).

Das indifferente Verhalten des Biegemoduls resultiert aus den sich gegenseitig kompensierenden Effekten der geringer werdenden Membrandicke einerseits und des zunehmenden Young'schen Moduls andererseits. Da die Membrandicke kubisch in die Berechnung des Biegemoduls eingeht, können bereits kleine Unsicherheiten bei der Bestimmung der Membrandicke zu großen Fluktuationen des Biegemoduls führen. Daher kann auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht abschließend eingeschätzt werden, ob der Biegemodul konstant bleibt oder eine leicht zunehmende oder abnehmende Tendenz mit der Bolalipidkonzentration aufweist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Beimengungen von Bolalipiden zu oberflächengestützten Lipidmembranen das Potential haben, deren Robustheit und Stabilität in sowohl mechanisch als auch chemisch und thermisch widrigen Umgebungen zu verbessern.

Klar scheint zu sein, dass der Hauptbeitrag zur chemischen und thermischen Stabilität aus der Verwendung von Ether- anstatt Esterbindungen erwächst.

Dagegen ist zu erwarten, dass die Modifizierung der mechanischen Membraneigenschaften ursächlich mit dem strukturellen Charakteristikum der Bolalipide – der durchgehenden Kohlenhydratkette – in Verbindung steht. Um den tatsächlichen Anteil dieser durchgehenden Kette am Stabilitätsgewinn der Membran zu quantifizieren müssen zusätzliche Experimente gemacht werden.

Ein zu diesem Zweck hervorragend geeignetes Punctionsexperiment wäre der direkte Vergleich der Wirkung von Bolalipid-Beimengungen (zum Beispiel C₂₀BAS) mit Beimengungen des entsprechenden monopolaren Lipids (in diesem Fall Di-Ether-C₁₀PC), da dadurch der Einfluss der durchgehenden Kohlenhydratkette isoliert untersucht werden könnte.

Messungen mit diversen Methoden haben gezeigt, dass C₂₀BAS-Bolalipide unter den meisten Bedingungen hauptsächlich in *Trans*-Form vorliegen. Dennoch kann darüber spekuliert werden, ob es unter der Einwirkung einer vertikalen Kraft eventuell derart zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts kommt, dass die betreffenden Bolalipide von der *Trans*- in die *U*-Form wechseln und auf diese Weise die laterale Kohäsion der Lipide erhöhen.

Schließlich wurde mit Untersuchungen auf vier Größenordnungen gezeigt, dass unter den im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Bedingungen entweder

keine Phasenseparation auftritt oder die Domänenradien nicht größer als 10 nm sind.

4.3 Alpha-Synuclein

Nachdem nun gezeigt wurde, dass sich die Punktionsmethode hervorragend eignet, um Einflüsse des Lösungsmittels und der Membranzusammensetzung auf die Stabilität von Lipidmembranen zu untersuchen, soll nun im Folgenden demonstriert werden, dass sich damit auch Protein-Lipid-Wechselwirkungen näher untersuchen lassen. Hierzu wurde das Protein Alpha-Synuclein gewählt, welches die Eigenschaft hat, an Lipidmembranen zu binden (siehe Kapitel 2.8) und daher potentiell in der Lage ist, Membraneigenschaften zu modifizieren.

Es wurden oberflächengestützte anionische Lipidmembranen bestehend aus 80 % DOPC und 20 % DOPS hergestellt (siehe Kapitel 3.2). Die Experimente wurden in einem Puffer (10 oder 20 mM NaCl, 2 mM Hepes, pH 7,5) bei 27°C durchgeführt, der entweder Alpha-Synuclein in verschiedener Konzentrationen enthielt („ASyn(0,1 μM)“, „ASyn(0,3 μM)“) oder frei von Alpha-Synuclein war („ASyn(-)“).

4.3.1 Ergebnisse

Abbildung 4.9 zeigt die Ergebnisse eines Vorversuchs (Puffer: 20 mM NaCl, 2 mM Hepes, 30°C, $v = 500 \text{ nm/s}$) für die Wechselwirkung von Alpha-Synuclein mit Lipidmembranen. Deutlich erkennbar wird, dass die Punktionskraft signifikant ansteigt und gleichzeitig die Membrandicke nahezu konstant bleibt. Des Weiteren ist der Anstieg der Punktionskraft reversibel und kann rückgängig gemacht werden, indem mit proteinfreiem Puffer gespült wird.

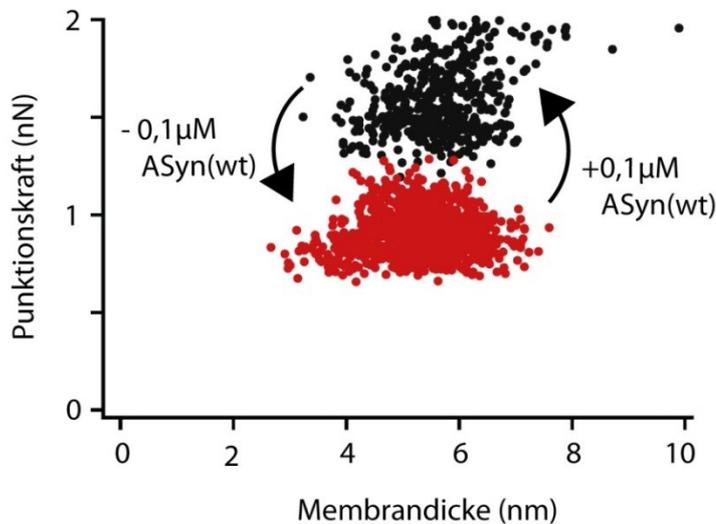


Abbildung 4.9 Reversibler Effekt von Alpha-Synuclein auf eine DOPC/DOPS-Membran.

Ausgehend hiervon wurden kraftladungsrateabhängige Messungen durchgeführt, um die beobachtete stabilisierende Wirkung genauer zu quantifizieren (Puffer: 10 mM NaCl, 2 mM Hepes, pH 7,5)

Wie Abbildung 4.10 zeigt, ergibt sich, wie erwartet, ein Anstieg der Punktionskraft für alle drei verwendeten Geschwindigkeiten, wenn dem Puffer 0,1 μM Alpha-Synuclein zugesetzt wird. Bei 50 nm/s steigt die Punktionskraft von 1,9 auf 2,2 nN, bei 500 nm/s erhöht sie sich von 2,6 auf 3,2 nN und bei 5000 nm/s ergibt sich ein Anstieg von 3,0 auf 3,4 nN. Der Effekt von Alpha-Synuclein ist dabei reversibel (nicht dargestellt).

Zusätzlich wurden, mit Hilfe eines kinetischen Modells von Butt (57, 130), die intrinsischen Aktivierungsenergien für die Porenbildung berechnet (siehe Kapitel 0). Aus der Anpassung von Gleichung [37] an die experimentellen Daten ergeben sich mit Gleichung [38] die Aktivierungsenergien E_a zu 34,2 kJ/mol (55×10^{-21} J) bei Abwesenheit und 38,7 kJ/mol (62×10^{-21} J) bei Anwesenheit von Alpha-Synuclein. Die Federkonstante wurde zu 0,12 nN/nm bestimmt und für A wurde 4 kHz gewählt, dies entspricht etwa der Resonanzfrequenz der Blattfeder in wässrigen Lösungen.

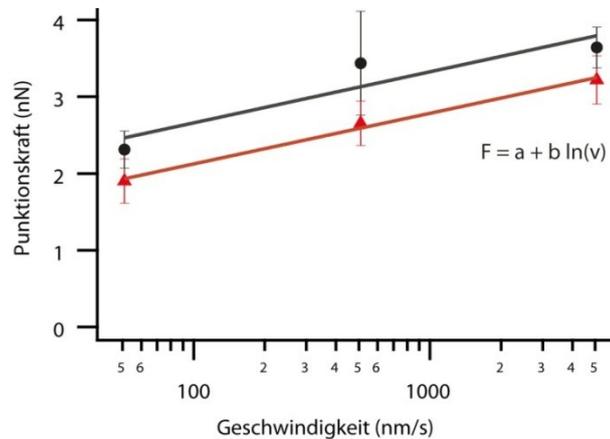


Abbildung 4.10 Der Einfluss von Alpha-Synuclein auf die Stabilität von Lipidmembranen. Klar ersichtlich wird die logarithmische Abhängigkeit der Punktkraft von der Geschwindigkeit. Die Punktkräfte in Gegenwart von Alpha-Synuclein (0,1 µM, schwarze Kreise) sind dabei immer höher als in Puffer ohne Alpha-Synuclein (rote Dreiecke).

Eine Erhöhung der Alpha-Synuclein Konzentration auf 0,3 µM (Asyn(0,3 µM)) führte zu einer Zerstörung der Integrität der Membran, wie in Abb. 4.11 dargestellt.

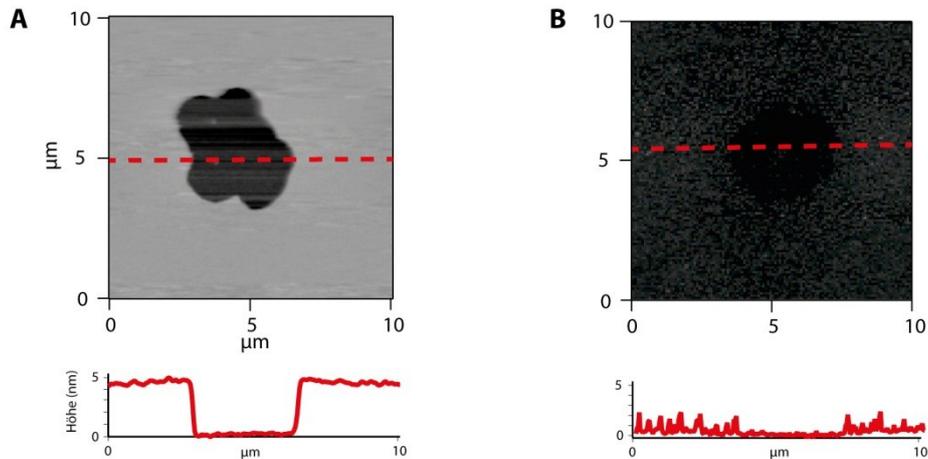


Abbildung 4.11 Vergleich der Lipidmembran vor (A) und nach (B) Zugabe von 0,3 µM Alpha-Synuclein.

Ausgehend von der als physiologisch angenommenen Wechselwirkung zwischen den Alpha-Synuclein-Monomeren und Lipidmembranen soll zukünftig auch der Einfluss von oligomeren Alpha-Synuclein-Aggregaten auf Lipidmembranen mit Punktmessungen untersucht werden.

Tabelle 3 Parameter für den Fit und intrinsische Aktivierungsenergien

	a (nm)	Δa (nm)	b (nm)	Δb (nm)	$E_{a, F=0}$ (k _B T)	$E_{a, F=0}$ (kJ/mol)
Asyn(-)	5,94	0,28	0,237	0,019	13,7	34,2
Asyn (0,1 μ M)	6,42	1,39	0,239	0,095	15,5	38,7

Oft sind Oligomere, die mit publizierten Protokollen hergestellt wurden, jedoch unzureichend charakterisiert. Zudem scheinen veröffentlichte Messungen nicht selten artefaktbehaftet zu sein. Aus diesem Grund wurde in dieser Dissertation (in Form zweier betreuter Arbeiten) ein Verfahren entwickelt, das es erlaubt, Aggregationsansätze verschiedener Protokolle multimethodisch zu charakterisieren (2, 3).

Im Rahmen dieser Arbeiten wurde zunächst die Zuverlässigkeit der verwendeten Methoden verifiziert, um anschließend Aggregationsprotokolle zu testen. Details hierzu finden sich in (2, 3). Wesentliches Ergebnis dieser Arbeiten ist, dass in den verwendeten Aggregationsansätzen *keine* Aggregate gefunden wurden.

4.3.2 Diskussion

Abbildungen 4.9 und 4.10 zeigen beide einen signifikanten Anstieg der Punktionskräfte bei Anwesenheit von 0,1 μ M Alpha-Synuclein. Dies deutet auf eine Erhöhung der Membranstabilität durch die Proteine hin. Die zu 34,2 kJ/mol (Asyn(-)) bzw. 38,7 kJ/mol (Asyn(0,1 μ M)) bestimmten Aktivierungsenergien stimmen sehr gut mit den effektiven Aktivierungsenergien überein, die aus Diffusionsexperimenten bestimmt wurden (20 – 50 kJ/mol) (131, 132). Sie sprechen für eine leicht reduzierte Durchlässigkeit für hydrophile Substanzen, wenn Alpha-Synuclein anwesend ist. Überraschend war jedoch, dass die Membran schon ab 0,3 μ M begann, sich irreversibel aufzulösen (Abb. 4.11). Dies widerspricht Messungen an Vesikeln, bei denen teils wesentlich höhere Alpha-Synuclein-Konzentrationen verwendet wurden, deckt sich jedoch mit Beobachtungen an oberflächengestützten anionischen Lipidmembranen (133).

Die entwickelte multimethodische Herangehensweise für die Charakterisierung von Aggregationsansätzen stellt ein vielversprechendes Vorgehen für zukünftige Charakterisierungen dar, weil die einzelnen zum Einsatz kommenden Methoden so aufeinander abgestimmt sind, dass die Schwächen der einen Methode durch die Stärken der anderen kompensiert werden.

Dass sich trotz der erfolgten und erfolgreichen Verifizierung der Methode ein negativer Befund bei der Charakterisierung der untersuchten Aggregationsprotokolle ergab, sollte Anlass dazu geben, bisher verwendete Methoden der *in-vitro*-Aggregation von amyloiden Proteinen und deren Charakterisierung in Frage zu stellen beziehungsweise die physiologische Relevanz der verwendeten Aggregationsansätze neu zu überdenken.

5 Einzellipidextraktion (ELEX)

Die Stabilität der Verankerung und damit die Affinität einzelner Lipide für bestimmte Lipidmembranen spielt bei so unterschiedlichen Prozessen wie der Fusion zweier Vesikel (59), der Funktion peripherer Proteine (134) oder der Proteinsortierung im Golgi-Apparat (135) eine bedeutende Rolle. So ist zum Beispiel die Präferenz von Cholesterol für geordnete Membranen mit hoher Cholesterolkonzentration wichtig für den passiven Transport von Cholesterol vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat in die Zellmembran (136, 137). Des Weiteren ist derzeit in vielen Fällen noch nicht vollständig verstanden, welche Triebkraft dafür sorgt, dass sich Lipide innerhalb von Zellen an den Orten anreichern an denen sie benötigt werden (136). Die Kenntnis der bei diesen Prozessen involvierten Kräfte und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wie zum Beispiel der Membranzusammensetzung ist daher von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur kraftspektroskopischen Extraktion einzelner Lipide aus oberflächengestützten Lipidmembranen etabliert und anhand mehrerer Systeme getestet. Die Extraktion einzelner Cholesterolmoleküle aus phasenseparierten Lipidmembranen stellt, nach bestem Wissen des Autors, die erste Untersuchung dieser Art überhaupt dar.

Um Extraktionsexperimente mit einzelnen Lipiden durchzuführen, wird, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, ein Lipidmolekül kovalent mit einer AFM-Spitze verbunden und dann mit einer oberflächengestützten Lipidschicht in Kontakt gebracht. Hat sich das mit AFM-Spitze verbundene Lipidmolekül während der Kontaktzeit in die Lipidmembran eingebaut, so kann die Kraft, die nötig ist, um das Lipidmolekül wieder aus der Lipidschicht herauszuziehen, gemessen werden. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass es auch mit der so funktionalisierten AFM-Spitze weiterhin möglich ist, die Lipidmembran abzubilden. Konkret bedeutet dies, dass unmittelbar vor der Durchführung der kraftspektrometrischen Messungen ein Abbild der Oberfläche erzeugt wird und es dadurch gestattet wird, den Ort genau festzulegen, an dem die Messungen stattfinden sollen. Gerade im Falle phasenseparierter Lipidmembranen, wo L_D - und L_O -Phasen unmittelbar nebeneinander liegen, ist diese Möglichkeit der Unterscheidung essentiell (siehe Kapitel 5.3 und Abbildung 5.6).

Diese Positioniergenauigkeit unterscheidet dann auch das AFM von den meisten anderen Methoden, die grundsätzlich auch in der Lage sind, Lipid-Lipidmembran-Wechselwirkungen zu messen (68, 89, 91, 138, 139).

Der Aufbau sowie das Mess- und Auswerteverfahren wurden bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.3 und 3.3) und alle oberflächengestützten Lipidmembranen wurden wie in Kapitel 3.2.2 erläutert hergestellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dreier unterschiedlicher ELEX-Experimente beschrieben und diskutiert.

Im ersten Experiment wurden POPE-Moleküle aus POPC-Membranen extrahiert. Es diente insbesondere auch dazu, die Reproduzierbarkeit von ELEX-Experimenten zu demonstrieren. Im zweiten Experiment wurde DSPE an die AFM-Spitze angebunden und aus einer DOPC-Membran bei drei unterschiedlichen Geschwindigkeiten extrahiert.

Schließlich wurde im dritten Experiment auf eine komplexere Lipidmembran (phasenseparierte PSC221-Membran) übergegangen und zudem, anstatt eines Phospholipids nun ein Cholesterolemolekül kovalent an die AFM-Spitze angebunden.

Das allgemeine Vorgehen zur Bestimmung der thermischen Aktivierungsparameter ist dabei Folgendes:

Zunächst werden die (normierten) Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen $p(F)$ in die Verteilung der von der Extraktionskraft F abhängigen Lebensdauern $\tau(F)$ umgewandelt. An diese kann nun ein Modell für $\tau(F)$ angepasst werden, aus dem sich dann die thermischen Aktivierungsparameter bestimmen lassen. Für Details siehe Kapitel 2.4.

Zuerst wurde immer versucht, die Verteilung mit dem *Bell*-Modell anzupassen. In Kapitel 5.3, bei der Extraktion von Cholesterolemolekülen, gelang dies nicht und die Annahme eines einfachen Dreieck-Potentials musste verworfen werden. Hier wurde die Verteilung einmal abschnittsweise mit dem *Bell*-Modell zum einmal mit dem *Harm*- und *Kub*-Modell (siehe Kapitel 2.4) gefittet.

5.1 POPE aus POPC

Die Funktionalisierung der AFM-Spitze folgt Kapitel 3.3 wobei die verwendeten PEG-Moleküle ein Molekulargewicht von 6 kDa hatten. Für die Auswertung wurden eine Konturlänge L von 40 nm und eine Persistenzlänge L_p von 0,3

verwendet. Die oberflächengestützte Lipidmembran bestand aus POPC und wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben hergestellt. Die Experimente wurden in Puffer (50 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7,2) bei 27°C und mit einer Ziehgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{m/s}$ durchgeführt.

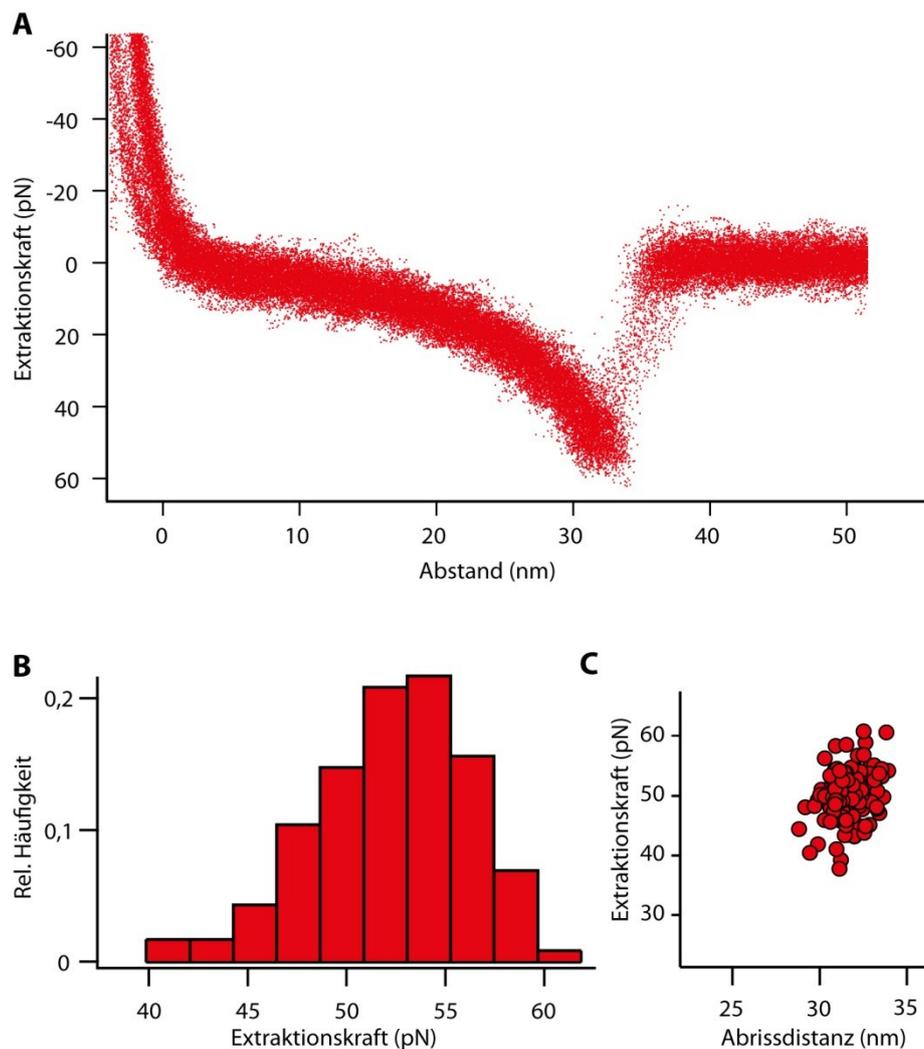


Abbildung 5.1 (A) Überlagerung von etwa 100 Extraktionskurven von POPE aus einer POPC-Lipidmembran. (B) Verteilung der Extraktionskräfte. (C) Streudiagramm der Extraktionskräfte über dem Ort der Abrisse.

Abbildung 5.1 A zeigt die Überlagerung von etwa 100 Extraktionskurven. Die Kräfte sind eng um 50 pN herum verteilt (Abb. 5.1 B) und die Abrissdistanzen liegen bei ca. 32 nm (Abb. 5.1 C). In Abbildung 5.2 sind die mittleren Extraktionskräfte dreier voneinander unabhängiger Experimente (jeweils unterschiedliche POPC-Membranen und POPE-Moleküle) nebeneinander gestellt.

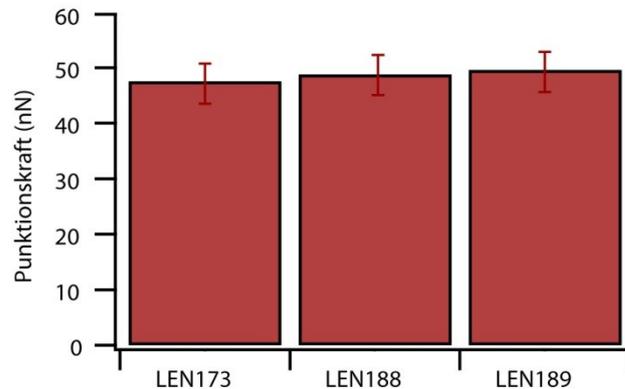


Abbildung 5.2 Vergleich der mittleren Extraktionskräfte von drei unabhängigen Experimenten. Es wurde jeweils ein POPE-Molekül aus POPC-Lipidmembranen extrahiert. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

Anwendung von Gleichung [15] führt auf die kraftabhängige Lebensdauerverteilung, die in Abbildung 5.3 dargestellt ist. Die Gerade entspricht dem angepassten *Bell*-Modell mit $x_\beta = 1,24$ nm und $\tau_{\text{Bell}} = 4,8 \cdot 10^3$ s.

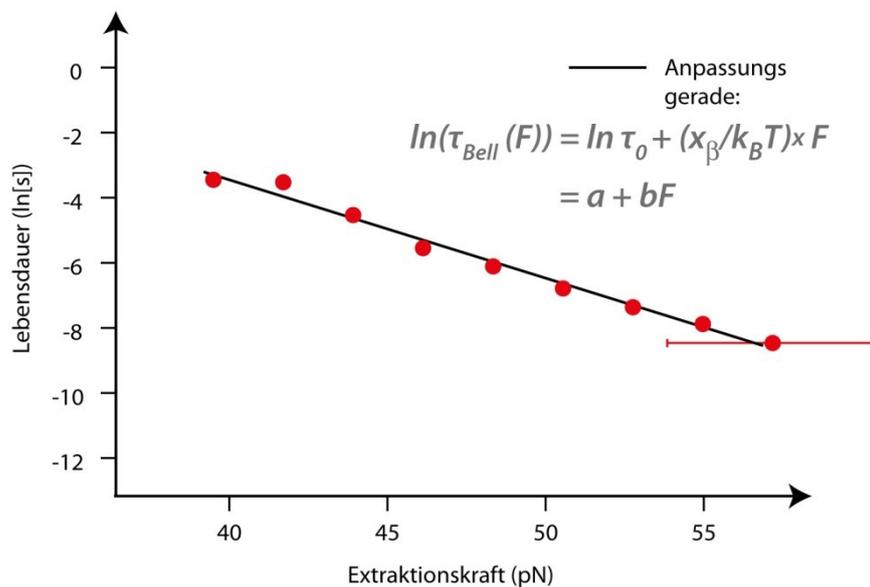


Abbildung 5.3 Extraktion von POPE aus POPC-Lipidmembran. Lebensdauern gegen die Extraktionskraft aufgetragen (rote Kreise). Die Gerade entspricht dem angepassten *Bell*-Modell mit den thermischen Aktivierungsparametern $x_\beta = 1,24$ nm und $\tau_{\text{Bell}} = 4,8 \cdot 10^3$ s. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

5.2 DSPE aus DOPC

Für die Ankopplung eines DSPE-Moleküls an die AFM-Spitze wurde wieder das in Kapitel 3.3 aufgeführte Protokoll verwendet. Die PEG-Moleküle hatten ein Molekulargewicht von ungefähr 4 kDa. Für die Auswertung wurden eine Konturlänge L von 27 nm und eine Persistenzlänge L_p von 0,3 nm verwendet. Die oberflächengestützte Lipidmembran bestand aus DOPC und wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben hergestellt. Die Experimente wurden in Puffer (50 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,2) bei 27°C und bei drei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten (0,02, 0,5 und 5 $\mu\text{m/s}$) durchgeführt. Abbildung 5.4 zeigt die Verteilung der Extraktionskräfte für die drei unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

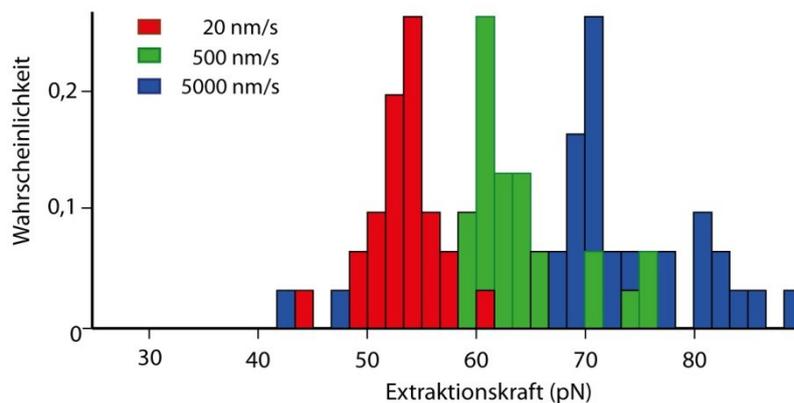


Abbildung 5.4 Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen für die Extraktion von DSPE aus einer DOPC-Lipidmembran bei verschiedenen Geschwindigkeiten.

Nach Umformung dieser Kraftverteilungen mit Gleichung [15] (Methode A) in die Lebensdauern, erhält man die Verteilung, die in Abbildung 5.5 dargestellt ist (rote Kreise). Eine Anpassung des *Bell*-Modells ergibt dann folgende Werte für die thermischen Aktivierungsparameter: $x_\beta = 1,0$ nm, $\tau_{0,\text{Bell}} = 6,0 \cdot 10^3$ s (rote Gerade).

Verwendet man Gleichung [17] (Methode B) um die kraftabhängigen Lebensdauern $\tau(\langle F \rangle)$ zu berechnen (schwarze Quadrate in Abb. 5.5), erhält man für die Parameter des angepassten *Bell*-Modells (schwarz-gestrichelte Gerade) $x_\beta = 1,0$ nm und $\tau_{0,\text{Bell}} = 5,3 \cdot 10^3$ s. Eine Negativkontrolle wurde durchgeführt und ergab in weniger als einem Prozent Streckkurven, die als Extraktionskurven (in einem Experiment mit angebundenem Lipid) gewertet worden wären.

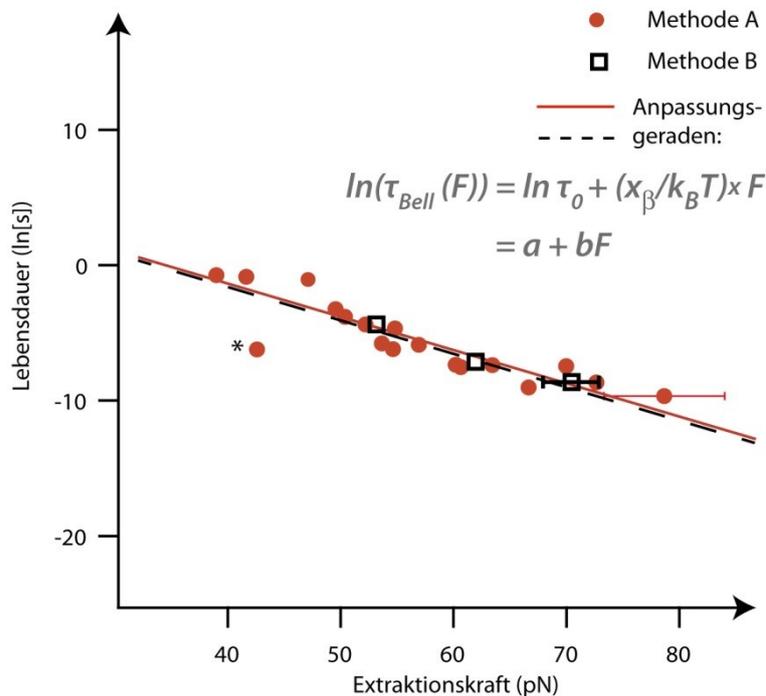


Abbildung 5.5 Extraktion von DSPE aus einer DOPC-Lipidmembran. Die Lebensdauern sind gegen die Extraktionskraft aufgetragen (Methode A: rote Kreise, Methode B: schwarze Quadrate). Die rote Gerade entspricht dem angepassten *Bell*-Modell (Methode A) mit den thermischen Aktivierungsparametern $x_\beta = 1,0$ nm und $\tau_{Bell}(0) = 6,0 \cdot 10^3$ s. Die gestrichelte schwarze Gerade entspricht dem angepassten *Bell*-Modell (Methode B) mit den thermischen Aktivierungsparametern $x_\beta = 1,0$ nm und $\tau_{Bell}(0) = 5,3 \cdot 10^3$ s. Der mit * gekennzeichnete Datenpunkt wurde als Ausreißer behandelt und folglich nicht für den Fit berücksichtigt. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

5.3 Cholesterol aus PSC221

Die Experimente wurden in einem Puffer (50 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7,2) mit einem pH-Wert von 7,2 und einer Temperatur von 27°C durchgeführt. Für die Auswertung wurden eine Konturlänge L von 27 nm und eine Persistenzlänge L_p von 0,3 nm verwendet. Die oberflächengestützte Lipidmembran setzte sich aus einer ternären Lipidmischung (PSC221) zusammen und wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben hergestellt. Auf Grund ihrer Zusammensetzung und der verwendeten Temperatur bildeten sich zwei Phasen aus: eine flüssig-geordnete (L_O -Phase) und eine flüssig-ungeordnete Phase (L_D -Phase) (siehe Abb. 5.6).

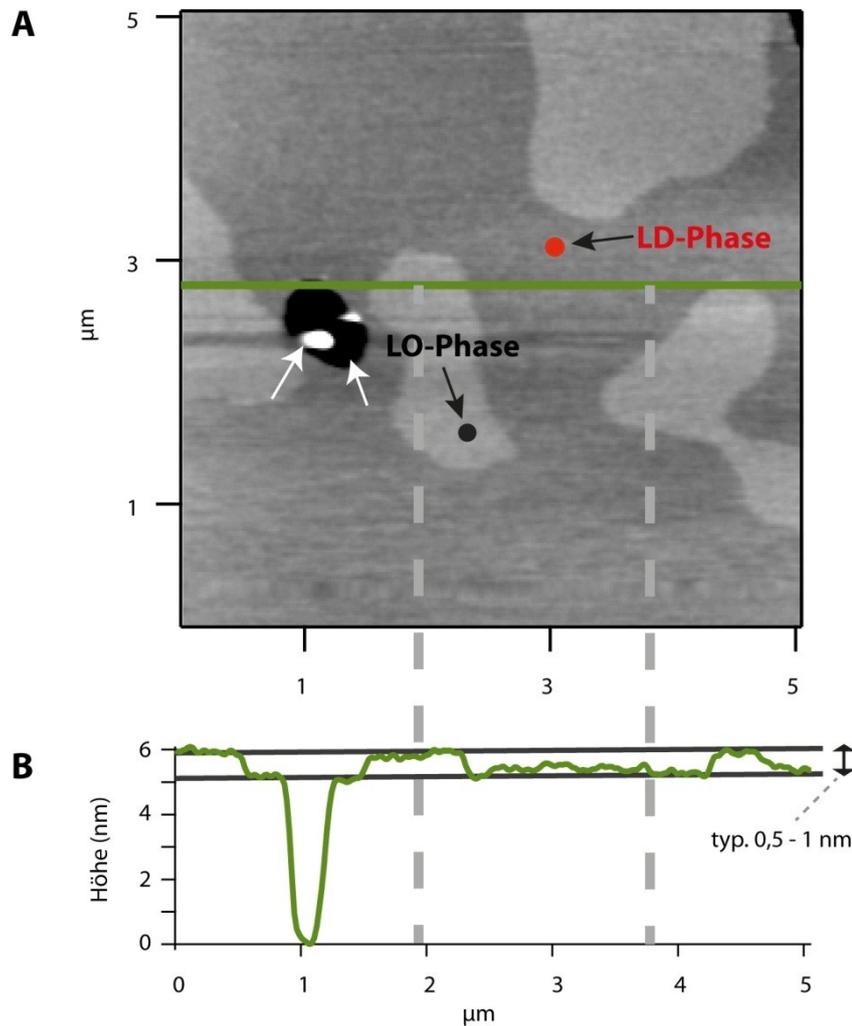


Abbildung 5.6 (A) *Tapping-Modus-Abbildung* einer PSC221-Membran. Die dunklen Bereiche entsprechen der L_D -Phase, die helleren der L_O -Phase (schwarze Pfeile). Die weißen Pfeile deuten auf eine nicht von einer Lipidmembran bedeckte Stelle (schwarzer Bereich) und auf ein nicht fusioniertes Lipidvesikel (weiße Stelle). (B) Profil entlang der in (A) eingezeichneten Linie.

Ein Cholesterolemolekül wurde über ein PEG-Molekül, kovalent an eine AFM-Spitze angebunden. Die Messung wurde im Wesentlichen so durchgeführt wie in Kapitel 2.3.3 dargestellt. Zusätzlich wurde die Lipidmembran jedoch vor jeder Messung abgebildet, um festzulegen, an welchem Ort (L_O - oder L_D -Phase) die Kraftmessungen durchgeführt werden sollen. Nach typischerweise 300 Extraktionskurven auf einer Phase (von denen ungefähr 20-30 % relevante Extraktionsereignisse zeigten) wurde die Membran noch einmal abgebildet, um sicher zu stellen, dass alle Extraktionskurven auf demselben Bereich (derselben

Phase) aufgenommen worden waren. Um ein breites Spektrum an Kraftladungsraten zu erzeugen, wurde mit drei verschiedenen Extraktionsgeschwindigkeiten (50, 500, 5000 nm/s) auf jeder der Phasen (L_D oder L_O) gemessen. Einige der resultierenden Extraktionskraftverteilungen sind in Abbildung 5.7 dargestellt.

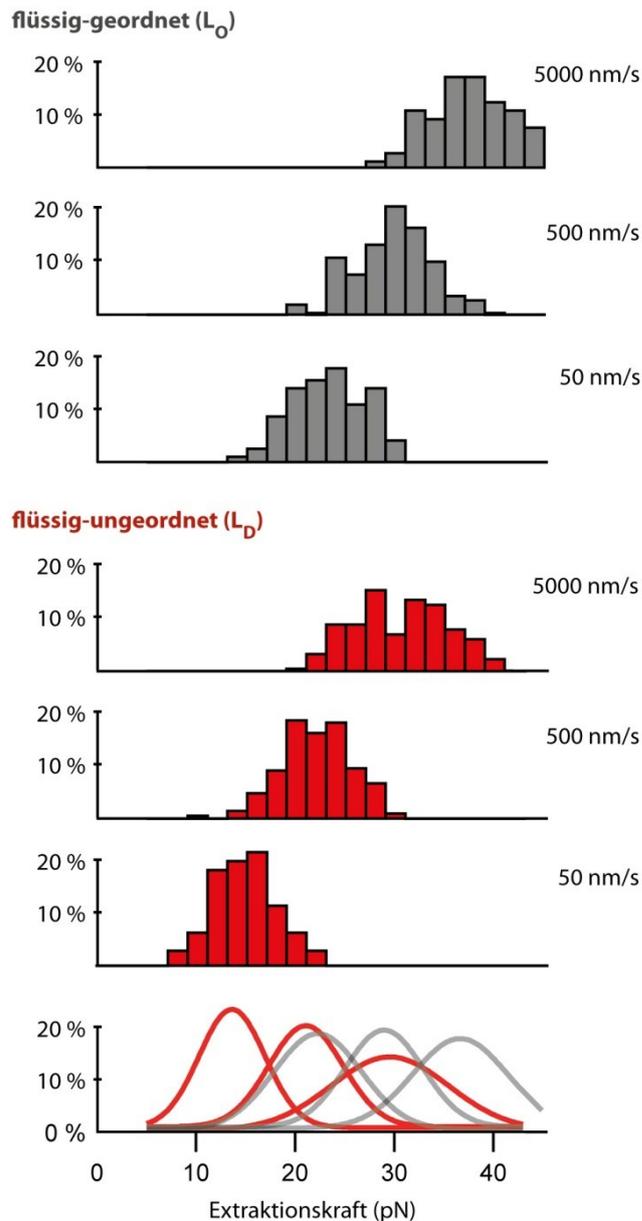


Abbildung 5.7 Kraftverteilungen für die Extraktion von Cholesterol aus flüssig-geordneten (L_O -) Phasen (grau) und flüssig-ungeordneten (L_D -) Phasen (rot). Die L_O -Phasen sind cholesterol-reich, die L_D -Phasen sind cholesterol-arm.

Kontrollmessungen waren konsistent und reproduzierten die gemessenen Werte. Negativkontrollen ergaben keine signifikante Anzahl an Streckkurven, die die Kriterien für die Aufnahme in die Statistik der Extraktionskurven erfüllt hätten (vgl. Kap. 3.3.4). Wie in Kapitel 3.3.4 erwähnt, wurde die Empfindlichkeit des Messaufbaus mit 10 pN abgeschätzt. Messpunkte unterhalb dieses Werts werden bei der Anpassung der Modelle an die Lebensdauerverteilungen nicht berücksichtigt.

Die Berechnung von $\ln\tau(F)$ nach Methode A ergibt die in Abbildung 5.8 dargestellten Verteilungen für Messungen auf der L_O - und der L_D -Phase (schwarze und rote Kreise). Es wird ersichtlich, dass die beiden Verteilungen eine Krümmung aufweisen und deshalb nicht mit jeweils einer einzigen Geraden anpassbar sind.

Im Folgenden wird die Verteilung auf zwei verschiedene Arten ausgewertet:

Es wird zunächst angenommen, dass sich die Verteilungen aus jeweils zwei linearen Teilbereichen (hohes Kraftregime und niedriges Kraftregime) zusammensetzen lassen. Diese werden nun unabhängig voneinander mit dem *Bell*-Modell angepasst.

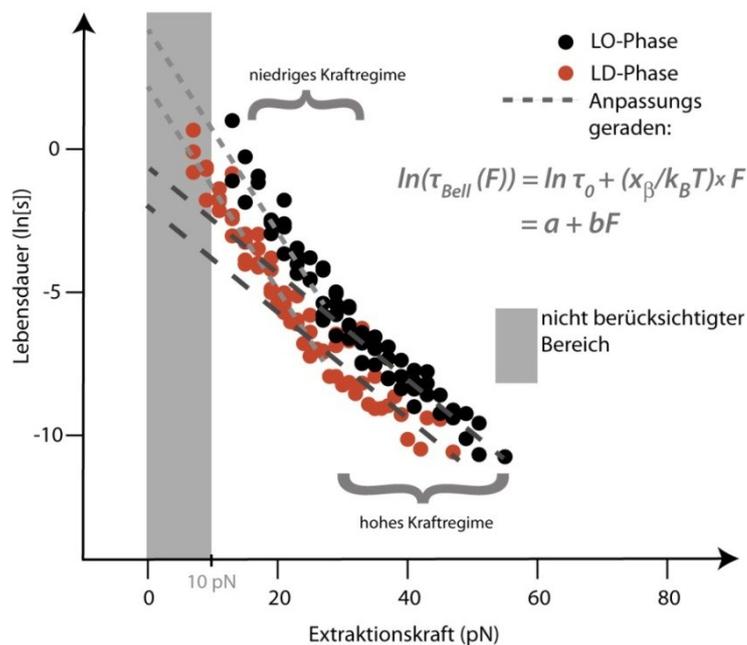


Abbildung 5.8 Anpassung zweier *Bell*-Modelle an jede der beiden Verteilungen. Der für die Anpassung der Modelle nicht berücksichtigte Bereich ist grau eingezeichnet. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

Auf diese Weise ergeben sich folgende Werte für die thermischen Aktivierungsparameter.

Hohes Kraftregime: $x_\beta = 0,8$ nm und $\tau_{0,Bell} = 1$ s für die L_O-Phase und $x_\beta = 0,7$ nm und $\tau_{0,Bell} = 0,1$ s für die L_D-Phase.

Niedriges Kraftregime: $x_\beta = 1,5$ nm und $\tau_{0,LO,Bell} = 90$ s für die L_O-Phase und $x_\beta = 1,5$ nm und $\tau_{0,LD,Bell} = 11$ s für die L_D-Phase.

Mit Methode B (Abbildung 5.9) ergeben sich $x_\beta = 1,2$ nm und $\tau_{0,Bell} = 10$ s für die L_O-Phase und $x_\beta = 1,2$ nm und $\tau_{0,Bell} = 2$ s für die L_D-Phase.

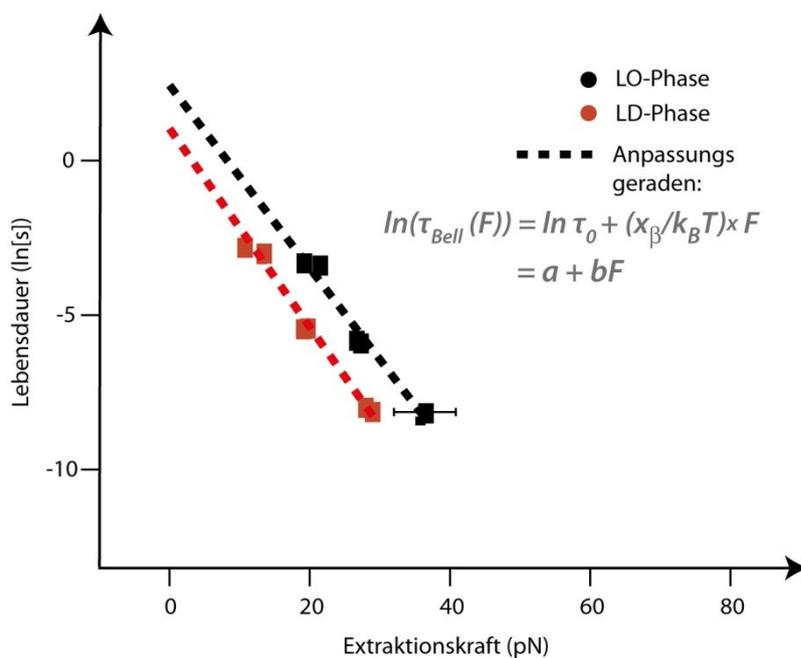


Abbildung 5.9 Methode B: Auftragung des natürlichen Logarithmus der Lebensdauern über die Extraktionskraft. Die gestrichelten Geraden bezeichnen das angepasste Bell-Modell für beide Phasen. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

Setzt man die obigen Lebensdauern in Gleichung [19] ein, so ergeben sich folgende freien Aktivierungsenergien. Methode A: $\Delta G^*_{LO} = 20,6$ k_BT (L_O-Phase), $\Delta G^*_{LD} = 18,5$ k_BT (L_D-Phase). Methode B: $\Delta G^*_{LO} = 18,4$ k_BT (L_O-Phase), $\Delta G^*_{LD} = 16,8$ k_BT (L_D-Phase). Für den Unterschied der freien Energie ergeben sich: $\Delta \Delta G^* = 2,1$ k_BT (Methode A) und $\Delta \Delta G^* = 1,6$ k_BT (Methode B).

Alternativ werden die Verteilungen (Abb. 5.8), anstatt mit dem *Bell*-Modell (Dreieck-Potential), mit zwei Modellen angepasst, die in (64) beschrieben wurden

(siehe Kap. 2.4). Die beiden Modelle beschreiben ein harmonisches (*Harm-Modell*) und eine linear-kubisches (*Kub-Modell*) Potential und beinhalten die Aktivierungsenergie ΔG^* explizit als Fit-Parameter.

Nach Anpassung mit dem *Harm-Modell* ergibt sich für die L_O -Phase: $x_{\beta,LO} = 1,8$ nm, $\tau_{0,LO} = 129$ s und $\Delta G^* = 17,8$ k_BT. Für die L_D -Phase erhält man: $x_{\beta,LD} = 2,0$ nm, $\tau_{0,LD} = 19$ s und $\Delta G^* = 14,9$ k_BT.

Nach Anpassung mit dem *Kub-Modell* ergibt sich für die L_O -Phase:

$x_{\beta,LO} = 1,6$ nm; $\tau_{0,LO} = 68$ s und $\Delta G^* = 15,9$ k_BT und für die L_D -Phase erhält man: $x_{\beta,LD} = 1,6$ nm; $\tau_{0,LD} = 9$ s und $\Delta G^* = 13,4$ k_BT.

Für den Unterschied der freien Energie ergeben sich: $\Delta\Delta G^* = 2,9$ k_BT (*Harm-Modell*) und $\Delta\Delta G^* = 2,5$ k_BT (*Kub-Modell*).

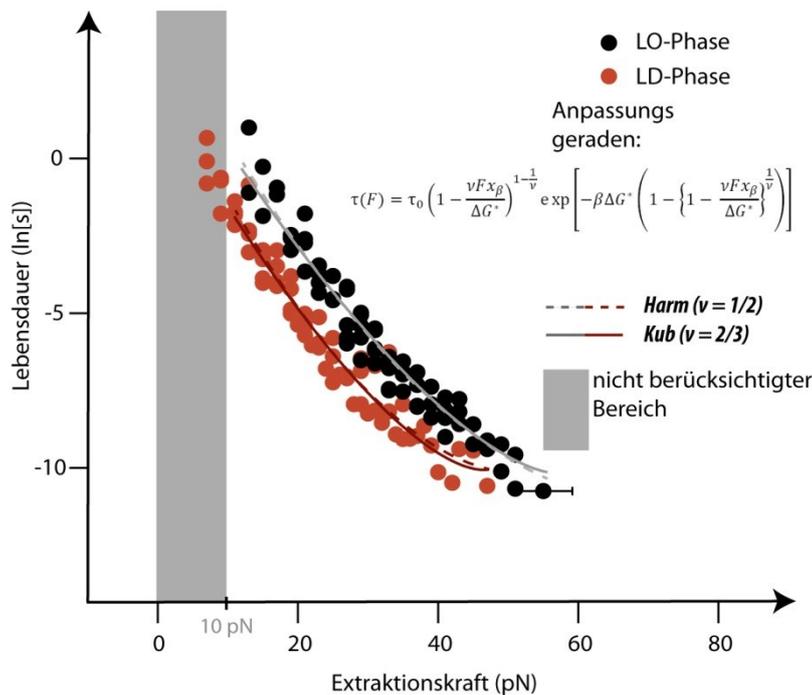


Abbildung 5.10 Anpassung des *Harm-* und *Kub-*Modells an die beiden Verteilungen. Der für die Anpassung der Modelle nicht berücksichtigte Bereich ist grau eingezeichnet. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

In Tabelle 4 sind nochmals alle aus der Anpassung der Modelle (*Bell*, *Harm*, *Kub*) erhaltenen Parameter für alle getesteten Lipid-Lipidmembran-Kombinationen für beide Methoden (A und B) zusammengefasst.

Tabelle 4 Zusammenfassung aller erhaltenen Werte für die thermischen Aktivierungsparameter. Die Parameter **a** und **b** beschreiben jeweils die Fit-Gerade $\ln(\tau_{Bell}(F)) = a + bF$. Die Werte für das niedrige Kraftregime stehen in Klammern.

Angeb. Lipid	Lipid-schicht	Methode	a (ln[s])	b (10^{11} N)	τ_0 (s)	x_β (nm)
POPE	POPC	A	$8.5 \pm 0,7$	$-3,0 \pm 0,1$	$4,8 \cdot 10^3$	1,24
DSPE	DOPC	A	8.7 ± 1.4	$-2,5 \pm 0,2$	$6,0 \cdot 10^3$	1,02
DSPE	DOPC	B	$8,6 \pm 2,2$	$-2,5 \pm 0,3$	$5,3 \cdot 10^3$	1,02
Chol	PSC/L _O	A	$4,5 \pm 0,6$ (-0,1)	$-3,5 \pm 0,3$ (-1,9)	90 (1,0)	1,44 (0,8)
Chol	PSC/L _D	A	$2,4 \pm 0,3$ (-2,1)	$-3,6 \pm 0,3$ (-1,7)	11 (0,1)	1,48 (0,7)
Chol	PSC/L _O	A _{HARM}		$\Delta G^* = 73$ pNnm = 17,8 k _B T	129 ± 73	1,8 ± 0,1
Chol	PSC/L _D	A _{HARM}		$\Delta G^* = 61$ pNnm = 14,9 k _B T	19 ± 7	2,0 ± 0,2
Chol	PSC/L _O	A _{KUB}		$\Delta G^* = 65$ pNnm = 15,9 k _B T	68 ± 29	1,6 ± 0,1
Chol	PSC/L _D	A _{KUB}		$\Delta G^* = 55$ pNnm = 13,4 k _B T	9 ± 3	1,6 ± 0,1
Chol	PSC/L _O	B	$2,3 \pm 0,6$	$-2,9 \pm 0,2$	10	1,19
Chol	PSC/L _D	B	$0,75 \pm 0,4$	$-3,1 \pm 0,2$	2	1,23

Tabelle 5 Unterschiede der freien Desorptionsenergien $\Delta\Delta G^* = \Delta G^*_{LO} - \Delta G^*_{LD}$.

Modell	Methode	$\Delta\Delta G$
<i>Bell</i>	A	8,6 pNnm = 2,1 k _B T
<i>Bell</i>	B	6,6 pNnm = 1,6 k _B T
<i>Harm</i>	A	12 pNnm = 2,9 k _B T
<i>Kub</i>	A	10 pNnm = 2,5 k _B T

5.4 Diskussion

5.4.1 Einige Abschätzungen

Phospholipide

Extraktionskraft und Wechselwirkungsenergie

Der Unterschied der freien Wechselwirkungsenergie $\Delta\mu$ zwischen dem Lipid in der wässrigen Phase und dem Lipid in der Membran wird auch als freie Desorptionsenergie bezeichnet. Für diese Abschätzung soll angenommen werden, dass sie allein auf Grund des hydrophoben Effekts zustande kommen. Des Weiteren soll die freie Aktivierungsenergie ungefähr gleich der freien Desorptionsenergie sein.

Für Fettsäuren kann man die Differenz in der freien Wechselwirkungsenergie zwischen wässriger Phase und Lipidphase gemäß (11) empirisch folgendermaßen abschätzen:

$$\Delta\mu_{FS} \approx (\Delta\mu_0 - 3n_{CH_2}) \frac{kJ}{mol} \quad [23]$$

mit $\Delta\mu_0 \approx 11$ kJ/mol. Für die verwendeten Phospholipide gilt $\Delta\mu \approx 2 \cdot \Delta\mu_{FS}$, da jedes Diacyl-Phospholipid zwei Fettsäurereste trägt. Weiterhin sei $n_{CH_2} = 18$.

Die gegenseitige Abschirmung der beiden Fettsäuren des betrachteten Phospholipids in der wässrigen Phase wird mit 15 % abgeschätzt.

Somit ergibt sich als Abschätzung für die freie Desorptionsenergie:

$$\Delta\mu \approx 0,85 \cdot (22 - 3 \cdot 2 \cdot 18) \frac{kJ}{mol} \approx 73 \frac{kJ}{mol} \approx 117 \text{ pNnm} \quad [24]$$

Für die Abschätzung der Extraktionskraft soll angenommen werden, dass das Lipid sehr schnell, das heißt ohne thermische Aktivierung, extrahiert wird und dass dissipative Effekte außeracht gelassen werden können. Die hydrophobe Länge des Lipids wird mit 1,5 nm angenommen.

Somit erhält man als (obere) Abschätzung für die Extraktionskraft:

$$F_x \approx 117 \text{ pNnm} / 1,5 \text{ nm} \approx 80 \text{ pN} \quad [25]$$

Eine ähnliche Abschätzung kann durchgeführt werden, um eine Größenordnung für die zu erwartende *Lebensdauer* anzugeben (5).

Hierbei geht man davon aus, dass sich die Lipide in einem Potential der Tiefe $\Delta\mu$ befinden und innerhalb einer charakteristischen ‚Kollisionszeit‘ τ_c einmal versuchen, dieses Potential zu überwinden. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist dabei gerade der Boltzmannfaktor.

Die mittlere Lebensdauer τ_{LD} kann dann mit

$$\tau_{LD} = \tau_c e^{\frac{-\Delta\mu}{k_B T}} \quad [26]$$

geschrieben werden kann.

Werte für τ_c liegen für Lipide typischerweise zwischen 10^{-9} und 10^{-7} s (5). Somit ergibt sich mit obigen Werten dann folgende Abschätzung für die Lebensdauer:

$$\tau_{LD} \approx 2 \cdot 10^3 \text{ s} \dots 2 \cdot 10^5 \text{ s} \quad [27]$$

Abstand zum Übergangszustand x_β :

Die einfachste Interpretation für x_β ist, dass es sich hierbei um die Länge der Fettsäureketten des extrahierten Lipids handelt. Abschätzungen von x_β können daher aus Messungen der hydrophoben Dicken der jeweiligen Lipidmembranen gewonnen werden (140). Es ist daher $x_\beta \approx 1 - 2$ nm zu erwarten.

Cholesterol

Auf Grund der etwas geringeren hydrophoben Oberfläche des Cholesterols im Vergleich mit den oben betrachteten Phospholipiden kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Desorptionsenergie und die Extraktionskräfte wie auch die Lebensdauern etwas niedriger (wenn auch in der gleichen Größenordnung) sind. Für die Potentialbreite ist auf Grund der Molekularstruktur des Cholesterols $x_\beta \approx 1 - 2$ nm eine gute Abschätzung.

5.4.2 Phospholipide

Die Extraktion von POPE aus POPC-Lipidmembranen („POPE-POPC“) diente zunächst als Vorversuch, um die prinzipielle Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit derartiger Experimente mit dem AFM zu demonstrieren. Aus Abbildung 5.1 ist zu entnehmen, dass sowohl die gemessenen Extraktionskräfte

wie auch die Abrisslängen eng verteilt sind. Abbildung 5.2 zeigt, dass auch mehrere voneinander unabhängige Präparationen des gleichen Systems (POPE-POPC) vergleichbare Ergebnisse liefern. Die Methode liefert also konsistente und reproduzierbare Daten.

Für die Extraktionen eines weiteren Phospholipids, DSPE aus einer DOPC-Lipidmembran, wurden nun die Ziehgeschwindigkeiten variiert, um ein größeres Spektrum an Kraftladungsraten abdecken zu können.

Die aus der Anpassung des *Bell*-Modells gewonnen Parameter sind für beide Systeme (POPE-POPC und DSPE-DOPC) sehr ähnlich und innerhalb der Fehlertoleranz kaum zu unterscheiden. Methode B liefert für beide System und beide Parameter praktisch dieselben Werte.

Die Ergebnisse für die Phospholipide werden daher nachfolgend gemeinsam diskutiert.

Neben den Experimenten von Evans und Ludwig (68) sind in der Literatur nur sehr wenige andere (Phospho-)Lipidextraktionsmessungen zu finden (138, 141, 142). Die Extraktionskräfte in diesen Studien sind in einem Bereich ($\sim 10 - 100$ pN) angesiedelt, der in der gleichen Größenordnung liegt wie die im Rahmen dieser Doktorarbeit gemessenen Extraktionskräfte für Phospholipide ($\sim 40 - 80$ pN). Die Potentialbreite x_β wird in zwei dieser Studien (68, 138) mit 1 - 2 nm angegeben – in Übereinstimmung mit den obigen Abschätzungen und den in dieser Doktorarbeit gemessenen Werten.

Was allerdings die (kräftefreien = natürlichen) Lebensdauern der gemessenen Lipide in Lipidmembranen anbelangt, so werden in allen oben genannten Studien entweder gar keine erwähnt oder die berichteten liegen im unteren Sekundenbereich. Diese kurzen Lebensdauern würden in der Laborpraxis bedeuten, dass ein Spülen der Lipidmembran mit lipidfreiem Puffer innerhalb von sehr kurzer Zeit zu einer erheblichen Destabilisierung der Membran führen würde. Derart kurze Lebensdauern sind aus diesem Grund nicht plausibel.

In Lipidaustauschexperimenten wird die Übertragung von Lipiden von sogenannten Donor-Vesikeln auf Akzeptor-Vesikel quantitativ über die Zeit verfolgt. Die Messungen erfolgen dabei mit verschiedenen Techniken, meist radiometrisch oder fluoreszenzmikroskopisch.

Für Phospholipide (DMPC, DPPC, DOPC) ergeben sich in solchen Experimenten typischerweise Lebensdauern von $2,5 \cdot 10^2$ s bis 10^5 s (59, 143–145). Dies ist in

guter Übereinstimmung mit den in dieser Doktorarbeit gemessenen mittleren Lebensdauern (POPE-POPC: $4,8 \cdot 10^3$ s, DSPE-DOPC: $6,0 \cdot 10^3$ s). Sie stimmen auch mit den obigen Abschätzungen überein und sind überdies konsistent mit der Beobachtung, dass Phospholipidmembranen auf der Zeitskala eines Experiments (Stunden bis Tage) stabil sind.

Werden Lipidextraktionen mit Molekulardynamik-Simulationen (MD-Simulationen) untersucht, so stellt das *potential of mean force* (PMF) ein wichtiges Hilfsmittel zum Vergleich mit Experimenten dar. Es misst die freie Energie, die aufgewendet werden muss, um ein Lipid aus seiner Gleichgewichtsposition in der Membran zu bewegen. Die Änderung der freien Energie mit dem Ort kann daher als Extraktionskraft interpretiert werden.

Für Phospholipide werden freie Desorptionsenergien zwischen 80 und 90 kJ/mol berichtet (DPPC: 80 kJ/mol, POPC: 85 kJ/mol, DOPC: 90 kJ/mol), welche einer Kraft von etwa 80 pN entsprechen (146, 147). Die stimmt bis auf einen Faktor zwei gut mit den in dieser Doktorarbeit erhaltenen Daten überein.

5.4.3 Cholesterol

Zunächst fällt im $\ln\tau(F)$ -Diagramm auf, dass die Verteilung, welche mit Methode A erstellt wurde, in beiden Phasen (L_D - und L_O -Phase) eine Krümmung ausweist. Um zunächst weiter mit dem *Bell*-Modell arbeiten zu können, wurde daher jede Verteilung mit je zwei *Bell*-Modellen separat gefittet. Einmal im hohen Kraftregime und einmal im niedrigen.

Zum Vergleich wurde die Lebensdauerverteilung zusätzlich mit zwei Modellen angepasst, denen ein harmonisches bzw. linear-kubisches Energieprofil zu Grunde liegt (*Harm*- und *Kub*-Modell).

Extraktionskräfte

Der Vergleich mit den Extraktionskräften der Phospholipidexperimente zeigt, dass Kräfte im Cholesterol-PSC221-System etwa 50 % niedriger sind.

Aus den Histogrammen (Abb. 5.7) geht außerdem hervor, dass die Extraktionskräfte für alle Geschwindigkeit auf der L_O -Phase etwa 5-10 pN höher sind als auf der L_D -Phase.

Dies spiegelt sich auch bei der Auftragung der Lebensdauern über der Kraft gemäß beider Methoden (A und B) wieder (Abb. 5.8 und Abb. 5.9).

Die im Vergleich zur L_D -Phase höheren Kräfte in der L_O -Phase für die Extraktion von Cholesterol konnten auch in MD-Simulationen gezeigt werden (148). So ergibt sich aus der Steigung des PMFs eine Kraft von 62 pN für die Extraktion aus Sphingomyelin-Membranen und eine Extraktionskraft von 52 pN aus POPC-Membranen. Berücksichtigt man die großen Vereinfachungen, die für die Kraftfelder der MD-Simulationen gemacht werden, stimmt dies qualitativ und auch quantitativ sehr gut mit den in dieser Doktorarbeit erhaltenen Werten überein.

Potentialbreiten

Die Potentialbreiten x_β liegen für alle Methoden (A und B) und Modelle (*Bell*, *Harm*, *Kub*) zwischen 1,2 und 2,0 nm und damit im Bereich der molekularen Größe des Cholesterols. Auf die Potentialbreiten im Falle der stückweisen Beschreibung der Lebensdauererzeugung (Methode A, *Bell*-Modell) wird weiter unten nochmals eingegangen.

Lebensdauern

Cholesterol-Austausch-Experimente mit Lipidmembranen legen nahe, dass die Lebensdauern von Cholesterol im Bereich von mehreren Stunden liegen und eine deutliche Abhängigkeit von der Lipidumgebung besteht (43, 59, 149–151). So ergab sich beispielsweise in (43) eine Lebensdauer von ~ 38 h Stunden für Cholesterol in Sphingomyelin-Vesikeln und lediglich ~ 4 h für die Lebensdauer von Cholesterol in ungesättigten Di-Acyl-Phospholipiden.

Auch in MD-Simulationen konnte gezeigt werden, dass Cholesterol L_O -Phasen den L_D -Phasen vorzieht, was sich in einer deutlich größeren freien Desorptionsenergie äußerte (136).

Auch Zellmembranen, die einem effizienten Cholesterolaktzeptor, wie zum Beispiel Cyclodextrin, ausgesetzt wurden, zeigten zwei kinetische „Pools“ bzw. zwei Zeitkonstanten für diese Art der Extraktion (152). Die Halbwertszeit für den schnellen Pool geben die Autoren mit ~ 20 Sekunden an, die für den langsamen Pool mit ~ 20 Minuten.

Diese Ergebnisse sind verträglich mit der Vorstellung von Mikrodomänen (langsamer Pool, L_O -Phase), die von der restlichen Plasmamembran (schneller Pool, L_D -Phase) umgeben sind.

Das einfachste Modell für Mikrodomänen in Zellmembranen sind die in dieser Arbeit verwendeten phasenseparierten Lipidmembranen und auch hier unterscheiden sich die natürlichen Lebensdauern der Cholesterolemoleküle in den einzelnen Phasen deutlich voneinander.

Obwohl die absoluten Werte, die mit den verschiedenen Methoden und Modellen errechnet wurden, nicht einheitlich sind, bleibt interessanterweise das Verhältnis der natürlichen Lebensdauern relativ konstant ($\tau_{LD}/\tau_{LO} \sim 1/10 - 1/40$) (Tabelle 4). Wie bereits die signifikant unterschiedlichen Extraktionskräfte in beiden Phasen nahe legen, können also L_O und L_D -Phasen der PSC221-Membran deutlich voneinander unterschieden werden

Bleibt noch die Frage, warum der Wert für die Lebensdauer kleiner ausfällt als erwartet. Folgende Möglichkeiten kommen hierfür in Betracht:

Durch die intrinsische Unsicherheit bei der Bestimmung der Federkonstante (10 % -15 %) könnte die Kraft etwas unterschätzt werden, was zu einer Unterschätzung der Lebensdauer führen würde.

Falls die Form des Potentials erheblich von einem Dreieckpotential abweicht, dann würde sich auch $\tau(0)$ wesentlich ändern. Zum Beispiel fanden die Autoren in (69), dass die Verwendung eines Dreieckpotentials zu einer 35-fachen Unterschätzung der Lebensdauer führte. Die Verwendung anderer Modelle (*Harm-Modell* und *Kub-Modell*) in der vorliegenden Arbeit ergab zwar höhere Lebensdauern, jedoch sind diese immer noch zu niedrig, um plausibel zu sein, da sie der Beobachtung von über mehrere Stunden bis Tage stabiler cholesterolhaltiger Lipidmembranen widersprechen (s. oben).

Bei derartigen Vergleichen muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Cholesterol über seine 3-Hydroxyl-Gruppe an das PEG-Verbindungspolymer angebunden ist. Daher ist es nicht ausgeschlossen, dass dem Cholesterol dadurch H-Brücken entgehen, die seine Einbettung in eine Lipidmembran begünstigen würden. Die Frage, ob H-Brücken wesentlich zur Stabilisierung des Cholesterols in Membranen beitragen, ist jedoch umstritten (44, 45). Falls dies allerdings der Fall ist, wäre die hier durchgeführte Methode eine ausgezeichnete Möglichkeit die anderen Beiträge zur Cholesterol-Membran-Wechselwirkung (hydrophober Effekt, van-der-Waals-Kräfte) zu studieren.

Desorptionsenergien

Unabhängig davon, welche molekulare Wechselwirkung hauptverantwortlich für die erhöhte Affinität des Cholesterols für die L_O -Phase ist, hat diese zur Folge, dass zum einen die Cholesterolkonzentration in der L_O -Phase höher ist als in der L_D -Phase und zum anderen, dass sich die Desorptionsenergien aus den beiden Phasen unterscheiden ($\Delta G^*_{LO} > \Delta G^*_{LD}$). Es ist nun interessant diesen Unterschied in den Desorptionsenergien mit dem Unterschied freien Wechselwirkungsenergien des Cholesterols in den beiden Phasen (die sich aus dem Verhältnis der Cholesterolkonzentration berechnen lassen) miteinander zu vergleichen:

Nimmt man an, dass die Cholesterolkonzentrationen in beiden Phasen im Gleichgewicht miteinander sind, so kann man aus dem Verhältnis dieser Konzentrationen den Unterschied in der mittleren freien Energie pro Cholesterolmolekül ΔE in den beiden Phasen mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes berechnen (5).

$$\frac{[Chol]_{LO}}{[Chol]_{LD}} = \exp(\Delta E/k_B T) \quad [28]$$

Liest man die $[Chol]_{LO}$ und $[Chol]_{LD}$ für die in dieser Arbeit verwendete Lipidmischung aus dem Gibb'schen Phasendiagramm in (153) ab und nimmt an, dass es auch für oberflächengestützte Lipidschichten gilt, so ergibt sich:

$$\Delta E = k_B T \ln \frac{[Chol]_{LO}}{[Chol]_{LD}} = k_B T \cdot \ln \frac{47}{7} = 1,9 k_B T \quad [29]$$

Dies muss mit den Unterschieden in den freien Desorptionsenergien verglichen werden und zwar für die drei Modelle und die beiden Methoden (siehe Tabelle 5). Interessanterweise zeigt sich, dass die Werte für die Desorptionsenergien, die sich aus der Anwendung des *Bell*-Modells und der Arrhenius-Gleichung ergaben, mit $2,1 k_B T$ (Methode A, hohes Kraftregime) und $1,6 k_B T$ (Methode B) besser zum Ergebnis aus Gleichung [29] passen als die Werte, die direkt aus dem *Harm*- und *Kub*-Modell für die freien Aktivierungsenergien folgen ($2,9 k_B T$ und $2,5 k_B T$).

Krümmung in $\tau(F)$

Für die Krümmung in der Verteilung der Lebensdauern (Abb. 5.8) ist folgende Ursache denkbar:

Bedingt durch die heterogene Molekularstruktur des Cholesterols (fusioniertes Ringsystem und Iso-Oktylrest) könnte sich eine innere und eine äußere Barriere ergeben, wobei die äußere Barriere der gesamten hydrophoben Länge des Moleküls entsprechen würde (65). Bei Kräften über ~ 25 pN könnten das Energieprofil bereits so stark deformiert und damit die äußere Barriere so weit abgesenkt worden sein, dass effektiv nur noch die innere Barriere vorhanden ist. Welche molekularen Mechanismen genau dafür verantwortlich sind, ist jedoch nicht klar.

***Harm-* und *Kub-*Modell**

Beim Anpassen der Modelle fällt auf, dass bereits kleine Unterschiede in den Anfangsbedingungen große Änderungen in den Fit-Parametern erzeugen können.

Des Weiteren sind die aus den Modellen erhaltenen Unterschiede in den freien Aktivierungsenergien größer, als vom Unterschied der Cholesterolkonzentrationen zu erwarten gewesen wäre (s. oben).

Schließlich wird auch bereits bei optischer Inspektion klar, dass die Anpassungskurven die Verteilung nur bedingt gut wiedergeben.

Zusammengefasst kann daher festgestellt werden, dass weder das *Harm-* noch das *Kub-*Modell einen Vorteil gegenüber dem *Bell-*Modell für die Analyse der vorliegenden Daten aufweist und es aus diesem Grunde keine Rechtfertigung gibt einen dritten Fitparameter einzuführen.

Es erscheint aus diesem Grunde vorteilhafter zu sein, das etwas robustere (weil nur aus zwei Fit-Parametern bestehende) *Bell-*Modell zu verwenden. Insbesondere bei der Betrachtung der Verhältnisse der Lebensdauern (L_O / L_D) liefert es konsistentere Werte (s. oben).

Der Vorteil der AFM-Extraktionsmethode im Vergleich zu anderen kraftspektrometrischen Methoden liegt darin, dass es mit dem AFM zusätzlich möglich ist, die zu vermessende Oberfläche topographisch abzubilden. Gerade wenn Lipidphasen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander angesiedelt und miteinander im Gleichgewicht sind, verglichen werden sollen, bietet diese Technik einen enormen Vorteil gegenüber den meisten anderen Methoden.

Zudem wurde in dieser Arbeit, im Gegensatz zu allen bisher publizierten Lipidextraktions-Messungen, das Lipid kovalent an die AFM-Spitze angebunden. Dies bedeutet, dass immer dasselbe Lipid mit immer demselben Verbindungspolymer gemessen wird, was den Vorteil hat, dass eine statistische Streuung auf Grund der Polydispersität der Verbindungspolymere nicht berücksichtigt werden muss. Ein weiterer Vorzug der hier benutzten Methoden ist, dass es auf Grund ihrer Einfachheit (ein Molekül, wenige Quadratnanometer) möglich ist, sie mit Molekulardynamik-Simulationen nachzubilden. Durch den direkten Vergleich zwischen Experiment und Simulation können weitere Informationen zu den molekularen Details der studierten Wechselwirkung gewonnen werden.

6 Ausblick

In dieser Doktorarbeit wurden Methoden und Verfahrensweisen aufgezeigt, die es erlauben, die mechanischen Eigenschaften von oberflächengestützten Lipidmembranen und die Verankerung von Lipiden in Membranen auf der Nanoebene – also auf der Größenordnung der Proteine – zu untersuchen.

Es wurden PKT und ELEX als reproduzierbare und konsistente Messmethoden etabliert und anhand mehrerer bislang noch nicht untersuchter Systeme demonstriert.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Studie würde eine Kombination von PKT und ELEX im selben Experiment sehr aufschlussreiche Informationen darüber liefern, wie sich die nanomechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen und die Stabilität der in ihnen verankerten Lipide gegenseitig beeinflussen.

Der nächste Schritt könnte bereits den Übergang zu lebenden Systemen beinhalten: ELEX- wie auch PKT-Messungen auf Zellmembranen würden beispielsweise helfen zu verstehen, wie Mikrodomänen und Heterogenität in Biomembranen von Nichtgleichgewichtssystemen entstehen und wie diese zur enormen Vielfalt des Lebens beitragen, die wir auf unserer Welt vorfinden.

7 Anhang

7.1 Ergänzende PKT-Experimente

7.1.1 Ethanol auf PSC221-Membran

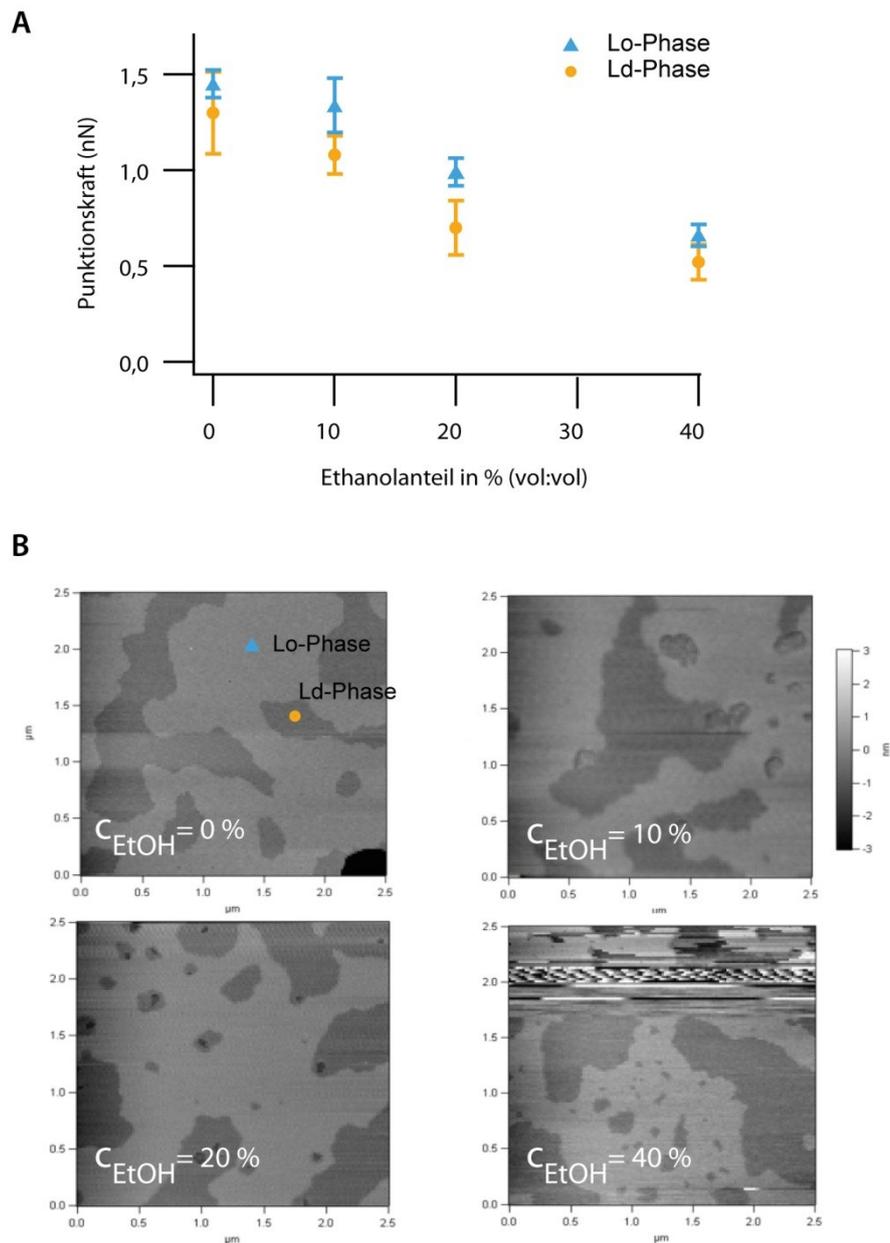


Abbildung 7.1 Punktmessungen auf einer phasenseparierten PSC221-Lipidmembran in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration. (A) Punktkräfte in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration für beide Phasen. L_O-Phase: blau. L_D-Phase: gelb. (B) Zu (A) korrespondierende Tapping-Modus-Abbildungen.

7.1.2 Verschiedene Geschwindigkeiten auf PSC221-Membran

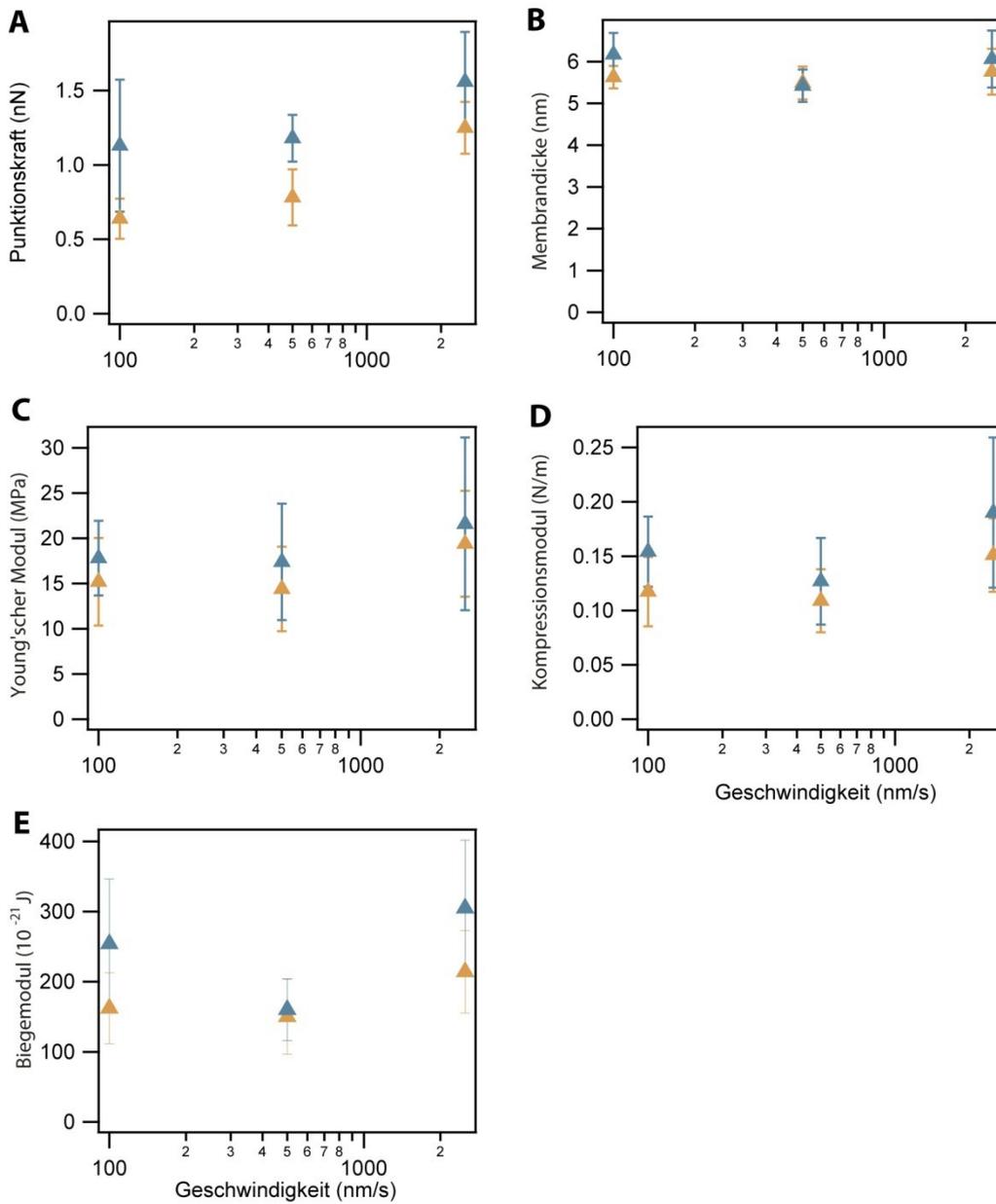


Abbildung 7.2 Punktionsmessungen auf einer phasenseparierten PSC221-Lipidmembran. Blau: L_0 -Phase. Gelb: L_D -Phase. Siehe Abb. 7.3 für eine detaillierte Darstellung der Punktionskraftdaten bei einer Geschwindigkeit von 100 nm/s.

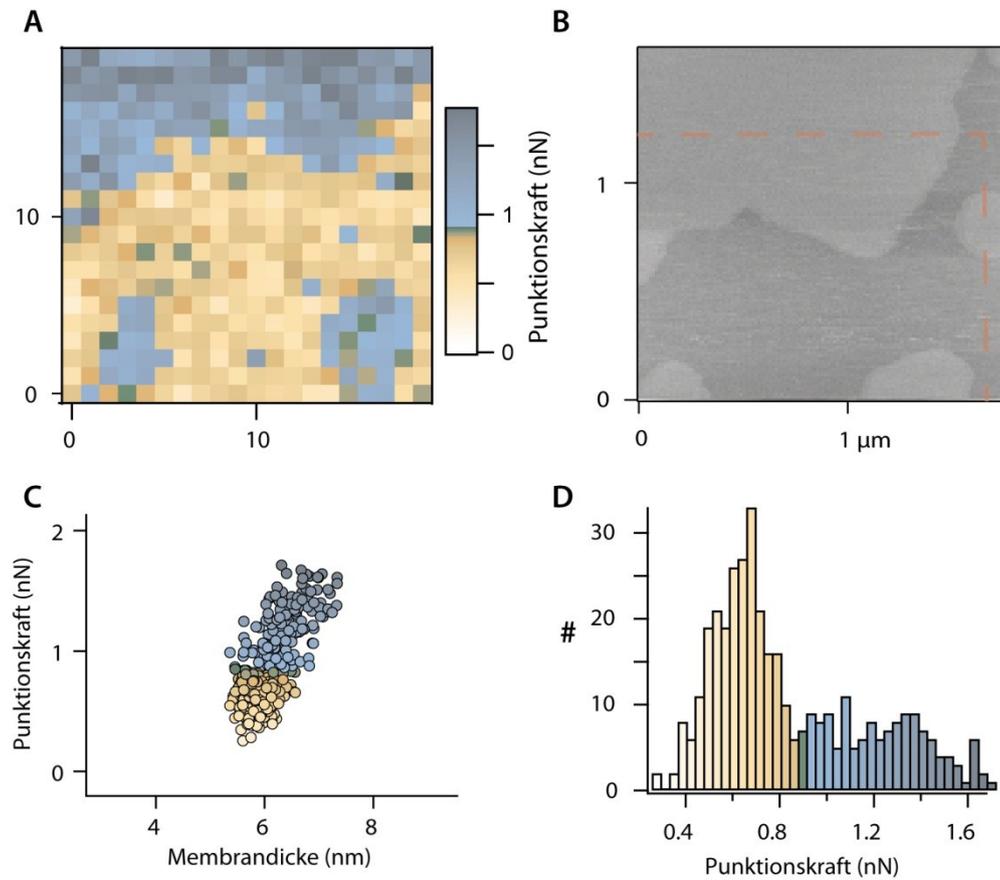


Abbildung 7.3 (A) *ForceMap* einer phasenseparierten PSC221-Lipidmembran. Die Punktionsgeschwindigkeit beträgt 100 nm/s (B) Zu (A) gehörende *Tapping-Modus-Abbildung*. Der rot gestrichelte Bereich markiert den Ausschnitt aus (A). Die hellen Bereiche gehören zur L_O-Phase, die dunklen zur L_D-Phase. Der Höhenunterschied beträgt ca. 0,7 nm. (C) Korrespondierendes Punktionskraft-Membrandicken-Streudiagramm. (D) Korrespondierendes Punktionskraft-Histogramm. Blau: L_O-Phase. Gelb: L_D-Phase.

7.1.3 Punktion von multilamellaren Lipidschichten

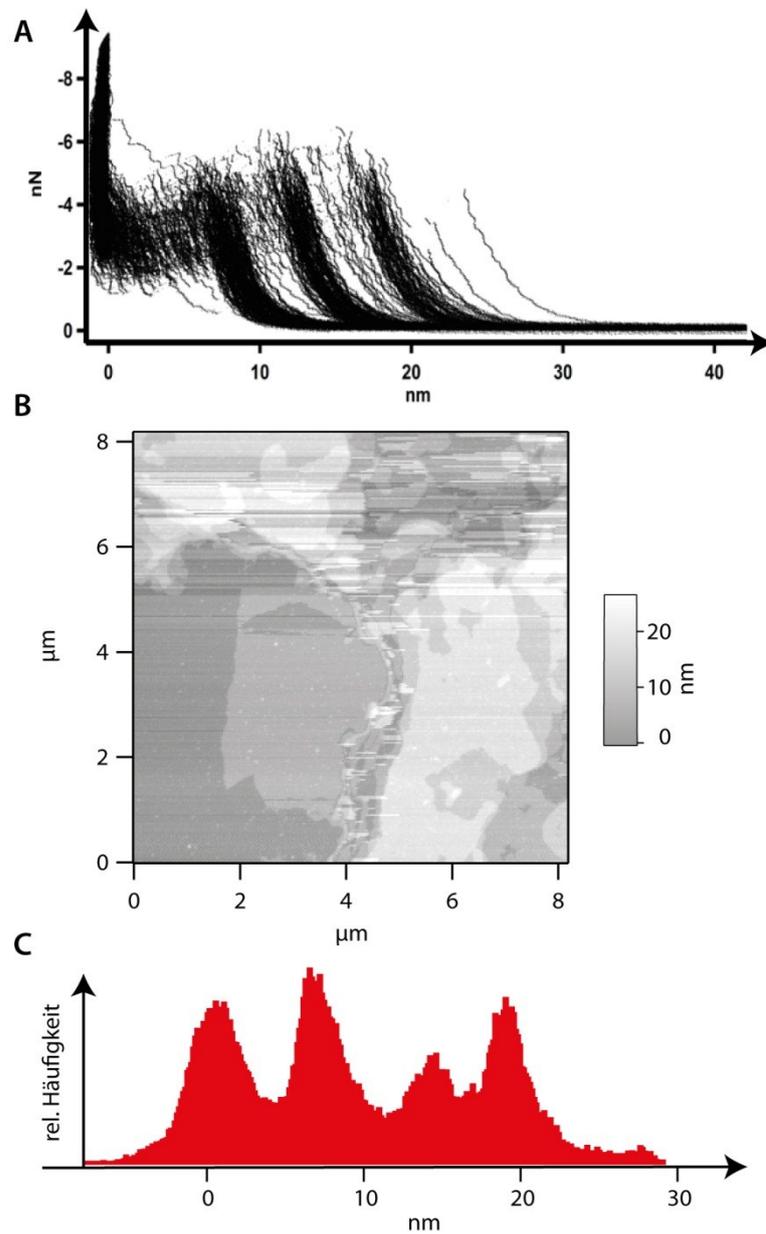


Abbildung 7.4 Punktionmessungen auf multilamellaren SOPC-Lipidschichten. Die Oberfläche wurde von Samira Hertrich (Gruppe von PD Dr. Nickel, LMU München) hergestellt und basiert auf (154). (A) Überlagerung von ca. 250 Punktionkurven. (B) *Tapping-Modus-Abbildung* eines Bereichs mit verschiedenen diskreten Schichtdicken. (C) Zu (B) gehörendes Histogramm.

7.2 Berechnung der Aktivierungsenergie der Porenbildung

Um die Aktivierungsenergie eines Punktionsprozesses zu berechnen, wird ein von Butt et al. eingeführtes kinetisches Modell verwendet (57, 131):

Man betrachtet dazu ein Ensemble von N_0 gleichzeitig ablaufenden, identischen Punktionsexperimenten. N sei die Anzahl der Lipidschichten, die nach der Zeit t noch nicht punktiert sind, wobei die Experimente zum Zeitpunkt $t = 0$ begonnen haben sollen. Die Änderung der Anzahl der noch intakten Lipidschichten dN lässt sich dann folgendermaßen schreiben:

$$dN = -cNdt \quad [30]$$

Wobei c hierbei eine zeitabhängige Konstante darstellt. Division durch N_0 ergibt dann die Wahrscheinlichkeit $P = N/N_0$ eine Lipidschicht nach der Zeit t noch intakt vorzufinden.

$$dP = -c(t)Pdt \quad [31]$$

Integration von Gleichung [31] führt dann zu

$$\ln P(t) = - \int_0^t c(t')dt' \quad [32]$$

Es wird nun angenommen, dass $c(t)$ einer Arrhenius-Gesetzmäßigkeit folgt und daher folgendermaßen formuliert werden kann:

$$c(t) = Ae^{\frac{-\Delta E_a(F)}{k_B T}} \quad [33]$$

ΔE_a ist die Aktivierungsenergie für die Bildung einer Pore, die groß genug ist um eine Punktion zu ermöglichen. F ist die Kraft, k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur und A wird als Rate betrachtet, die angibt, wie oft die Spitze versucht die Lipidmembran pro Zeiteinheit zu punktieren.

Wird nun von der Zeit, mittels $F=kv t$ (k : Federkonstante, v : Geschwindigkeit), auf die Kraft übergegangen, lässt sich mit Gleichungen [32] und [33] folgendermaßen schreiben.

$$\ln P(F) = -\frac{A}{kv} \int_0^F e^{\frac{-\Delta E_a(F')}{k_B T}} dF' \quad [34]$$

$P(F)$ entspricht der Wahrscheinlichkeit eine Lipidschicht bei der Kraft F noch intakt vorzufinden. Fällt diese mit der Kraft hinreichend schnell ab, dann ist auch die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Punktionskräfte schmal und für die mittlere Punktionskraft F_0 kann dann geschrieben werden:

$$v = -\frac{A}{0,693k} \int_0^{F_0} e^{\frac{-\Delta E_a(F')}{k_B T}} dF' \quad [35]$$

Mit $\ln(0,5) = 0,693$ und nach ΔE_a aufgelöst ergibt sich dann:

$$\Delta E_a(F_0) = -k_B T \ln\left(\frac{0,693k}{A} \frac{dv}{dF_0}\right) \quad [36]$$

Für die mittlere Punktionskraft gilt (4, 130):

$$F_0 = a + b \ln(v) \quad [37]$$

Wobei a und b geometrische und mechanische Parameter sind. Setzt man nun Gleichung [37] in Gleichung [36] ein, so kann die Aktivierungsenergie für die Bildung einer Pore, die groß genug ist um den Punktionsprozess zu initiieren, bestimmt werden:

$$\Delta E_a = k_B T \left[\frac{a - F_0}{b} - \ln\left(\frac{k}{Ab}\right) \right] \quad [38]$$

Extrapolation zu $F_0 = 0$ ergibt dann die spontane oder intrinsische Aktivierungsenergie für die Porenbildung.

Literaturverzeichnis

1. Phillips, R., T. Ursell, P. Wiggins, and P. Sens. 2009. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*. 459: 379–85.
2. Gruber, M. 2011. Wechselwirkung von Alpha-Synuclein mit Zellmembranmodellen. .
3. Stahl, M. 2011. Untersuchung der bei Morbus Parkinson auftretenden Aggregation von Alpha-Synuclein mit Einzelmolekülmethoden. : 68.
4. Butt, H.-J., B. Cappella, and M. Kappl. 2005. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*. 59: 1–152.
5. Israelachvili, J.N. 2010. *Intermolecular and Surface Forces: With Applications to Colloidal and Biological Systems (Colloid Science)*. 3rd ed. Academic Press.
6. Garcia-Manyes, S., G. Oncins, and F. Sanz. 2005. Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical journal*. 89: 1812–26.
7. Garcia-Manyes, S., G. Oncins, and F. Sanz. 2005. Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophysical journal*. 89: 4261–74.
8. Marcelja, S., and N. Radic. 1976. Repulsion of interfaces due to boundary water. *Chemical Physics Letters*. 42: 129–130.
9. Chandler, D. 2005. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*. 437: 640–7.
10. Garde, S., and A.J. Patel. 2011. Unraveling the hydrophobic effect, one molecule at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108: 16491–2.
11. Sackmann, E., and R. Merkel. 2010. *Biophysik*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
12. Conner, S.D., and S.L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422: 37–44.
13. Ritchie, J.M., and R.B. Rogart. 1977. Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74: 211–5.
14. Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191: 144–148.
15. McIntosh, T.J., and S. a Simon. 2006. Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 35: 177–98.
16. Stryer, L. 2003. *Biochemie*. 5th ed. Spektrum Akademischer Verlag.
17. Wagner, B., R. Tharmann, I. Haase, M. Fischer, and a R. Bausch. 2006. Cytoskeletal polymer networks: the molecular structure of cross-linkers determines macroscopic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 13974–8.

18. Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, et al. 2008. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
19. Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175: 720–31.
20. Engelman, D.M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*. 438: 578–80.
21. Jacobson, K., E.D. Sheets, and R. Simson. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*. 268: 1441–1442.
22. Rückhardt, C. 2007. Die Entdeckung und die Struktur von Steroiden. Arbeiten von Heinrich Kilian (1855–1945), Adolf Windaus (1876–1959) und Heinrich Wieland (1877–1957). In: 550 Jahre Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Bd. 4. Freiburg im Breisgau: . pp. 207–210.
23. Ikonen, E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9: 125–38.
24. Fuhrhop, J.-H., and T. Wang. 2004. Bolaamphiphiles. *Chem. Rev.* 104: 2901–2937.
25. Holland, D.P., A. V Struts, M.F. Brown, and D.H. Thompson. 2008. Bolalipid membrane structure revealed by solid-state ²H NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 130: 4584–5.
26. Loudet, C., A. Diller, A. Grelard, R. Oda, and J. Dufourc, Erick. 2010. Biphenyl phosphatidylcholine: A promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields. *Progress in Lipid Research*. 49: 289–297.
27. Seddon, J., and R. Templer. 1995. Polymorphism of lipid-water systems. *Handbook of biological physics*. I.
28. Kamp, F., and K. Beyer. 2006. Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles. *The Journal of biological chemistry*. 281: 9251–9.
29. Mui, B.L., P.R. Cullis, E.A. Evans, and T.D. Madden. 1993. Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. *Biophysical journal*. 64: 443–53.
30. Montal, M., and P. Mueller. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 69: 3561–6.
31. Langmuir, I., and K. Blodgett. 1935. Über einige neue Methoden zur Untersuchung von monomolekularen Filmen. *Colloid & Polymer Science*. .
32. Sackmann, E. 1996. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science (New York, N.Y.)*. 271: 43–8.
33. Stanglmaier, S., S. Hertrich, K. Fritz, J.-F. Moulin, M. Haese-Seiller, et al. 2012. Asymmetric distribution of anionic phospholipids in supported lipid bilayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 28: 10818–21.
34. Oreopoulos, J., R.F. Epand, R.M. Epand, and C.M. Yip. 2010. Peptide-induced domain formation in supported lipid bilayers: direct evidence by

- combined atomic force and polarized total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophysical journal*. 98: 815–23.
35. Besenicar, M., P. Macek, J.H. Lakey, and G. Anderluh. 2006. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chemistry and physics of lipids*. 141: 169–78.
 36. Milhiet, P.-E., F. Gubellini, ..., and D. Lévy. 2006. High-resolution AFM of membrane proteins directly incorporated at high density in planar lipid bilayer. *Biophysical journal*. 91: 3268–75.
 37. Lorenz, B., R. Keller, E. Sunnick, B. Geil, and A. Janshoff. 2010. Colloidal probe microscopy of membrane-membrane interactions: from ligand-receptor recognition to fusion events. *Biophysical chemistry*. 150: 54–63.
 38. Hancock, J.F. 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7: 456–62.
 39. Pike, L.J. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research*. 47: 1597–8.
 40. Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, N.Y.)*. 327: 46–50.
 41. Feigenson, G. 2009. Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. 1788: 47–52.
 42. Veatch, S., and S. Keller. 2005. Miscibility Phase Diagrams of Giant Vesicles Containing Sphingomyelin. *Physical Review Letters*. 94: 148101.
 43. Kan, C.C., R. Bittman, and J. Hajdu. 1991. Phospholipids containing nitrogen- and sulfur-linked chains: kinetics of cholesterol exchange between vesicles. *Biochimica et biophysica acta*. 1066: 95–101.
 44. Kan, C.C., Z.S. Ruan, and R. Bittman. 1991. Interaction of cholesterol with sphingomyelin in bilayer membranes: evidence that the hydroxy group of sphingomyelin does not modulate the rate of cholesterol exchange between vesicles. *Biochemistry*. 30: 7759–66.
 45. Ramstedt, B., and J.P. Slotte. 2006. Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. *Biochimica et biophysica acta*. 1758: 1945–56.
 46. Térová, B., R. Heczko, and J.P. Slotte. 2005. On the importance of the phosphocholine methyl groups for sphingomyelin/cholesterol interactions in membranes: a study with ceramide phosphoethanolamine. *Biophysical journal*. 88: 2661–9.
 47. Quinn, P.J., and C. Wolf. 2010. Egg-sphingomyelin and cholesterol form a stoichiometric molecular complex in bilayers of egg-phosphatidylcholine. *The journal of physical chemistry. B*. 114: 15536–45.
 48. Landau, L.D., E.M. Lifshitz, A.M. Kosevich, and P.L. P. 1986. *Theory of Elasticity*. Butterworth-Heinemann; 3rd edition.
 49. Rawicz, W., K.C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical journal*. 79: 328–39.

50. Li, S., F. Eghiaian, C. Sieben, A. Herrmann, and I. a T. Schaap. 2011. Bending and puncturing the influenza lipid envelope. *Biophysical journal*. 100: 637–45.
51. Grandbois, M., M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. Gaub. 1999. How Strong Is a Covalent Bond? *Science*. 283: 1727–1730.
52. Rief, M., H. Clausen-Schaumann, and H.E. Gaub. 1999. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nature Structural Biology*. 6: 346–349.
53. Rief, M. 1997. Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science*. 276: 1109–1112.
54. Ly, H., D. Block, and M. Longo. 2002. Interfacial tension effect of ethanol on lipid bilayer rigidity, stability, and area/molecule: a micropipet aspiration approach. *Langmuir*. 18: 8988–8995.
55. Garcia-Manyes, S., and F. Sanz. 2010. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: a perspective. *Biochimica et biophysica acta*. 1798: 741–9.
56. Sullan, R.M.A., J.K. Li, and S. Zou. 2009. Direct correlation of structures and nanomechanical properties of multicomponent lipid bilayers. *Langmuir*. 25: 7471–7.
57. Sullan, R.M.A., J.K. Li, C. Hao, G.C. Walker, and S. Zou. 2010. Cholesterol-dependent nanomechanical stability of phase-segregated multicomponent lipid bilayers. *Biophysical journal*. 99: 507–16.
58. Stetter, F.W.S., and T. Hugel. 2013. The Nanomechanical Properties of Lipid Membranes are Significantly Influenced by the Presence of Ethanol. *Biophysical Journal*. 104: 1049–1055.
59. Lev, S. 2010. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11: 739–50.
60. Grafmüller, A., R. Lipowsky, and V. Knecht. 2013. Effect of tension and curvature on the chemical potential of lipids in lipid aggregates. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 15: 876–81.
61. Smirnova, Y.G., S.-J. Marrink, R. Lipowsky, and V. Knecht. 2010. Solvent-exposed tails as prestalk transition states for membrane fusion at low hydration. *Journal of the American Chemical Society*. 132: 6710–8.
62. Zhurkov, S. 1965. Kinetic concept of the strength of solids. *Proceedings of the First International Conference on Fracture Sendai, Japan*. .
63. Bell, G. 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*. 200: 618–627.
64. Dudko, O.K., G. Hummer, and A. Szabo. 2008. Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 15755–60.
65. Evans, E., and K. Ritchie. 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical journal*. 72: 1541–55.

66. Friedsam, C., A.K. Wehle, F. K hner, and H.E. Gaub. 2003. Dynamic single-molecule force spectroscopy: bond rupture analysis with variable spacer length. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 15: S1709–S1723.
67. Sulchek, T., R.W. Friddle, K. Langry, E.Y. Lau, H. Albrecht, et al. 2005. Dynamic force spectroscopy of parallel individual Mucin1-antibody bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 16638–43.
68. Evans, E., and F. Ludwig. 2000. Dynamic strengths of molecular anchoring and material cohesion in fluid biomembranes. *J. Phys.: Condens. Matter*. 12: A315–A320.
69. Schlierf, M., and M. Rief. 2006. Single-molecule unfolding force distributions reveal a funnel-shaped energy landscape. *Biophysical journal*. 90: L33–5.
70. Lee, T.-H., C. Heng, M.J. Swann, J.D. Gehman, F. Separovic, et al. 2010. Real-time quantitative analysis of lipid disordering by aurein 1.2 during membrane adsorption, destabilisation and lysis. *Biochimica et biophysica acta*. 1798: 1977–86.
71. Sanghera, N., M.J. Swann, G. Ronan, and T.J.T. Pinheiro. 2009. Insight into early events in the aggregation of the prion protein on lipid membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 1788: 2245–51.
72. Ly, H. V, and M.L. Longo. 2004. The Influence of Short-Chain Alcohols on Interfacial Tension, Mechanical Properties, Area/Molecule, and Permeability of Fluid Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*. 87: 1013–1033.
73. Anchooguy, T.J., A.S. Rudolph, J.F. Carpenter, and J.H. Crowe. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*. 24: 324–31.
74. Seo, S., M. McClintock, and A. Wei. 2006. Cryoprotection with L- and meso-Trehalose: Stereochemical Implications. *ChemBioChem*. 7: 1959–1964.
75. Meyer, H. 1899. Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Arch Exp Pathol Pharmacol*. 42: 109–118.
76. Overton, E. 1901. *Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie*. Jena, Germany: Gustav Fischer.
77. Cantor, R. 1997. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry*. 36: 2339–2344.
78. Feller, S.E., C.A. Brown, D.T. Nizza, and K. Gawrisch. 2002. Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy cross-relaxation rates and ethanol distribution across membranes. *Biophysical journal*. 82: 1396–404.
79. Rottenberg, H. 1992. Probing the interactions of alcohols with biological membranes with the fluorescent probe Prodan. *Biochemistry*. 31: 9473–81.
80. Chin, J.H., and D.B. Goldstein. 1977. Effects of Low Concentrations of Ethanol on the Fluidity of Spin-Labeled Erythrocyte and Brain Membranes. *Molecular Pharmacology*. 13: 435–441.

81. Komatsu, H., and S. Okada. 1997. Effects of ethanol on permeability of phosphatidylcholine/cholesterol mixed liposomal membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 85: 67–74.
82. Stetter, F., and T. Hugel. 2010. Wenn jedes Molekül zählt. *BioSpektrum*. 16.
83. Neher, E., and B. Sakmann. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 260: 799–802.
84. Selvin Paul R, H.T. 2007. *Single Molecule Techniques: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
85. Horinek, D., A. Serr, M. Geisler, T. Pirzer, U. Slotta, et al. 2008. Peptide adsorption on a hydrophobic surface results from an interplay of solvation, surface, and intrapeptide forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 2842–2847.
86. Geisler, M., B.N. Balzer, and T. Hugel. 2009. Polymer Adhesion at the Solid-Liquid Interface Probed by a Single-Molecule Force Sensor. *Small*. 5: 2864–2869.
87. Dietz, H., and M. Rief. 2006. Protein structure by mechanical triangulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 1244–1247.
88. Puchner, E.M., A. Alexandrovich, A.L. Kho, U. Hensen, L. V Schafer, et al. 2008. Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 13385–13390.
89. Stanley, L.K., R. Seidel, C. van der Scheer, N.H. Dekker, M.D. Szczelkun, et al. 2006. When a helicase is not a helicase: dsDNA tracking by the motor protein EcoR124I. *Embo J*. 25: 2230–2239.
90. Hugel, T., J. Michaelis, C.L. Hetherington, P.J. Jardine, S. Grimes, et al. 2007. Experimental test of connector rotation during DNA packaging into bacteriophage phi29 capsids. *PLoS Biol*. 5: e59.
91. Shank, E.A., C. Cecconi, J.W. Dill, S. Marqusee, and C. Bustamante. 2010. The folding cooperativity of a protein is controlled by its chain topology. *Nature*. 465: 637–640.
92. Bräuchle, C., D.C. Lamb, and J. Michaelis. 2009. *Single Particle Tracking and Single Molecule Energy Transfer*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH.
93. Ratzke, C., M. Mickler, B. Hellenkamp, J. Buchner, and T. Hugel. 2010. Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 16101–16106.
94. Yildiz, A., J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman, et al. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*. 300: 2061–2065.
95. Petrášek, Z., and P. Schwille. 2009. Fluctuations as a source of information in fluorescence microscopy. *J R Soc Interface*. 6.
96. Parkinson, J. 1817. *An Essay on the Shaking Palsy*. London: Whittingham and Rowland.
97. Bernheimer, H., W. Birkmeyer, O. Hornykiewicz, K. Jellinger, F. Seitelberger, et al. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson

- and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci.* 20: 415–455.
98. McGeer, P.L., S. Itagaki, H. Akiyama, and E.G. McGeer. 1988. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Annals of neurology.* 24: 574–6.
 99. Forster, E., and F.H. Lewy. 1912. Paralysis Agitans. In: *Pathologische Anatomie - Handbuch der Neurologie.* . pp. 259 – 272.
 100. Spillantini, M., M. Schmidt, and V. Lee. 1997. Alpha-Synuclein in Lewy bodies. *Nature.* : 839–840.
 101. Auluck, P.K., G. Caraveo, and S. Lindquist. 2010. α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology.* 26: 211–33.
 102. Ulmer, T.S., A. Bax, N.B. Cole, and R.L. Nussbaum. 2005. Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry.* 280: 9595–603.
 103. Izawa, Y., H. Tateno, H. Kameda, K. Hirakawa, K. Hato, et al. 2012. Role of C-terminal negative charges and tyrosine residues in fibril formation of α -synuclein. *Brain and behavior.* 2: 595–605.
 104. Giasson, B.I., I. V Murray, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2001. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *The Journal of biological chemistry.* 276: 2380–6.
 105. Der-Sarkissian, A., C.C. Jao, J. Chen, and R. Langen. 2003. Structural organization of alpha-synuclein fibrils studied by site-directed spin labeling. *The Journal of biological chemistry.* 278: 37530–5.
 106. Kostka, M., T. Högen, K.M. Danzer, J. Levin, M. Habeck, et al. 2008. Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *The Journal of biological chemistry.* 283: 10992–1003.
 107. Van Rooijen, B.D., M.M. a E. Claessens, and V. Subramaniam. 2010. Membrane Permeabilization by Oligomeric α -Synuclein: In Search of the Mechanism. *PloS one.* 5: e14292.
 108. Rhoades, E., T.F. Ramlall, W.W. Webb, and D. Eliezer. 2006. Quantification of alpha-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal.* 90: 4692–700.
 109. Danzer, K.M., D. Haasen, A.R. Karow, S. Moussaud, M. Habeck, et al. 2007. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 27: 9220–32.
 110. Paik, S., H. Shin, J. Lee, C. Chang, and J. Kim. 1999. Copper (II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *Biochemical Journal.* 828: 821–828.
 111. Leonenko, Z. V, A. Carnini, and D.T. Cramb. 2000. Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles

- with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy. *Biochimica et biophysica acta*. 1509: 131–47.
112. Sader, J.E., I. Larson, P. Mulvaney, and L.R. White. 1995. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*. 66: 3789–3798.
 113. Pirzer, T., and T. Hugel. 2009. Atomic force microscopy spring constant determination in viscous liquids. *The Review of scientific instruments*. 79: 035110.
 114. Hertz, H. 1881. Über die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*. 92: 156–171.
 115. Dimitriadis, E.K., F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, and R.S. Chadwick. 2002. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophysical journal*. 82: 2798–810.
 116. Charitat, T., E. Bellet-Amalric, G. Fragneto, and F. Graner. 1999. Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. *The European Journal B*. 8: 583–593.
 117. Kim, J., G. Kim, and P.S. Cremer. 2001. Investigations of Water Structure at the Solid/Liquid Interface in the Presence of Supported Lipid Bilayers by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy. *Langmuir*. 17: 7255–7260.
 118. Cremer, P., and S. Boxer. 1999. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *The Journal of Physical Chemistry B*. 103: 2554–2559.
 119. Fukuma, T., M.J. Higgins, and S.P. Jarvis. 2007. Direct imaging of individual intrinsic hydration layers on lipid bilayers at Angstrom resolution. *Biophysical journal*. 92: 3603–9.
 120. Malvern Instruments. 2011. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Technical Note MRK656-01. : 1–8.
 121. Smeulders, J., C. Blom, and J. Mellema. 1990. Linear viscoelastic study of lipid vesicle dispersions: Hard-sphere behavior and bilayer surface dynamics. *Physical Review A*. : 3483–3498.
 122. Marquês, J.T., A.S. Viana, and R.F.M. De Almeida. 2011. Ethanol effects on binary and ternary supported lipid bilayers with gel/fluid domains and lipid rafts. *Biochimica et biophysica acta*. 1808: 405–14.
 123. Picas, L., F. Rico, and S. Scheuring. 2012. Direct measurement of the mechanical properties of lipid phases in supported bilayers. *Biophysical journal*. 102: L01–3.
 124. Klemm, W.R. 1998. Biological water and its role in the effects of alcohol. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 15: 249–67.
 125. Separovic, F., and K. Gawrisch. 1996. Effect of unsaturation on the chain order of phosphatidylcholines in a dioleoylphosphatidylethanolamine matrix. *Biophysical journal*. 71: 274–82.
 126. Yoon, R., and S. Vivek. 1998. Effects of Short-Chain Alcohols and Pyridine on the Hydration Forces between Silica Surfaces. *Journal of colloid and interface science*. 204: 179–86.

127. Longo, G.S., D.H. Thompson, and I. Szleifer. 2007. Stability and phase separation in mixed monopolar lipid/bolalipid layers. *Biophysical journal*. 93: 2609–21.
128. Mulligan, K., D. Brownholland, A. Carnini, D.H. Thompson, and L.J. Johnston. 2010. AFM Investigations of Phase Separation in Supported Membranes of Binary Mixtures of POPC and an Eicosanyl-Based Bisphosphocholine Bolalipid. *Langmuir*. 26: 8525–33.
129. Shinoda, W., K. Shinoda, T. Baba, and M. Mikami. 2005. Molecular dynamics study of bipolar tetraether lipid membranes. *Biophysical Journal*. 89: 3195–202.
130. Franz, V., S. Loi, H. Müller, E. Bamberg, and H.J. Butt. 2002. Tip penetration through lipid bilayers in atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B*. 23: 191–200.
131. Butt, H.-J., and V. Franz. 2002. Rupture of molecular thin films observed in atomic force microscopy. I. Theory. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear and Soft Matter Physics*. 66: 031601.
132. Karakatsanis, P., and T. Bayerl. 1996. Diffusion measurements in oriented phospholipid bilayers by 1-NMR in a static fringe field gradient. *Physical Review E*. 54: 1785–1790.
133. Giannakis, E., J. Pacífico, D.P. Smith, L.W. Hung, C.L. Masters, et al. 2008. Dimeric structures of alpha-synuclein bind preferentially to lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778: 1112–1119.
134. Cross, B., F. Ronzon, B. Roux, and J.-P. Rieu. 2005. Measurement of the anchorage force between GPI-anchored alkaline phosphatase and supported membranes by AFM force spectroscopy. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 21: 5149–53.
135. Sprong, H., P. Van Der Sluijs, and G. Van Meer. 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. 2: 504–513.
136. Bennett, W.F.D., and D.P. Tieleman. 2012. Molecular simulation of rapid translocation of cholesterol, diacylglycerol, and ceramide in model raft and nonraft membranes. *Journal of lipid research*. 53: 421–9.
137. Meer, G. Van, D. Voelker, and G. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews molecular ...* 9: 112–124.
138. Ounkomol, C., H. Xie, P. a Dayton, and V. Heinrich. 2009. Versatile horizontal force probe for mechanical tests on pipette-held cells, particles, and membrane capsules. *Biophysical journal*. 96: 1218–31.
139. Francis, G.W., L.R. Fisher, R. a Gamble, and D. Gingell. 1987. Direct measurement of cell detachment force on single cells using a new electromechanical method. *Journal of cell science*. 87 (Pt 4): 519–23.
140. Strandberg, E., D. Tiltak, S. Ehni, P. Wadhvani, and A.S. Ulrich. 2012. Lipid shape is a key factor for membrane interactions of amphipathic helical peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1818: 1764–1776.

141. Wieland, J. a, A. a Gewirth, and D.E. Leckband. 2005. Single-molecule measurements of the impact of lipid phase behavior on anchor strengths. *The journal of physical chemistry. B.* 109: 5985–93.
142. Pyrpapopoulos, S., H. Shuman, and E.M. Ostap. 2010. Single-molecule adhesion forces and attachment lifetimes of myosin-I phosphoinositide interactions. *Biophysical journal.* 99: 3916–22.
143. Reinl, H.M., and T.M. Bayerl. 1994. Lipid transfer between small unilamellar vesicles and single bilayers on a solid support: self-assembly of supported bilayers with asymmetric lipid distribution. *Biochemistry.* 33: 14091–9.
144. Nakano, M., M. Fukuda, T. Kudo, H. Endo, and T. Handa. 2007. Determination of Interbilayer and Transbilayer Lipid Transfers by Time-Resolved Small-Angle Neutron Scattering. *Physical Review Letters.* 98: 238101.
145. Kundu, J., C.S. Levin, and N.J. Halas. 2009. Real-time monitoring of lipid transfer between vesicles and hybrid bilayers on Au nanoshells using surface enhanced Raman scattering (SERS). *Nanoscale.* 1: 114–7.
146. Sapay, N., W.F.D. Bennett, and D.P. Tieleman. 2009. Thermodynamics of flip-flop and desorption for a systematic series of phosphatidylcholine lipids. *Soft Matter.* 5: 3295.
147. Tieleman, D.P., and S.-J. Marrink. 2006. Lipids out of equilibrium: energetics of desorption and pore mediated flip-flop. *Journal of the American Chemical Society.* 128: 12462–7.
148. Zhang, Z., L. Lu, and M.L. Berkowitz. 2008. Energetics of cholesterol transfer between lipid bilayers. *The journal of physical chemistry. B.* 112: 3807–11.
149. Ramstedt, B., and J.P. Slotte. 1999. Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length. *Biophysical journal.* 76: 908–15.
150. McLean, L.R., and M.C. Phillips. 1984. Cholesterol transfer from small and large unilamellar vesicles. *Biochimica et biophysica acta.* 776: 21–6.
151. Lund-Katz, S., H. Laboda, L. McLean, and M. Phillips. 1988. Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. *Biochemistry.* : 3416–3423.
152. Haynes, M.P., M.C. Phillips, and G.H. Rothblat. 2000. Efflux of cholesterol from different cellular pools. *Biochemistry.* 39: 4508–17.
153. Smith, A.K., and J.H. Freed. 2009. Determination of Tie-Line Fields for Coexisting Lipid Phases: An ESR Study †. *The Journal of Physical Chemistry B.* 113: 3957–3971.
154. Daniel, C., K.E. Sohn, T.E. Mates, E.J. Kramer, J.O. Rädler, et al. 2007. Structural characterization of an elevated lipid bilayer obtained by stepwise functionalization of a self-assembled alkenyl silane film. *Biointerphases.* 2: 109–18.

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

- Stetter, F. and T. Hugel. 2010. Wenn jedes Molekül zählt. *BioSpektrum*. 16.
- Stetter, F.W.S. and T. Hugel. 2013. The Nanomechanical Properties of Lipid Membranes are Significantly Influenced by the Presence of Ethanol. *Biophysical Journal*. 104: 1049–1055.
- Stetter F. and T. Hugel. 2013 Single Lipid Extraction of Cholesterol from Liquid Ordered and Liquid Disordered Supported Lipid Membranes. In Vorbereitung.
- Stetter F., Schmidt S., Hellenkamp B., Kamp F, Nickel B. and T. Hugel. 2013. Effect of Alpha Synuclein on Supported Lipid Membranes. In Vorbereitung.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Thorsten Hugel danken. Er hat mir für die Gestaltung der Aufgabenstellung wie auch für die Durchführung dieser Arbeit große Freiheiten gelassen. Seine umsichtige und besonnene Art und Weise der Mitarbeiterführung wie auch seine wissenschaftliche Exzellenz waren das ideale Umfeld für das Entstehen dieser Dissertation. Diskussionen mit ihm – am Schreibtisch oder Tresen – waren stets sehr hilfreich und motivierend. Danke Thorsten!

PD Dr. Bert Nickel danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Prof. Dr. Erich Sackmann hat mir mit zahlreichen Gesprächen, wertvollen Hinweisen und Ideen sehr weitergeholfen. Vielen Dank!

Ich danke Frits Kamp vom Labor für neurodegenerative Krankheiten der LMU. Von Frits habe ich viel über die Arbeit und den Umgang mit Phospholipiden gelernt. Dank u wel!

Ein Dank für die gute Zusammenarbeit sei auch an das technische Personal am IMETUM, die E22-Werkstatt sowie die Elektronikabteilung des Physik-Departments gerichtet.

Prof. Dr. David Thompson von der Universität von Perdue stellte mir freundlicherweise die Bolalipide zur Verfügung. Thank you!

Samira Hertrich (Gruppe von PD Dr. Nickel, LMU München) danke ich für einige gemeinsame Messungen und die Präparation der darin benutzten Oberflächen.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen am IMETUM und der Hugel-Gruppe, besonders aber bei Bizan, Sandra, Steffi, Bettina und Lorenz, für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Auch die gute Zusammenarbeit mit ehemaligen Kollegen soll nicht unerwähnt bleiben: Tobias Pirzer und Mislav Oreb. Danke und hvala!

Gedankt sei auch den zahlreichen Studenten die ich in den letzten Jahren betreuen durfte.

Für die finanzielle und ideelle Förderung bedanke ich mich bei der Hanns-Seidel-Stiftung.

Meiner Freundin Freya danke ich für das Korrekturlesen der gesamten Arbeit, ihre Unterstützung und vieles mehr!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken, die mir immer den Rücken gestärkt hat und stets für mich da war.