

Untersuchung der Struktur und Dynamik von
T4 Lysozym auf planaren Oberflächen mittels
ESR-Spektroskopie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dipl.-Chem. Kerstin Jacobsen
geboren am 27.05.1977 in Leverkusen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. T. Buckhout, PhD

Gutachter:

1. Prof. Dr. H.-J. Freund
2. Prof. Dr. K. P. Hofmann
3. Prof. Dr. W. Lubitz

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juni 2005

Abstract

An understanding of the interaction between proteins and surfaces is not only important for many biological queries but also of great technological interest. In studies ranging from the investigation of basic cell physiological mechanisms to the development of medical implants the interplay between the structure of adsorbed proteins and the surface properties are in the center of interest.

However, this information is difficult to access, as the number of adequate experimental techniques to study the structure of adsorbed proteins on a molecular level is very limited. Introducing specific labels into proteins provides inherently a molecular spatial resolution regardless of the dimension of the system under investigation. Thus, the Site-directed Spin Labeling (SDSL) technique within the Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy has evolved to a valuable technique to study the structure and dynamics of proteins on the level of the backbone fold.

In this work the application of the SDSL technique has been extended to the analysis of proteins adsorbed to planar surfaces, in order to elucidate the influence of model surfaces of different physical and chemical properties on the structure and dynamics of the proteins. Specifically, the conformational changes the small globular model protein T4 Lysozyme undergoes in contact with quartz-supported lipid bilayers were in the center of investigation. By introducing spin-labeled lipids the model membranes were characterized simultaneously and protein-induced changes were monitored.

In a first step a monolayer of spin-labeled T4 Lysozyme was tethered via a selective linker to a zwitterionic lipid bilayer. A quantitative line shape analysis of the EPR spectra reveals already minor tertiary rearrangements whereas the secondary structure is conserved. Moreover, angular dependent EPR spectra show the existence of an ordered array of adsorbed proteins. An analysis of the spectra in terms of protein orientation on the surface is developed.

With stronger protein-surface interactions present structural changes of the protein can already be elucidated by qualitative line shape analysis. Thus, a partial unfolding of the small two-domain protein T4 Lysozyme as interacting with a negatively charged quartz surface is observed. The unfolding N-terminal domain is sticking to the surface whereas the C-terminal domain remains almost intact. The situation differs substantially, if T4 Lysozyme is adsorbed to a negatively charged model membrane. Here, the EPR spectra of the adsorbed protein suggest the formation of three-dimensional aggregates

of structural modified proteins on the membrane surface. The fluidity of the model membrane is reflected in an structural answer of the model surface to protein adsorption in terms of a phase separation of the lipid mixture due to an accumulation of negatively charged lipids.

Consequently, the Site-directed Spin Labeling technique proves to be a very useful tool to study the structure and dynamics of the protein-surface interfacial system. It is demonstrated, that the line shape analysis of the EPR spectra provides a detailed insight into the molecular interaction and adsorption mechanisms.

Zusammenfassung

Ein Verständnis der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Oberflächen ist für eine Vielzahl biowissenschaftlicher und technologischer Fragestellungen von zentraler Bedeutung. Von der Aufklärung grundlegender zellphysiologischer Mechanismen bis hin zur Herstellung medizinischer Implantate steht das komplizierte Wechselspiel von Proteinstruktur und Oberflächeneigenschaften im Blickpunkt der Untersuchungen.

Bisher stehen nur wenige Techniken zur Verfügung, die eine Analyse der Protein-Oberflächen-Wechselwirkung auf molekularer Ebene erlauben. Die Einführung spezifischer Sonden in Proteine bietet inhärent eine molekulare örtliche Auflösung und erlaubt die Abfrage der Eigenschaften dieser Markermoleküle in Proben beliebiger Größe bzw. Umgebung. Somit hat sich die ortsgerichtete Spinmarkierung (Site-directed Spin Labeling, SDSL) von Proteinen und die ESR-spektroskopische Analyse der Spinsonden in den letzten Jahren zu einer wertvollen Technik zur detaillierten Untersuchung der Struktur und Dynamik von Proteinen etabliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die SDSL-Methode auf die Untersuchung von Proteinen, die auf planaren Oberflächen adsorbiert sind, ausgedehnt, um den Einflüssen von Oberflächen unterschiedlicher physikalischer und chemischer Eigenschaften auf die Struktur und Dynamik adsorbierter Proteine nachzugehen. Dabei steht die strukturelle Antwort des kleinen, globulären Modellproteins, T4 Lysozym, auf den Kontakt mit planaren quarzgestützten Lipiddoppelschichten sowie einer Quarzoberfläche im Mittelpunkt des Interesses. Auch das strukturelle Verhalten der Modellmembrane wird durch Einführen von Spinsonden ESR-spektroskopisch charakterisiert und während der Proteinadsorption verfolgt.

In einer ersten Untersuchung wird eine Monolage des spinmarkierten T4 Lysozyms über einen spezifischen Linker an eine zwitterionische Lipidschicht gebunden. Durch quantitative Linienformanalyse der ESR-Spektren werden kleinste strukturelle Umordnungen des Proteins detektiert. Zudem wird eine Analyse der winkelabhängigen ESR-Spektren spinmarkierter Proteine entwickelt, durch die die Orientierung von Proteinen auf planaren Oberflächen bestimmt werden kann.

Bei stärkerer Wechselwirkung mit der Modelloberfläche kann die strukturelle Umwandlung des Proteins bereits durch eine qualitative Analyse der ESR-Spektren aufgeklärt werden. Auf diese Weise wird eine partielle Entfaltung des kleinen Zweidomänenproteins T4 Lysozym nach Wechselwirkung mit der Quarzoberfläche beobachtet. Die entfaltende N-terminale Domäne

steht in Kontakt mit der Oberfläche, während die C-terminale Domäne nahezu unbeeinflusst bleibt. Die Adsorption auf einer Lipiddoppelschicht, die negativ geladene Lipide enthält, liefert dagegen ein vollständig anderes Bild. Hier lassen die ESR-Spektren der adsorbierten Proteine auf die Bildung dreidimensionaler Aggregate strukturell veränderter Proteine schließen. Die Strukturuntersuchung der Modellmembrane verdeutlicht ferner, dass im Fall einer negativ geladenen Lipiddoppelschicht auch die Unterlage auf die Proteinadsorption reagiert. Durch Akkumulation der negativ geladenen Lipide kommt es zu einer Phasenseparation des Lipidgemisches.

Somit kann die Methode der ortsgerichteten Spinmarkierung erfolgreich zur Untersuchung der Struktur und Dynamik der Protein-Grenzflächensysteme eingesetzt werden. Auf der Basis dieser ESR-spektroskopischen Daten kann ein detailliertes Bild der molekularen Wechselwirkungs- und Adsorptionsmechanismen zwischen dem Protein und den Oberflächen entwickelt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	5
2.1	Die ESR-Spektroskopie	5
2.1.1	Die ESR-Parameter	5
2.1.1.1	Das freie Elektron	5
2.1.1.2	Die molekulare Umgebung	6
2.1.1.3	Wechselwirkung mit weiteren Elektronenspins	9
2.1.1.4	Die resultierenden Energieeigenwerte	10
2.1.1.5	Die Resonanzbedingung	12
2.1.2	Dynamische Systeme	13
2.1.2.1	Die Bloch-Gleichungen	14
2.1.2.2	Der Grenzfall schneller Bewegung	15
2.1.2.3	Die langsame Bewegung	19
2.1.3	Site-directed Spin Labeling	23
2.2	Die Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen	26
2.2.1	Van-der-Waals-Kräfte	26
2.2.2	Elektrostatische Kräfte	27
2.2.3	Hydrophobe Kräfte	29
2.3	Das Modellprotein T4 Lysozym	30
3	Experimentelles	31
3.1	Verwendete Materialien	31
3.2	Herstellung der T4L Mutanten	32
3.2.1	Konstruktion des Plasmids	32
3.2.2	Klonierung der Cysteinmutanten	32
3.2.3	Expression und Reinigung	33
3.2.4	Spinmarkierung	34
3.2.5	Konzentrationsbestimmung	34
3.3	Präparation der Oberflächen	34
3.3.1	Die Quarzoberfläche	35

3.3.2	Die Lipiddoppelschichten	35
3.3.2.1	Vesikellösungen	35
3.3.2.2	Festkörpergestützte Lipiddoppelschichten	36
3.3.2.3	Proteinadsorption	37
3.3.3	Der selbstorganisierende Thiolfilm (SAM)	37
3.4	ESR-Spektroskopie	39
3.4.1	Messungen an Lipiddoppelschichten	41
3.4.2	Messungen in Lösung	43
3.4.3	Aufbau einer Messanordnung für selbstorganisierende Thiofilme	43
3.5	Infrarotspektroskopie	45
3.6	Auswertung und Fehlerbetrachtung	46
3.6.1	Bearbeitung der ESR-Spektren	46
3.6.2	Bestimmung der adsorbierten Menge	46
3.6.3	Weitere Parameter	47
4	Charakterisierung der Modelloberflächen	49
4.1	Die zwitterionische Lipiddoppelschicht	52
4.1.1	Das Modell des effektiven Hamiltonoperators	52
4.1.2	Das Modell der langsamen Bewegung	58
4.1.3	Diskussion der Linienformanalyse	61
4.1.4	Eigenschaften der neutralen Lipiddoppelschicht	64
4.2	Die negativ geladenen Lipiddoppelschichten	66
4.3	Darstellung und Charakterisierung eines chelatisierenden Thiofilms	69
4.4	Zusammenfassung	74
5	Struktur und Orientierung von T4L auf einer Modellmembran	75
5.1	Die Adsorptionseigenschaften der neutralen Lipiddoppelschicht	77
5.2	Winkelabhängige ESR-Spektren des adsorbierten T4 Lysozyms	79
5.2.1	Helixoberflächen	80
5.2.2	N-terminale Enden der Helices	85
5.2.3	Tertiärer Kontakt	87
5.2.4	Loop	87
5.2.5	Doppelmutation	89
5.2.6	Immobilisierung über ein Fusionsprotein mit Annexin12	90
5.3	Diskussion	92
5.3.1	Die Sekundär- und Tertiärstruktur des adsorbierten (His) ₆ -T4 Lysozym	92
5.3.2	Die Orientierung des adsorbierten T4L	97

5.4	Zusammenfassung	103
6	Adsorption an einer Quarzoberfläche	104
6.1	Das Adsorptionsverhalten von T4L auf einer Quarzoberfläche .	105
6.1.1	Analyse der adsorbierten Proteinmenge	105
6.1.2	Diskussion des Adsorptions- und Desorptionsverhaltens	107
6.2	Untersuchung der Oberflächenstruktur von T4 Lysozym	110
6.2.1	Die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche . . .	110
6.2.2	Die Sekundär- und Tertiärstruktur des adsorbierten T4 Lysozyms	110
6.2.2.1	Domäne I	110
6.2.2.2	Domäne II	113
6.2.3	Diskussion der Proteinkonformation bei Adsorption . .	116
6.3	Diskussion des Adsorptionsprozesses	122
6.4	Zusammenfassung	124
7	Proteinadsorption an einer geladenen Lipiddoppelschicht	126
7.1	Untersuchung der Adsorption	127
7.1.1	Das Adsorptionsverhalten des Proteins	127
7.1.2	Die Struktur der negativ geladenen Lipiddoppelschicht in Anwesenheit von T4L	130
7.1.3	Diskussion des Adsorptionsverhaltens	132
7.1.3.1	Die Anbindung im hochionischen Fall	132
7.1.3.2	Die Anbindung bei geringen Ionenstärken . .	136
7.2	Untersuchung der Struktur	139
7.2.1	Qualitative Linienformanalyse der Spektren des spin- markierten T4 Lysozyms	140
7.2.1.1	Das Protein in Lösungen geringer Ionenstärke	140
7.2.1.2	Die Linienform im adsorbierten Zustand . . .	141
7.2.2	Diskussion der Struktur von T4L	146
7.2.2.1	T4L in Lösungen geringer Ionenstärke	146
7.2.2.2	Die Struktur von T4L nach Adsorption auf der negativ geladenen Lipiddoppelschicht . . .	146
7.3	Zusammenfassung	152
8	Zusammenfassung	153
	Literaturverzeichnis	156

A	Abschätzung der Wechselwirkung zwischen T4L und Quarz	171
A.1	Elektrostatik	171
A.2	Van-der Waals Wechselwirkungen	173
A.3	Hydrophobe Wechselwirkungen	173
B	Abkürzungsverzeichnis	175

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die spinmarkierte Seitenkette R1.	3
2.1	Energieniveauschema eines Spinsystems	11
2.2	Effekte der molekularen Anisotropie auf die Gestalt eines ESR-Spektrums	12
2.3	Das spinmarkierte Lipid 7-doxyl-PSPC	17
2.4	Die Beziehung zwischen den Koordinatensystemen zur Beschreibung der langsamen Bewegung	22
2.5	Reaktion des Methanthiosulfonatreagenz I mit Cystein zur Bildung der spinmarkierten Seitenkette R1.	24
2.6	Strukturmodell von T4 Lysozym	30
3.1	Die magnetische Felddichtevertelung in einem sphärischen Resonator [130].	42
3.2	Das Feldlinienschema des magnetischen und elektrischen Feldes in einem TM_{110} Resonator.	44
4.1	Nickelkomplex des Histidinankers des Proteins mit der NTA-Kopfgruppe des Lipids.	50
4.2	ESR-Spektren der DOPC/DOGS-NTA/7-doxyl PSPC (88/ 10/ 2%) Lipide als unilamellare Vesikel bzw. als Lipiddoppelschichten auf Quarz.	53
4.3	ESR-Spektren der DOPC/DOGS-NTA/14-doxyl PSPC (88/ 10/ 2%) Lipide als unilamellare Vesikel bzw. als Lipiddoppelschichten auf Quarz.	54
4.4	Temperaturabhängigkeit der Hyperfeinaufspaltung ΔA der ESR-Spektren der DOPC/DOGS-NTA/7-doxyl PSPC (88/10/2%) Lipiddoppelschicht auf Quarz.	56
4.5	Fit im Rahmen des Modells nach Freed et al. an die Spektren des 14-doxyl PSPC.	59
4.6	Fit im Rahmen des Modells nach Freed et al. an die Spektren des 7-doxyl PSPC	61

4.7	ESR-Spektren der DOPC/DOPS/7-doxyl PSPC (78/20/2%) Lipide als unilamellare Vesikel bzw. als Lipiddoppelschichten auf Quarz.	67
4.8	Hyperfeinaufspaltung ΔA der ESR-Spektren der DOPS ent- haltenden Lipiddoppelschichten auf Quarz	68
4.9	Schematische Darstellung der Präparation selbstorganisieren- der Thiofilme	70
4.10	FT-IR-Spektren des Zwischenprodukts 1 und des Produkt- films 2	71
4.11	Detaillierte FT-IR-Spektren der Filme 1 und 2 in der Region von 1500-1900 cm^{-1}	72
4.12	CH_2 -Streckschwingungsregion des FT-IR-Spektrums von 1 . . .	73
5.1	Reversibilität der Adsorption	77
5.2	Side-on Adsorptionskonformation des ellipsoidal angesehenen T4 Lysozyms	78
5.3	Das Modellprotein T4L	80
5.4	ESR-Spektren der T4L Mutanten, die an Helixoberflächenstel- len markiert sind.	81
5.5	Zusammenfassung der geometrischen Parameter	82
5.6	ESR-Spektren von Helix N-termini	86
5.7	ESR-Spektren der tertiären Kontaktstelle 150R1	88
5.8	Spektren von 22R1 nach Adsorption auf der Lipidoberfläche .	88
5.9	ESR-Spektren der Doppelmutante 22R1-109R1	90
5.10	ESR-Spektren des Fusionsproteins Annexin12-T4L 72R1	91
5.11	Die möglichen Bindungsrotationen der spinmarkierten Seiten- kette	98
5.12	Orientierung von T4L auf der zwitterionischen Lipidoberfläche.	101
6.1	Konzentrationsabhängigkeit der adsorbierten Proteinmenge . .	106
6.2	Desorption von 109R1 nach Adsorption auf der Quarzoberfläche	107
6.3	ESR-Spektren der Mutanten in der N-terminalen Domäne nach Adsorption auf Quarz	111
6.4	Verlauf der beiden Komponenten in den Spektren von 4R1 mit der Bedeckung	112
6.5	ESR-Spektren der Stellen in der Helix C (A) nach Adsorption auf der Quarzoberfläche	114
6.6	ESR-Spektren der Mutanten in der C-terminalen Domäne nach Adsorption auf der Quarzoberfläche	115
6.7	Die zentralen peak-to-peak Linienbreiten der Spektren der Mu- tanten in der C-terminalen Domäne	116

6.8	ESR-Spektren von 131R1 nach Adsorption bei verschiedenen Ionenstärken	117
6.9	Skizze des vorgeschlagenen Mechanismus der Adsorption von T4L auf Quarz.	125
7.1	Vergleichsexperiment der Adsorption auf den unterschiedlichen Lipidoberflächen	128
7.2	Desorptionsverhalten der Proteine	129
7.3	Konzentrationsabhängigkeit der adsorbierten Proteinmenge . .	130
7.4	Hyperfeinaufspaltung der ESR-Spektren der 14-doxyl markierten Lipidfilme	131
7.5	Hyperfeinaufspaltung der ESR-Spektren der 7-doxyl markierten Lipidfilme	132
7.6	Markierte Stellen von T4L	139
7.7	ESR-Spektren der verwendeten Mutanten in Lösungen subphysiologischer Ionenstärke	140
7.8	ESR-Spektren der T4L Mutanten 4R1, 109R1 und 131R1 nach Adsorption	141
7.9	Veränderung des Linienformparameters ΔH_0 der Spektren der untersuchten Mutanten bei Adsorption.	142
7.10	ESR-Spektren von 150R1	143
7.11	Veränderung der ESR-Linienform von 150R1 bei Waschen mit Puffern sukzessive erhöhter Ionenstärke.	143
7.12	Abhängigkeit der ESR-Linienform von der Ionenstärke des Puffers	144
7.13	ESR-Spektrum von 22R1-109R1	145
7.14	Reproduktion der ESR-Spektren des Alzheimer Amyloid- β -Peptid	150

Kapitel 1

Einleitung

Der Kontakt eines Proteins mit einer festen Grenzfläche ruft üblicherweise eine Antwort der Proteinstruktur auf die zusätzliche Wechselwirkung hervor. Derartige Prozesse können ungewollt sein, wie im Falle der Proteinadsorption auf Implantaten, die im ungünstigsten Fall zu einer Abstoßungsreaktion des Körpers führt. In der Membranbiochemie sind sie dagegen Bestandteile eines funktionierenden Organismus, in dem Proteine die einzelnen Membranfunktionen wie Transport, Kommunikation und Energietransfer vermitteln. Veränderungen von Membranen können jedoch auch hier zu unerwünschten Strukturänderungen der assoziierten Proteine führen. So wird in jüngster Zeit die Rolle des negativ geladenen Lipids Phosphatidylserin bei der Bildung von Aggregaten missgefalteter Proteine diskutiert, die an Krankheiten wie z.B. Alzheimer beteiligt sind [145].

Grundlage sowohl der Entwicklung biokompatibler Materialien als auch der detaillierten Erforschung von Membranprozessen ist die Kenntnis der Struktur der adsorbierten Proteine in Abhängigkeit der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche. Die Anforderung an eine experimentelle Methode zur Strukturuntersuchung adsorbierter Proteine, welche die Beobachtung derartiger Fragestellungen erlaubt, gehen über die Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur hinaus und schließen die Ermittlung oberflächenspezifischer Eigenschaften wie Orientierung und zweidimensionale Organisation der Adsorbate ein.

In der Vergangenheit wurden eine Reihe verschiedener Analysemethoden verwendet, um strukturelle Informationen adsorbierter Proteine zu erhalten [45, 96, 17]. Zu diesen gehören oberflächensensitive Varianten der Schwingungsspektroskopie wie z.B. abgeschwächte Totalreflektions-Infrarot-Spektroskopie (ATR-IR) [97] oder oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie [78]. Auch nicht-lineare Techniken (wie z.B. Summenfrequenzspektroskopie [138]) sowie Fluoreszenzspektroskopie [25] und Zirkulardichroismus [84] wer-

den eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methoden konnten globale Aussagen über die Sekundärstruktur adsorbierter Proteine getroffen und Tendenzen der strukturellen Umwandlungen wiedergegeben werden.

Die Orientierung adsorbierter Proteine wurde bisher hauptsächlich für solche Proteine bestimmt, die Chromophore enthalten. Deren Ausrichtung kann durch optische Techniken ermittelt werden [78, 101, 143]. Eine exakte Bestimmung der Schichtdicke mittels Neutronenstreuung erlaubt zudem erste Aussagen über die Orientierung von Proteinen, die keinen Chromophor besitzen aber eine räumlich unregelmäßige Form haben [125]. Die klassischen Methoden der Proteinstrukturanalyse, die eine atomare Auflösung erlauben, Kristallstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie, finden in der Untersuchung von Grenzflächen nur wenig Anwendung. So ist die Röntgenbeugung auf die Untersuchung kristalliner Proben beschränkt, die bei der Adsorption von Proteinen nur in den seltensten Fällen vorliegen [120, 8, 12]. Die Anwendung der NMR-Spektroskopie wird hingegen durch die großen Rotationskorrelationszeiten der Grenzflächensysteme behindert. Daher müssen Festkörper-NMR Techniken angewandt werden, die allerdings nur in wenigen Beispielen erfolgreich zu einer Strukturaufklärung adsorbierter Proteine geführt haben [122].

Die ESR-Spektroskopie ist aufgrund der tensoriellen Natur der Wechselwirkung zwischen Spin und Magnetfeld intrinsisch orientierungssensitiv. Anhand eines orientierten Nitroxidfilms konnte in vorangegangenen Untersuchungen bereits gezeigt werden, dass eine geeignete Simulation der ESR-Linienform die Bestimmung der Orientierung geordneter Adsorbate auf Festkörperoberflächen ermöglicht [6]. Zudem konnte die Sensitivität der ESR-Spektroskopie für die Analyse von Adsorbaten in submonomolekularer Bedeckungen herausgestellt werden [115]. Um diamagnetische Moleküle der ESR-spektroskopischen Analyse zuzuführen, bedient man sich der Einführung von Spinsonden, die in den meisten Fällen ebenfalls Nitroxide sind. Die besondere Empfindlichkeit der ESR-Linienform für die Rotationsdynamik großer spinmarkierter Moleküle wurde bereits in Untersuchungen selbstorganisierender Fettsäurefilme auf Aluminiumoxid deutlich, in denen die Dynamik der Filme detailliert aufgeklärt werden konnte [109, 108]. Sie beruht darauf, dass die Rotationen der Moleküle im Zeitfenster der ESR-Spektroskopie ablaufen und sich daher direkt in der ESR-Linienform niederschlagen.

Eine derartige Spinsondentechnik wurde in den letzten Jahren ebenfalls für die Untersuchung von Proteinen entwickelt [52, 51]. In der sogenannten Site-directed Spin Labeling Technik (SDSL) wird eine beliebige Aminosäure eines Proteins auf molekularbiologischem Wege durch eine andere ersetzt, die spezifisch mit einem Spinmarkierungsreagenz zur Reaktion gebracht wird. Es wurden bereits geeignete Spinmarker entwickelt (s. Abbildung 1.1), die der-

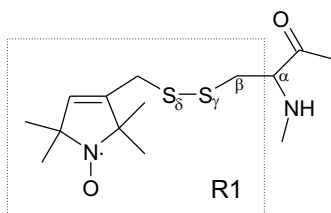


Abbildung 1.1: Die spinmarkierte Seitenkette R1.

art an das Proteinrückgrat koppeln, dass die Dynamik der spinmarkierten Seitenkette lediglich von der Bewegung des Proteinrückgrats und der lokalen Umgebung beeinflusst wird und zudem im sensitiven Zeitfenster der ESR-Spektroskopie stattfindet [91]. Durch Analyse der ESR-Spektren der spinmarkierten Seitenketten werden strukturelle und dynamische Informationen über Proteine zugänglich, die neben der Sekundär- und Tertiärstruktur auch die globale Bewegung einzelner Proteinsegmente beinhalten [21]. Auf diese Weise wird die außerordentliche Energieauflösung der ESR-Spektroskopie (im Bereich von 10^{-8} eV) mit der örtlichen Auflösung einer Sondentechnik verbunden. Diese Methode ist zudem nicht auf spezifische Probenumgebungen, wie z.B. ein kristallines Ensemble, beschränkt und erlaubt als in-situ Methode die Verfolgung struktureller Veränderungen, wie z.B. bei Lichtaktivierung des Rhodopsins [32].

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Anwendung der Site-directed Spin Labeling Technik auf die Analyse der Struktur und Dynamik von Proteinen, die auf planaren Oberflächen adsorbiert sind. Hiermit sollen die Einflüsse von Oberflächen bekannter Eigenschaften auf die Struktur eines adsorbierten Proteins aufgeklärt werden.

Nachdem eine vorangehende Untersuchung bereits erwiesen hat, dass die ESR-Spektroskopie die Sensitivität zur Untersuchung einer Proteinmonolage bereit stellt [110], sollen nun die Möglichkeiten untersucht werden, welche die bisher entwickelten Methoden des SDSL für die Strukturanalyse auf planaren Oberflächen adsorbierter Proteine bieten. So wurden Methoden der qualitativen [54, 93] als auch quantitativen Linienformanalyse der ESR-Spektren von spinmarkierten Proteinen vorgeschlagen [21, 19, 20, 72], deren Nutzen zur Charakterisierung adsorbierter Proteine zu prüfen ist. Hierbei ist insbesondere die Bestimmung der Proteinorientierung von Interesse. Eine Extraktion geometrischer Informationen aus ESR-Spektren dynamischer Systeme ist jedoch nicht trivial. Risse et al. konnten durch ESR-Linienformanalyse im Rahmen des einfachen Modells (auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie) schneller Bewegungen der Spinmarker bereits zeigen, dass die ESR-Spektroskopie

prinzipiell zur Bestimmung der Orientierung adsorbierter Proteine geeignet ist. So konnte die Ausrichtung einer Helix des zweidimensional kristallisierenden Proteins Annexin 12 im Einklang mit der bereits bekannten Kristallstruktur des Adsorbats reproduziert werden [110]. Die Entwicklung einer derartigen Analyse für nicht-kristalline Ensemble in der physikalisch exakteren, quantenmechanischen Beschreibung der ESR-Linienform [14, 6, 109] ist daher Teil dieser Arbeit. Der somit entwickelte analytische Apparat wird auf die Charakterisierung der Wechselwirkung des Modellproteins mit definierten Oberflächen angewandt. Dabei lassen sich drei übergeordnete Fragestellungen formulieren, die anhand der untersuchten Systeme diskutiert werden:

- Welche Eigenschaften haben biologische Membrane, die eine Integrität der adsorbierten Proteine gewährleisten?
- Wie reagiert ein Protein auf eine spezifische Störung z.B. durch zusätzliche Ladungsträger in der Oberfläche?
- Welche Bedeutung kommt Protein-Protein-Wechselwirkungen in dem Adsorptionsprozess zu?

Hierfür wird das in Lösung und mittels Kristallstrukturanalyse bereits intensiv charakterisierte, kleine, globuläre Protein T4 Lysozym als Modellprotein verwendet und dessen strukturelle Antwort auf die Wechselwirkung mit Oberflächen variiert abgefragt. Dies sind hauptsächlich fluide, orientierte Modellmembrane, die als einzelne Lipiddoppelschichten auf Quarzträgern hergestellt werden und deren Eigenschaften durch Variation der Lipidzusammensetzung eingestellt werden können. Diese werden ebenfalls ESR-spektroskopisch charakterisiert und Änderungen bei Wechselwirkungen mit dem Protein verfolgt. Als Referenzsystem einer nicht-biomimetischen, rigiden Oberfläche dient die Adsorption an einer Quarzoberfläche.

Nachdem Kapitel 2 die theoretischen Grundlagen und Kapitel 3 die durchgeführten Experimente eingeführt haben, wird in Kapitel 4 die Charakterisierung der Modelloberflächen vorgestellt. Kapitel 5 behandelt den Fall geringer Wechselwirkung zwischen Modellprotein und Oberfläche, wie sie für eine ungeladene Lipiddoppelschicht erwartet wird. Die ESR-spektroskopische Strukturaufklärung erfolgt mittels Simulation der ESR-Spektren, bei der eine Methode zur Bestimmung der Proteinorientierung vorgestellt wird. In Kapitel 6 wird die Struktur von T4 Lysozym nach Wechselwirkung mit einer Quarzoberfläche beschrieben. Kapitel 7 legt die Bedeutung einer gleichzeitigen Analyse von Modellmembran und adsorbiertem Protein anhand des Beispiels elektrostatischer Wechselwirkungen dar.

Kapitel 2

Theorie

In diesem Kapitel sollen die Grundlagen zu den in dieser Arbeit behandelten Systemen und Methoden gelegt werden. Dies beinhaltet einerseits eine Einführung in die Elektronenspinresonanzspektroskopie, die im ersten Teil (2.1) dargelegt wird. Da eine vollständige Darstellung den Rahmen einer derartigen Arbeit sprengen würde, werden lediglich die wesentlichen Begriffe erläutert und das Hauptaugenmerk auf die Ansätze der durchgeführten ESR-Linienformanalysen gelegt. Für eine vollständige Diskussion soll auf die Literatur verwiesen werden [2]. Im zweiten Teil (2.2) werden die physikalischen Prozesse vorgestellt, die nach bisherigem Wissensstand an der Interaktion der Oberfläche mit einem Protein beteiligt sind. Im dritten Teil wird das benutzte Modellprotein eingeführt (2.3).

2.1 Die ESR-Spektroskopie

Zunächst werden die grundlegenden Prinzipien der ESR-Spektroskopie anhand eines nicht-dynamischen Systems erläutert. In Abschnitt 2.1.2 wird dann die Auswirkung der Dynamik der untersuchten Spezies auf die Linienform von ESR-Spektren diskutiert.

2.1.1 Die ESR-Parameter

2.1.1.1 Das freie Elektron

Das magnetische Moment eines freien Elektrons ist direkt proportional zum Eigendrehimpuls des Elektrons \vec{S} :

$$\vec{\mu}_S = -\frac{g_e \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot \vec{S} \quad (2.1)$$

Dabei bezeichnet μ_B das Bohrsche Magneton, die Einheit des magnetischen Moments (JT^{-1}), und \vec{S} den Spinoperator. Der sogenannte Landé-Faktor (g) ist eine teilchenspezifische dimensionslose Konstante, die für den Spinnagnetismus des freien Elektrons den Wert $g_e = 2.002319$ hat [140].

Bringt man ein freies Elektron in ein statisches magnetisches Feld \vec{B} , beobachtet man eine Energieaufspaltung der im feldfreien Fall entarteten Spinzustände. Dieser Effekt wird als Zeeman-Effekt bezeichnet. Die zugrunde liegende Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment des Spins und dem Magnetfeld lässt sich durch folgenden Hamiltonoperator beschreiben:

$$\mathbf{H} = \frac{g_e \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot \vec{S} \cdot \vec{B} \quad (2.2)$$

Hieraus ergibt sich im isotropen Fall die Aufspaltung der zwei Spinzustände des Elektrons ($S = 1/2$) im äußeren Feld (der Flussdichte B_0) zu:

$$\Delta E = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (2.3)$$

Anregungen zwischen den beiden hieraus resultierenden Niveaus sind die Grundlage der ESR-Spektroskopie.

2.1.1.2 Die molekulare Umgebung

Für ein ungepaartes Elektron in molekularer Umgebung müssen zunächst im Zeeman-Anteil des Hamiltonoperators auch die Wechselwirkungen des Bahndrehimpulses \vec{L} des Elektrons mit dem magnetischen Feld sowie die des eventuell vorhandenen Kernspins mit dem Feld berücksichtigt werden. Da jedoch in erster Ordnung nur Übergänge ohne Veränderungen der Kernquantenzahl erlaubt sind und zudem das Kernmagneton um ca. drei Größenordnungen kleiner ist als das Bohrsche Magneton, kann der Beitrag des Kernspins bei der folgenden Behandlung vernachlässigt werden, so dass sich der Zeeman-Hamiltonoperator ergibt zu:

$$\mathbf{H}_{\text{Zeeman}} = \frac{g_e \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot \vec{S} \cdot \vec{B} + \frac{\mu_B}{\hbar} \cdot \vec{L} \cdot \vec{B} \quad (2.4)$$

Des Weiteren trägt die Kopplung des Bahndrehimpulses an den Spin des Elektrons zu der Spinenergie bei und führt somit zu der wesentlichen Veränderung der Zeeman-Aufspaltung im molekularen Fall im Vergleich zum freien Elektron. Die Spin-Bahn-Wechselwirkungen sind insbesondere dann bedeutend, wenn zwei Orbitale eine Energiedifferenz aufweisen, die nicht viel größer ist als die Elektron-Zeeman-Energie. Im Gegensatz zu Nebengruppenmetallionen sind diese Effekte für die meisten organischen Radikale jedoch klein. Dies ist durch das „Quenchen“ des Bahndrehimpulses von Elektronen in nicht

entarteten Orbitalen begründet. Jede nicht entartete Einelektronwellenfunktion kann durch geeignete Phasenwahl als reelle Funktion dargestellt werden. Der Drehimpulsoperator ist jedoch rein imaginär. Somit muss der Eigenwert des Bahndrehimpulses null sein und damit auch die Spin-Bahn-Wechselwirkung verschwinden.

Somit besteht der gesamte Spin-Hamiltonoperator bei Abwesenheit von weiteren Kern- oder Elektronenspins aus einem Zeeman- und einem Spin-Bahn-Term:

$$\mathbf{H} = \mathbf{H}_{\text{Zeeman}} + \mathbf{H}_{LS} \quad (2.5)$$

Im Fall des freien Elektrons verbindet der g-Faktor des Elektrons das äußere Magnetfeld, das angelegt werden muss, mit der Frequenz der Mikrowellenstrahlung, die ein Umklappen der Spins induzieren kann. Um zu einer analogen Beschreibung der Wechselwirkung eines Spins im Molekül mit einem äußeren magnetischen Feld zu gelangen, wird die in Gleichung 2.5 angegebene Wechselwirkung als Störung der übrigen Teile des elektronischen Hamiltonoperators (kinetische Energie, Coulombenergie etc.) behandelt, da sie im Vergleich zu den anderen Beiträgen sehr klein ist. Die störungstheoretische Behandlung 1. Ordnung ergibt einen Störoperator, der dem Fall des freien Elektrons gleicht und eine isotrope Wechselwirkung beschreibt. Die 2. Ordnung ergibt einen anisotropen Beitrag, der die Wechselwirkung zweier Spins über die Spin-Bahn-Kopplung berücksichtigt.

$$\begin{aligned} \mathbf{H}_{\text{Spin}} &= \mathbf{H}_{\text{Spin}}^{(1)} + \mathbf{H}_{\text{Spin}}^{(2)} \\ &= \frac{g_e \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot \vec{S} \cdot \vec{B} - 2 \cdot \frac{\mu_B}{\hbar} \cdot \varsigma \cdot \sum_{i,j=x,y,z} \Lambda_{ij} \cdot B_i \cdot S_j \\ &= \frac{\mu_B}{\hbar} \cdot \sum_{i,j=x,y,z} g_{ij} \cdot B_i \cdot S_j \end{aligned} \quad (2.6)$$

mit

$$\Lambda_{ij} = \sum_{n \neq 0} \frac{\langle 0 | L_i | n \rangle \cdot \langle n | L_j | 0 \rangle}{E_n^{(0)} - E_0^{(0)}} \quad (2.7)$$

$$g_{ij} = g_e \cdot \delta_{ij} - 2 \cdot \varsigma \cdot \Lambda_{ij} \quad (2.8)$$

Hierbei bezeichnet ς die Spin-Bahn Kopplungskonstante. Gleichung 2.6 kann auch analog zu Gleichung 2.2 formuliert werden, indem man den g -Faktor durch die in Gleichung 2.8 definierte Matrix ersetzt:

$$\mathbf{H} = \frac{\mu_B}{\hbar} \cdot \vec{S} \cdot \hat{g} \cdot \vec{B} \quad (2.9)$$

$\hat{\mathbf{g}}$ ist anisotrop und symmetrisch. Dies bedeutet, dass er stets diagonalisierbar ist. Der anisotrope Anteil Λ ist zudem spurlos, was bei der Diskussion der Dynamik von Bedeutung sein wird.

Schließlich führt die Anwesenheit eines weiteren Spins oder eines Kernspins in naher Umgebung zu einem nicht zu vernachlässigen Anteil an Spin-Spin-Kopplungen. Im überwiegenden Teil dieser Arbeit wurde je ein Elektronenspin pro Protein eingeführt. Daher werden die Grundlagen der Wechselwirkungen mit weiteren Elektronenspins gesondert in Abschnitt 2.1.2 eingeführt und im Folgenden vernachlässigt.

Die Wechselwirkung des Kernspins I mit dem Elektronenspin wird in der Atomphysik als Hyperfeinwechselwirkung bezeichnet. In der Näherung quantenmechanisch „großer“ Entfernungen r kann sie als klassische Dipol-Dipol-Wechselwirkung beschrieben werden.

$$\mathbf{H}_{\text{HF,dip}} = \gamma_e \cdot \gamma_k \cdot \left(\frac{3 \cdot (\vec{S} \cdot \vec{r}) \cdot (\vec{S} \cdot \vec{r})}{r^5} - \frac{\vec{S} \cdot \vec{I}}{r^3} \right) \quad (2.10)$$

wobei γ_e und γ_k die gyromagnetischen Verhältnisse von Elektron und Kern sind.

Für ein Elektron in einem s-Orbital kann aufgrund der sphärischen Symmetrie nicht von einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung gesprochen werden. Die trotzdem beobachtete Hyperfeinaufspaltung resultiert hier aus der Fermi-Kontaktwechselwirkung, da ein s-Elektron eine von null verschiedene Aufenthaltswahrscheinlichkeit am Kernort besitzt. Die Wechselwirkung wird näherungsweise beschrieben durch [2]:

$$\mathbf{H}_{\text{HF,Fermi}} = \gamma_e \cdot \gamma_k \cdot \left(\frac{8 \cdot \pi}{3} \cdot \Psi^*(0) \cdot \Psi(0) \cdot \vec{S} \cdot \vec{I} \right) \quad (2.11)$$

$\Psi(0)$ bezeichnet die Wellenfunktion des Elektrons am Ort des Kerns. Diese Wechselwirkung ist proportional zur integralen Aufenthaltswahrscheinlichkeit am Kernort und somit räumlich isotrop. Die gesamte Hyperfeinwechselwirkung ergibt sich aus der Summe aus anisotropem und isotropem Anteil.

In einer zur Bestimmung von $\hat{\mathbf{g}}$ analogen Vorgehensweise, die jedoch einer komplizierteren störungstheoretischen Analyse bedarf [38], [2], kann auch die Hyperfeinwechselwirkung durch eine einzige Wechselwirkungsmatrix \hat{A} beschrieben werden, die ebenso wie $\hat{\mathbf{g}}$ symmetrisch ist und sich additiv aus einem spurlosen, anisotropen und einem isotropen Anteil ergibt.

$$\mathbf{H}_{\text{HF}} = \sum_{i,j} \left(A_{ij}^{\text{anisotrop}} + \delta_{ij} \cdot a_{\text{iso}} \right) \cdot S_i \cdot I_j = \vec{S} \cdot \hat{A} \cdot \vec{I} \quad (2.12)$$

Streng genommen beziehen sich Tensoren in der Physik immer auf ein bestimmtes Koordinatensystem, während es in der Magnetresonanz üblich ist, separate Koordinatensysteme für Feld, Elektronenspin und z.B. Kernspin zu benutzen. Dies verändert die Transformationseigenschaften von \hat{g} und \hat{A} . Für den hier verwendeten Nitroxidmarker entfällt dies, da in die Hauptachsen der beiden Tensoren als kongruent angenommen werden können [71].

2.1.1.3 Wechselwirkung mit weiteren Elektronenspins

Für die Wechselwirkung zweier Elektronenspins kann, analog der Hyperfeinwechselwirkung, nach dem Korrespondenzprinzip ein Hamiltonoperator für die Dipol-Dipol-Wechselwirkung aufgestellt werden.

$$\mathbf{H}_{DD} = \frac{\mu_0}{2 \cdot \hbar} \cdot g_j \cdot g_k \cdot \mu_B^2 \cdot \left(\frac{\vec{S}_j \cdot \vec{S}_k}{r_{jk}^3} - \frac{3 \cdot (\vec{S}_j \cdot \vec{r}_{jk}) \cdot (\vec{S}_k \cdot \vec{r}_{jk})}{r^5} \right) \quad (2.13)$$

(μ_0 ist die Permeabilität des Vakuums)

Es wird deutlich, dass die Wechselwirkung proportional zu r^{-3} ist und daher zur Abstandsbestimmung genutzt werden kann. Auch Gleichung 2.13 lässt sich in tensorieller Form schreiben:

$$\mathbf{H}_{DD} = \vec{S} \cdot \hat{D} \cdot \vec{S} \quad (2.14)$$

wobei der Gruppenspin $\vec{S} = \vec{S}_1 + \vec{S}_2$ eingeführt wurde und \hat{D} die Wechselwirkungsmatrix der dipolaren Kopplung bezeichnet. Da der Interspinabstand vektoriell in Gleichung 2.13 eingeht, ist die dipolare Kopplung nicht nur vom Abstandsbetrag sondern auch von der Richtung des Interspinvektors abhängig. Für ein rigides System kann man, falls Austauschwechselwirkungen vernachlässigbar¹ und beide Spins entlang der Magnetfeldrichtung quantisiert sind, Gleichung 2.13 wesentlich vereinfachen. Dies gilt im Rahmen der sogenannten Hochfeldnäherung. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Elektronen-Zeeman-Wechselwirkung die dominierende Wechselwirkung ist. Für die restlichen Wechselwirkungen im Hamiltonoperator des Spinsystems gilt, dass ihre Energien viel kleiner sind als der zeitunabhängige Anteil der Zeeman-Wechselwirkung im Laborsystem (in dem das äußere Magnetfeld definiert ist). Unter dieser Voraussetzung kann man sich auf die säkularen Terme des Hamiltonoperators beschränken. Diese vertauschen mit dem Zeeman-Operator und ergeben sich aus der Störungsrechnung erster Ordnung. Einfacher gesagt,

¹Die bindungsvermittelte Austauschwechselwirkung $\mathbf{H} = J \cdot \vec{S}_1 \cdot \vec{S}_2$ kann gemäß Erfahrungswerten für die verwendeten Radikale für Abstände größer als 8Å vernachlässigt werden.

können die Spins als voneinander unabhängig betrachtet werden und jeweils alle durch die Quantenzahlen gegebenen Zustände einnehmen.

Die beschriebenen Annahmen sind für statische organische Radikale erfüllt. Es ergibt sich somit, wenn $g_j \approx g_k \approx g_e$:

$$\mathbf{H}_{DD} = \frac{\mu_0}{2 \cdot h \cdot r_{jk}^3} \cdot g_e^2 \cdot \mu_B^2 (3 \cdot \cos^2 \theta_{DD} - 1) \quad (2.15)$$

wobei θ_{DD} den Winkel zwischen dem Interspinvektor und der Magnetfeldrichtung angibt. Somit lässt sich z.B. in einem Einkristall neben dem Abstand auch die Orientierung der Spinverbindungsachse in Bezug auf das Kristallkoordinatensystem bestimmen.

2.1.1.4 Die resultierenden Energieeigenwerte

Während die Energieeigenwerte des freien Elektrons wie in 2.1.1.1 angegeben direkt aufgeschrieben werden können, ist dies im molekularen Fall nicht so einfach möglich. Daher wird in diesem Rahmen nur der isotrope Fall veranschaulicht, aus dem die generelle Struktur eines ESR-Spektrums ableitbar ist, und der anisotrope Fall qualitativ diskutiert.

Als Beispiel gelte ein Radikal in Lösung. Die relevanten Wechselwirkungen sind hier Zeeman- und Hyperfeinwechselwirkung. Da die anisotropen Beiträge des \hat{g} - und \hat{A} -Tensors durch spurlose Matrizen beschrieben werden können (s. Abschnitt 2.1.2), führt eine quantenmechanische Mittelung (dies entspricht einer Integration über die Einheitskugel) zum Verschwinden dieser Beiträge. In einem solchen Falle sind die entsprechenden Kopplungskonstanten isotrop. Ausgegangen wird wiederum von der Hochfeldnäherung. Wird die Richtung des äußeren Magnetfeldes in z gelegt, so können alle Terme in x und y vernachlässigt werden, und der Hamiltonoperator ergibt sich in Frequenzdarstellung zu:

$$\mathbf{H} = \omega_S \cdot S_z + \omega_I \cdot I_z + a_{\text{iso}} \cdot S_z \cdot I_z \quad (2.16)$$

wobei ω_S die Elektronen-Zeemanfrequenz, ω_I die Kern-Zeemanfrequenz und a_{iso} die anisotrope Hyperfeinaufspaltung bezeichnet. Der Ausdruck der Energie (in Winkelfrequenzen) lässt sich hieraus direkt ableiten:

$$\omega(m_S, m_I) = m_S \cdot \omega_S + m_I \cdot \omega_I + m_S \cdot m_I \cdot a_{\text{iso}} \quad (2.17)$$

wobei m_S und m_I die Elektronen- bzw. Kernspinquantenzahl darstellen. Für ein Nitroxidradikal, wie in dieser Arbeit als Sonde verwendet, existieren zwei mögliche Elektronenspinquantenzahlen und, da $I(N) = 1$, drei mögliche Kernspinquantenzahlen. Das in Abbildung 2.1 angegebene Energieniveauschema stellt dies schematisch dar. Für den Fall eingefrorener Dy-

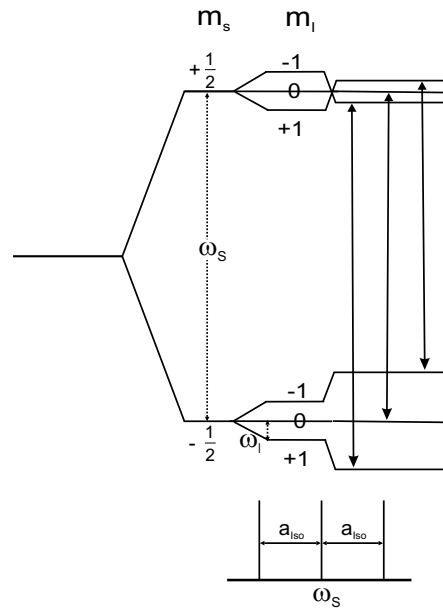


Abbildung 2.1: Oben: Energieniveauschema eines Spinsystems bestehend aus einem Elektronenspin $S=1/2$ und einem Kernspin $I=1$ mit der positiven isotropen Hyperfeinkopplung a_{iso} . ω_S bezeichnet die Elektronen-Zeemanfrequenz und ω_I die Kern-Zeemanfrequenz. Die Pfeile deuten die ESR-erlaubten Übergänge an. Unten: Schematisches Spektrum

namik muss dagegen der tensoriellen Natur von \hat{g} und \hat{A} Rechnung getragen werden. Dies führt, wie in Abbildung 2.2 dargestellt, zu unterschiedlichen ESR-Spektren, wenn im Gedankenexperiment das Magnetfeld jeweils entlang einer der drei Hauptachsen von \hat{A} und \hat{g} angelegt wird. Im Falle einer zufälligen Anordnung der Moleküle im Feld (z.B. als Pulver) tragen alle Beiträge entsprechend ihrer Richtungs cosine mit dem Magnetfeld zum ESR-Spektrum bei. Hieraus resultiert das in Abbildung 2.2 unten dargestellte, kompliziertere breite Pulverspektrum.

Um die entsprechenden Energieeigenwerte zu berechnen, müssen das magnetische Feld, das im Laborkoordinatensystem eine Richtung auszeichnet und \hat{g} und \hat{A} , die im Molekülkoordinatensystem definiert sind, in ein gemeinsames Koordinatensystem transformiert werden. Für den so erhaltenen Hamiltonoperator werden stationäre Lösungen der Schrödingergleichung mittels Störungstheorie ermittelt. Die ausführliche Darstellung findet sich in der Dissertation von Beckendorf [5].

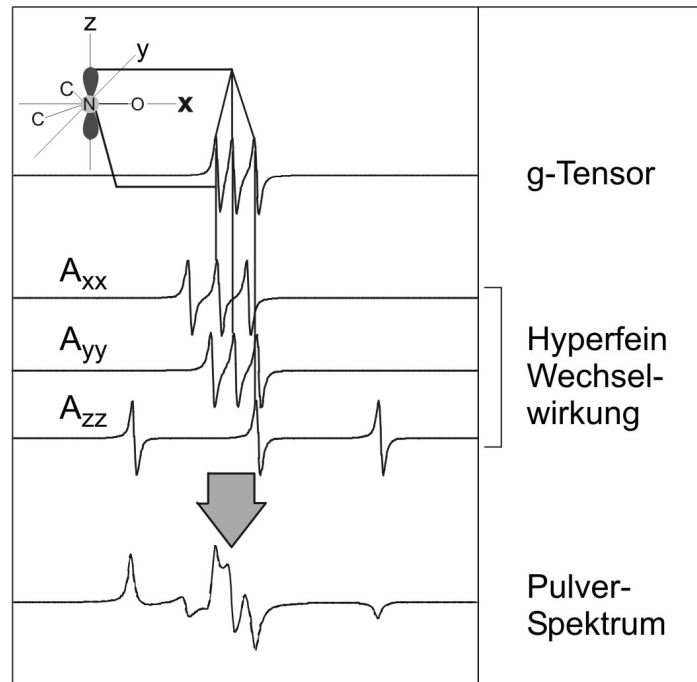


Abbildung 2.2: Effekte der molekularen Anisotropie auf die Gestalt eines ESR-Spektrums

2.1.1.5 Die Resonanzbedingung

Um die Energieeigenwerte eines Systems auch spektroskopisch erfassen zu können, bedarf es experimentell anregbarer Übergänge. In der Elektronenspinresonanz wird daher zusätzlich zum statischen Magnetfeld ein zeitlich veränderliches, schwaches Magnetfeld angeregt. Damit dieses Übergänge induziert, muss es senkrecht zum aufspaltenden homogenen Magnetfeld orientiert sein (üblicherweise wird hier die x -Richtung gewählt). Hiermit enthält der Hamiltonoperator einen weiteren, zeitlich veränderlichen Term:

$$\mathbf{H}_{\text{MW}}(t) = g_e \cdot \mu_B \cdot \vec{S} \cdot \vec{B}_1(t) \quad (2.18)$$

Da dieses Mikrowellenfeld in der Amplitude wesentlich kleiner ist als das stationäre Feld, kann es als periodische Störung des stationären Problems behandelt werden. Nach Fermis goldener Regel ergibt sich für die Übergangswahrscheinlichkeit von Zustand i nach f (mit den Energieeigenwerten E_f und E_i):

$$W_{fi} = \frac{2 \cdot \pi}{\hbar} \cdot |\langle f | \mathbf{H}_{\text{MW}} | i \rangle|^2 \cdot \delta(E_f - E_i - \hbar \cdot \omega) \quad (2.19)$$

Um hieraus die erlaubten Übergänge zu bestimmen, schreibt man H_{MW} mit Hilfe der Auf- und Absteigeoperatoren des Drehimpulses.

$$\mathbf{H}_{\text{MW}}(t) = g_e \cdot \mu_B \cdot \vec{B}_1 \cdot \left\{ \vec{S}_+ \cdot e^{-i\omega t} + \vec{S}_- \cdot e^{+i\omega t} \right\} \quad (2.20)$$

\vec{S}_+ entspricht der Absorption, \vec{S}_- der induzierten Emission. Hieraus ergibt sich bei kleinen Mikrowellenfeldern die Auswahlregel für die Quantenzahl des Elektronenspins:

$$\Delta m_S = 1 \quad (2.21)$$

2.1.2 Dynamische Systeme

Befindet sich das beobachtete System nicht, wie bisher angenommen, in Ruhe, resultieren die spektroskopisch erfassten Energieniveaus aus einer zeitlichen Mittelung über die statischen Zustände des Systems. Dies bedeutet, dass aus der Linienform eines ESR-Spektrums neben den diskutierten stationären, magnetischen Eigenschaften des untersuchten Systems auch Informationen über dessen Dynamik extrahiert werden können. Die Dynamik eines Spinsystems ist direkt verknüpft mit der Spinrelaxation. Im thermischen Gleichgewicht existiert ein Besetzungszahlunterschied der Spinniveaus, der durch das eingestrahlte Wechselfeld schnell ausgeglichen würde. Erst die strahlungslose Deaktivierung der angeregten Zustände durch Wechselwirkung mit der Umgebung erlaubt die spektroskopische Untersuchung. Die Lebensdauer der kohärenten Zustände, die durch Anregung mittels linear polarisierter Mikrowellenstrahlung erzeugt werden, wird durch Spin-Spin-Wechselwirkung endlich und ermöglicht somit die Beobachtung endlicher Linienbreiten. Diese Wechselwirkungen werden nun entscheidend von der Dynamik des Systems geprägt. In einem rigiden System gehen diese dynamischen Effekte lediglich in die Linienbreiten ein. Demgegenüber resultieren Moleküldynamiken, die in Zeitskalen größer oder gleich derjenigen der ESR-Spektroskopie ablaufen, in einer ESR-spektroskopisch sichtbaren Veränderung der Orientierung der Moleküle, die wiederum die Energieeigenwerte beeinflussen. Üblicherweise werden drei Grenzfälle unterschieden: Dynamische Systeme, deren charakteristische Zeitkonstanten größer sind als 50 ns, sind im cw-Experiment im X-Band als statisch anzusehen. Liegt die Zeitskala unterhalb von ca. 1 ns, so werden die anisotropen Beiträge vollständig gemittelt und der in Abschnitt 2.1.1 wiedergegebene Apparat genügt zur Beschreibung der Struktur des ESR-Spektrums. Eine genaue Wiedergabe von relativen Intensitäten und Linienbreiten ist jedoch nur unter Berücksichtigung der Relaxationsprozesse möglich. Den kompliziertesten Fall stellt die langsame Bewegung ($\tau \approx 15$ ns)

dar, die auf Zeitskalen der ESR-Spektroskopie abläuft. In diesem Fall werden die anisotropen Beiträge der Tensoren nicht vollständig ausgemittelt. Da ein bewegtes magnetisches Moment selbst ein Magnetfeld erzeugt, überlagern sich in einem Ensemble diese zu einem fluktuierenden Magnetfeld. Sind die charakteristischen Zeiten des Relaxationsprozesses und die dieser dynamischen Magnetisierung in ähnlichen Bereichen, so beeinflussen sich Relaxation und dynamische Mittelung gegenseitig und können nicht mehr getrennt voneinander betrachtet werden. Vielmehr müssen nun Form, Frequenz und Amplitude der Bewegung sowie die komplette quantenmechanische Information der beschriebenen ESR-Parameter zur Linienformanalyse herangezogen werden (s. 2.1.2.3).

2.1.2.1 Die Bloch-Gleichungen

Die Auswirkung der Relaxation auf die Spindynamik lässt sich am einfachsten in dem Modell von Bloch verstehen. Hier wird davon ausgegangen, dass im thermischen Gleichgewicht eine endliche Magnetisierung in z -Richtung besteht, aber keine in der xy -Ebene. Weiterhin wird angenommen, dass die Relaxation sich durch nur zwei empirische Parameter, die Relaxationszeiten T_1 und T_2 beschreiben lässt. Nach Anregung relaxiert die z -Magnetisierung exponentiell mit der charakteristischen Zeit T_1 in das thermische Gleichgewicht, die Phasenkohärenz der Spins, d.h. die xy -Magnetisierung, klingt ebenfalls exponentiell ab, jedoch mit der im Allgemeinen mit T_1 nicht identischen charakteristischen Zeitkonstante T_2 . Die Lösung der sich ergebenden klassischen Bewegungsgleichungen kann in Form der in-Phase-Magnetisierung und außer-Phase-Magnetisierung geschrieben werden. Dabei ist die in-Phase-Magnetisierung kohärent mit dem anregenden magnetischen Wechselfeld und die außer-Phase-Magnetisierung um $\pi/2$ verzögert. Diese können mit der komplexen Suszeptibilität χ verknüpft werden, da für die komplexe Magnetisierung gilt:

$$M_c = \chi \cdot B_c \quad (2.22)$$

mit

$$\chi = \chi' + i \cdot \chi'' \quad (2.23)$$

Der Realteil χ' entspricht der Dispersion, während der Imaginärteil $i \cdot \chi''$ die Energiedissipation wiedergibt. Letzterer ist also verantwortlich für die in der ESR-Spektroskopie beobachtete Absorption. In einer von dem Relaxationsmechanismus unabhängigen Ableitung kann gezeigt werden, dass $i \cdot \chi''$

proportional zur außer-Phase-Magnetisierung ist [2]:

$$i \cdot \chi'' = \frac{V \cdot \omega}{k_B \cdot T} \cdot \frac{1}{Tr(\varepsilon)} \cdot \int_0^{\infty} Tr \{M_x \cdot (\tau) \cdot M_x\} \cdot \cos(\omega\tau) \cdot d\tau \quad (2.24)$$

ε bezeichnet den Einheitsoperator, V das Probenvolumen und ω die Winkelgeschwindigkeit der als linear polarisiert angenommenen Strahlung. Das Integral in Gleichung 2.24 entspricht einer Fouriertransformation, so dass ersichtlich wird, dass die Linienform die Fouriertransformierte der Relaxationsfunktion ist. Dasselbe Ergebnis kann zudem ohne ein spezifisches Modell aus der Linear-Response-Theorie gewonnen werden. Für einen Spin-only-Magnetismus vereinfacht sich Gleichung 2.24 zu:

$$i \cdot \chi'' = \frac{V \cdot \omega}{k_B \cdot T} \cdot \frac{N \cdot \gamma_e^2}{N_E} \cdot \int_0^{\infty} Tr \{S_x \cdot (\tau) \cdot S_x\} \cdot \cos(\omega\tau) \cdot d\tau \quad (2.25)$$

wobei N die Anzahl der Spins im Ensemble und N_E die Anzahl der Eigenzustände bezeichnet. Im Blochschen Modell ist die Relaxationsfunktion eine exponentiell abfallende Funktion. Damit ergibt sich Linienformfunktion zu einer Lorentzfunktion:

$$f(\omega) = \frac{A \cdot \gamma \cdot M_0 \cdot \frac{1}{T_2}}{\left(\frac{1}{T_2}\right)^2 + (\omega_0 - \omega)^2} \quad (2.26)$$

wobei A ein instrumenteller Faktor ist.

Dies wird für die meisten Radikale in Lösung experimentell bestätigt.

2.1.2.2 Der Grenzfall schneller Bewegung

Vollführt ein Radikal eine Bewegung, deren Amplitude in Abhängigkeit von der Raumrichtung unterschiedlich stark eingeschränkt ist, so ist die Bewegung anisotrop. Dann resultiert eine Bewegung, die schnell auf der Skala der ESR-Spektroskopie ist (d.h. mit einer Rotationskorrelationszeit unterhalb von 1 ns), nicht in einer dynamischen Mittelung der magnetischen Tensoren \hat{A} und \hat{g} zu den isotropen skalaren Werten, wie sie in Abschnitt 2.1.1.4 verwendet wurden. Vielmehr muss nun die dynamische Mittelung zur Bestimmung der weiterhin tensoriellen Größen \hat{A} und \hat{g} die ausgezeichneten Rotationsachsen und die eingeschränkten Amplituden berücksichtigen. Dies kann durch Einführen eines effektiven Hamiltonoperators geschehen, der auch die Dynamik des Systems erfasst. Die Lösung der entsprechenden Schrödingergleichung

ergibt dann analog zum statischen Fall die Eigenwerte des gesamten dynamischen Systems [133], aus dem ein Spektrum eines pseudo-statischen Systems kreiert werden kann.

Die Art der Ausmittlung ist von der Trajektorie der Bewegung bestimmt. Hierfür wurden in der Literatur verschiedene Modelle vorgeschlagen. In dieser Arbeit wurde bei der Analyse der Lipiddoppelschichten von einem effektiven Hamiltonoperatormodell Gebrauch gemacht. Voraussetzung für die Anwendbarkeit der ESR-Spektroskopie ist zunächst die Existenz von ungepaarten Spins. Rein diamagnetische Proben, wie es die meisten biologischen Moleküle sind, müssen daher zunächst künstlich mit einem ungepaarten Elektron versehen werden, um ESR-spektroskopisch „sichtbar“ zu werden. Wie erstmals in der Gruppe von McConnell demonstriert wurde [124], können stabile Radikale an Biomoleküle (wie z.B. dem Protein BSA) gekuppelt werden und so einer ESR spektroskopischen Analyse der Weg bereitet werden. Diese Radikale sind zumeist sterisch gehinderte Nitroxide. Zur ESR-spektroskopischen Untersuchung von Lipidsystemen bedient man sich synthetischer Lipide, in die eine Nitroxidgruppe an eine gewählte Position in der Fettsäurekette eingeführt wird. Diese spinmarkierten Lipide werden in einem geringen Anteil (ca. 2%) dem zu untersuchenden Lipidsystem zugegeben. Die Dynamik der Nitroxidsonde wird nun von der Bewegung des markierten Lipids und der Struktur des umgebenden Lipidsystems beeinflusst und kann somit zu einer detaillierten Charakterisierung von Lipidsystemen verwendet werden z.B. [81], vgl. [109]. In dieser Arbeit wurde hierfür das spinmarkierte Lipidmolekül n -doxyl² PSPC³ verwendet. In Abbildung 2.3 ist das 7-doxyl Isomer dargestellt. Das gemeinsame Hauptachsensystem von \hat{A} und \hat{g} des Nitroxids wird in der Folge als magnetisches Koordinatensystem bezeichnet und ist so definiert, dass die N-O Bindung die Richtung der x -Achse vorgibt. Die z -Achse liegt entlang des Stickstoff-Sauerstoff 2p Orbitals, in dem sich das ungepaarte Elektron befindet (Abbildung 2.3, links).

Das Bewegungsmodell zur theoretischen Beschreibung der Linienform spinmarkierter Lipide, das in dieser Arbeit zur Aufstellung des effektiven Hamiltonoperators verwendet wurde, basiert auf einem Vorschlag von Griffith et al. [133]. Dabei wird angenommen, dass zum einen das Lipid schnell um die eigene Achse rotiert und zum anderen der Nitroxidmarker eine Librationsbewegung mit eingeschränkter Amplitude vollführt. Die Überlagerung dieser Bewegungen habe eine Korrelationszeit im Bereich von 1 ns und könne daher durch einen effektiven Hamiltonoperator beschrieben werden. Im Folgenden werden die gemittelten Tensoren jeweils für den Hyperfeintensor dargestellt

²4,4'-Dimethyloxazolidin-N-oxyl

³1-Palmitoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin

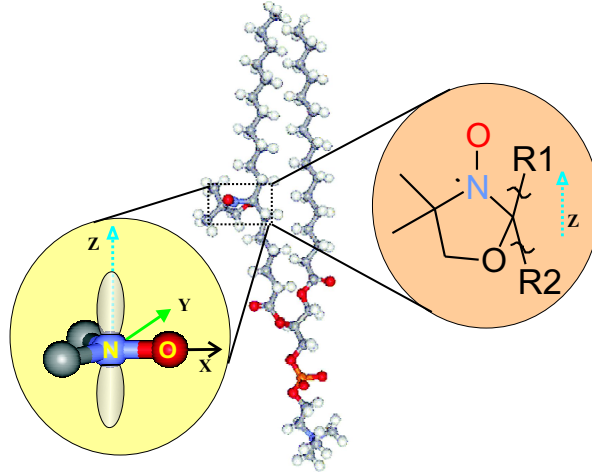


Abbildung 2.3: Das spinmarkierte Lipid 7-doxyl-PSPC. Rechts ist der Nitroxidmarker Doxyl, links das magnetische Koordinatensystem dieses Markers vergrößert dargestellt.

werden. Für \hat{g} gelten diese Gleichungen analog.

Um die Wechselwirkung des Elektronenspins des Nitroxids mit dem äußeren Feld erfassen zu können, müssen diese Wechselwirkungsmatrizen in dasselbe Koordinatensystem transformiert werden. Dynamische als auch statische Mittelung erfolgt hierbei durch geeignete Integration über die entsprechenden Eulerwinkel.

Befindet die Lipidkette sich in der *all-trans* Konformation, d.h. betragen alle Diederwinkel der Kette 180° , so ist die z -Achse des magnetischen Koordinatensystems parallel zur Hauptrotationsachse des Lipids ausgerichtet [136]. Letzteres stellt die z -Achse des Lipidkoordinatensystems dar. Eine Abweichung von dieser Ausrichtung wird durch die Eulerwinkel (α, β, γ) der Transformation vom Lipid- in das Nitroxidkoordinatensystem berücksichtigt. Für den einfachsten Fall von $(\alpha, \beta, \gamma) = 0$ werden bei einer schnellen Rotation um die Lipidachse alle nicht-säkularen Terme des Wechselwirkungstensors ausgemittelt und es ergibt sich ein diagonaler \hat{A} -Tensor mit den Hauptwerten $A_{\text{senkrecht}}^r, A_{\text{parallel}}^r$ (zu z).

$$A_{\text{senkrecht}}^r = 0.5 \cdot (A_{xx} + A_{yy}) \quad (2.27)$$

$$A_{\text{parallel}}^r = A_{zz} \quad (2.28)$$

In dem speziellen Fall des verwendeten Nitroxidmarkers sind A_{xx} und A_{yy}

(sowie g_{xx} und g_{yy}) auch im statischen Fall ähnlich, so dass diese Mittelung keine starke Näherung darstellt.

Die Bewegung des Markers wird durch einen random walk der Nitroxid z -Achse in einem Konus beschrieben. Die erlaubten Trajektorien sind durch den maximalen Öffnungswinkel γ des Konus gegeben. Dabei entspricht der Wert $\gamma = 90^\circ$ einer isotropen Bewegung. Transformiert man die Tensoren in das Probenkoordinatensystem unter dieser Annahme und unter Berücksichtigung der Mittelung in der xy -Ebene (siehe 2.1.2.2), ergibt sich wiederum ein axialsymmetrischer Tensor mit den Hauptwerten

$$A_{\text{senkrecht}}^w = A_{\text{senkrecht}}^r + (A_{\text{parallel}}^r - A_{\text{senkrecht}}^r) \cdot W \quad (2.29)$$

$$A_{\text{senkrecht}}^w = A_{\text{senkrecht}}^r + (A_{\text{parallel}}^r - A_{\text{senkrecht}}^r) \cdot 0,5 \cdot (1 - W) \quad (2.30)$$

mit

$$W = \frac{1}{3} \cdot (1 + \cos \gamma + \cos^2 \gamma) \quad (2.31)$$

Dieser Wert wird zu einem Ordnungsparameter S , der zwischen 0 und 1 skaliert, normiert:

$$S = \frac{1}{3} \cdot (2 \cdot W + 1) \quad (2.32)$$

Um die tatsächlichen Energieeigenwerte auszurechnen, muss der ermittelte Hyperfeintensor in das Laborkoordinatensystem transformiert werden. Da das magnetische Feld in z -Richtung des Laborkoordinatensystems liegt und in der Hochfeldnäherung nicht-diagonale Komponenten vernachlässigt werden können, ergibt sich hierfür:

$$A' = A_{zz} = A_{\text{parallel}}^w \cdot \cos^2 \theta + A_{\text{senkrecht}}^w \cdot \sin^2 \theta \quad (2.33)$$

wobei θ den Winkel zwischen der Oberflächennormale und dem Magnetfeld bezeichnet. Der effektive Hamiltonoperator lautet also:

$$\mathbf{H}' = \frac{\mu_B}{\hbar} \cdot \vec{S} \cdot \hat{g}' \cdot \vec{B} + \vec{S} \cdot \hat{A}' \cdot \vec{I} \quad (2.34)$$

Dies ist ein zeitunabhängiges isotropes Problem, das analytisch gelöst werden kann.

Zudem muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Dynamik auch die Relaxation und somit die Linienbreite beeinflusst. Dies kann in diesem Modell nur durch empirische Linienbreiten berücksichtigt werden, die im Nachhinein mit den berechneten Resonanzpositionen gefaltet werden. Stellt man den zeitabhängigen Hamiltonoperator in dem verwandten Modell als Summe eines (effektiven) zeitunabhängigen Operators und einer zeitabhängigen Störung ($\mathbf{H}(t) - \mathbf{H}$) dar:

$$\mathbf{H}(t) = \mathbf{H} + (\mathbf{H}(t) - \mathbf{H})$$

so führt die Behandlung des Problems im Rahmen der Redfield Theorie zu winkelabhängigen Linienbreiten [2, 34]. Dafür muss vorausgesetzt werden, dass diese Störung hochfrequent und \mathbf{H} axialsymmetrisch ist. Die resultierenden Linien haben die Form einer Lorentzkurve und die peak-zu-peak Linienbreite der Spektren (d.h. der im Folgenden immer dargestellten 1. Ableitung des Absorptionsspektrums) ist gegeben durch:

$$\Delta\nu = A + B \cdot \left[\frac{1}{4} \cdot (3 \cdot \cos^2 \zeta - 1)^2 \right] + C \cdot [3 \cdot \cos^2 \zeta \cdot \sin^2 \zeta] + D \cdot \left[\frac{3}{4} \cdot \sin^4 \zeta \right]$$

wobei A , B , C und D Linienformparameter darstellen, die empirisch bestimmt werden, und ζ den Winkel zwischen der z -Achse des Koordinatensystems des effektiven Hamiltonoperators und dem Magnetfeld bezeichnet (In dem beschriebenen Fall der Lipide ist dieser identisch mit θ). A , B , C und D sind abhängig von der magnetischen Quantenzahl m , wobei A den winkelunabhängigen Linienformen aus der Blochschen Behandlung entspricht. Gaffney und McConnell haben gezeigt, dass A und B die wichtigsten Beiträge zur Linienform leisten, so dass in der Folge nur diese beiden Parameter berücksichtigt werden [34].

2.1.2.3 Die langsame Bewegung

Im Regime langsamer Bewegungen müssen, wie bereits erläutert, die quantenmechanischen Freiheitsgrade des Spins mit den klassischen Orientierungsfreiheitsgraden gekoppelt werden. Dazu wird von der quantenmechanischen Bewegungsgleichung ausgegangen, der Liouville-von-Neumann-Gleichung für die zeitliche Entwicklung der Dichtematrix ρ .

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -i \cdot [\mathbf{H}(t), \rho] \quad (2.35)$$

Es existieren in der Literatur verschiedene Modelle zur Beschreibung der Zeitabhängigkeit des Hamiltonoperators. Die Simulation der ESR-Spektren der Proteine, bzw. z.T. der Spektren der Lipiddoppelschichten, wurde auf der Basis eines Programms von Freed und Mitarbeitern vorgenommen [14]. Daher wird im Folgenden der hier verwendete Ansatz skizziert.

Unter der Voraussetzung, dass keine kollektiven Phänomene auftreten, kann die Wechselwirkung eines quantenmechanischen Teilchens mit einem Bad, das aus den restlichen Molekülen des Ensembles besteht, mittels eines Hamiltonoperators dargestellt werden, dessen statistisches Verhalten komplett durch einen Satz statistischer Variablen Ω gegeben ist. Diese Variablen können für die Anwendung in der ESR-Spektroskopie mit den Euler-Winkeln identifiziert werden. Das statistische Verhalten von Ω wird durch

einen Markov-Prozess beschrieben [117], d.h.

$$\frac{\partial \rho(\Omega, t)}{\partial t} = -\mathbf{\Gamma}_\Omega \cdot P(\Omega, t) \quad (2.36)$$

wobei $P(\Omega, t)$ die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, bei der Zeit t Ω in einem bestimmten Zustand zu finden. Der Prozess wird als stationär angenommen, so dass $\mathbf{\Gamma}$ ein zeitunabhängiger Markov-Operator ist, der die Bewegung aller Teilchen berücksichtigt. Unter Annahme einer definierten Gleichgewichtsverteilung erhält man die Bewegungsgleichung

$$\frac{\partial \rho(\Omega, t)}{\partial t} = -i \cdot [\mathbf{H}(\Omega), \rho(\Omega, t)] - \mathbf{\Gamma}_{\Omega\rho}(\Omega, t) \quad (2.37)$$

wobei $\rho(\Omega, t)$ nun der Ensemble Mittelwert für ein bestimmtes Ω darstellt. Hier geht die Zeitabhängigkeit von \mathbf{H} nicht mehr explizit ein, sondern \mathbf{H} wird als Funktion von Ω ausgedrückt, das die zeitabhängigen Modulationen beinhaltet.

Unter Verwendung der Heisenberggleichung kann hieraus die entsprechende Bewegungsgleichung für den Spinoperator aufgeschrieben werden:

$$\frac{\partial \mathbf{S}_j(\Omega, t)}{\partial t} = -i \cdot [\mathbf{H}(\Omega), \mathbf{S}_j(\Omega, t)] - \mathbf{\Gamma}_{\Omega\rho}^\dagger(\Omega, t) \quad (2.38)$$

wobei $\mathbf{\Gamma}_{\Omega\rho}^\dagger$ den adjungierten Operator angibt. Geht man von einem reinen Spinmagnetismus und nicht wechselwirkenden Spins aus, so ist der Operator der makroskopischen Magnetisierung linear mit dem Spinoperator verknüpft:

$$Tr \{ \mathbf{M}_x(\tau) \cdot M_x \} = N \cdot \gamma_e^2 \cdot Tr \{ \mathbf{S}_x(\tau) \cdot \mathbf{S}_x \} \quad (2.39)$$

Da dies die Relaxationsfunktion darstellt und nach Gleichung 2.25 die Fouriertransformierte der Messgröße $i \cdot \chi''$ ist, kann nach Lösen der Gleichung 2.38, Fouriertransformation und Einsetzen in 2.25 eine Beschreibung der ESR-Linienform in Abhängigkeit der Dynamik der Moleküle gewonnen werden. Ohne die Ableitung im Detail wiederzugeben, sollen hier nur die hierfür nötigen Vereinfachungen erwähnt werden:

- Die Spurbildung von $Tr \{ \mathbf{S}_x \cdot \mathbf{S}_x(\Omega, \tau) \}$ wird für die Orientierungsfreiheitsgrade über den klassischen Ensemblemittelwert angenähert, so dass lediglich die Spurbildung über die Spinfreiheitsgrade bleibt.
- Durch Ähnlichkeitstransformation wird der Relaxationsoperator $\mathbf{\Gamma}$ symmetrisiert.

Hieraus ergibt sich, dass die ESR Intensität in Abhängigkeit der Frequenz gegeben ist durch:

$$I(\omega) = \langle \langle v | (\mathbf{\Gamma} - i \cdot \mathbf{L}) + i \cdot \omega \cdot \mathbf{1} | v \rangle \rangle \quad (2.40)$$

Zur Vereinfachung wurden hier Spurbildung und Mittelung über das Ensemble mit Dirac-Klammern dargestellt. \mathbf{L} bezeichnet den Liouville-Superoperator

$$\mathbf{L} \cdot \mathbf{S}_j = \frac{1}{\hbar} [\mathbf{H}, \mathbf{S}_j] \quad (2.41)$$

und $|v\rangle$ den Ausgangszustand, der sowohl den Spinoperator für die erlaubten ESR Übergänge als auch die Gleichgewichts-Verteilungsfunktion für die Molekülorientierung enthält.

In dieser Gleichung repräsentiert der Liouville-Superoperator die magnetischen Wechselwirkungen, die in Abschnitt 2.1 aufgeführt wurden. In dem verwendeten Computerprogramm von Freed werden hierbei die säkularen Terme der elektronischen Zeeman-Wechselwirkung sowie der Hyperfeinwechselwirkung eines Dublett-Radikals und eines einzelnen Kerns beliebigen Kernspins berücksichtigt. Die Bewegung der Moleküle wird durch den Relaxationsoperator $\mathbf{\Gamma}$ eingeführt. Dessen mathematische Formulierung hängt entscheidend von dem zu postulierenden Bewegungsmodell der Moleküle ab, muss jedoch den Bedingungen eines Markov-Prozesses genügen. Eine Möglichkeit ist hier die Brownsche Molekularbewegung. Diese Formulierung erlaubt die Benutzung komplett anisotroper Rotationsdiffusionstensoren. Dies bedeutet, dass die Rotation um die Hauptachsen verschiedene Frequenz haben kann. Diese Anisotropie der Bewegung muss lediglich in geeigneter Weise in die Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(\Omega, t)$ (2.36) modelliert werden. Zudem können auch analog des Modells des effektiven Hamiltonoperators Bewegungen beschrieben werden, deren Amplitude in bestimmten Raumrichtungen eingeschränkt ist. Dies wird wiederum durch die Bewegung in einem Kegel beschrieben, der hier jedoch durch ein axialsymmetrisches Rückstellpotenzial definiert wird. Freed und Mitarbeiter haben für Systeme mit mikroskopischer Ordnung, aber makroskopischer Unordnung (z.B. Flüssigkristalle) ein Modell entwickelt (MOMD, microscopic order macroscopic disorder), das die lokale Ordnung des Systems durch Bewegung der Moleküle in einem solchen axialsymmetrischen Rückstellpotenzial beschreibt, dessen Direktoren isotrop verteilt sind.

Zur Definition des Potenzials müssen zunächst Koordinatensysteme eingeführt werden, in der die verschiedenen Prozesse behandelt werden (s. Abbildung 2.4). In dem magnetischen molekülfesten Koordinatensystem sind die Tensoren \hat{g} und \hat{A} definiert. Es entspricht dem in Abbildung 2.3 dargestellten

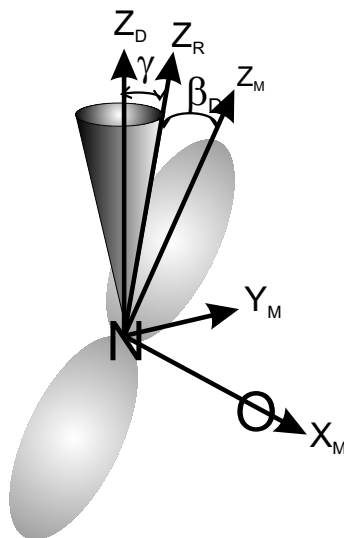


Abbildung 2.4: Die Beziehung zwischen den Koordinatensystemen zur Beschreibung der langsamen Bewegung: Die z -Achse des magnetischen Koordinatensystems z_M ist mit der des Rotationsdiffusionstensors z_R über den Winkel β_D verbunden. γ ist der Öffnungswinkel des Konus, der über den Winkel zwischen z_R und dem Direktor des Ordnungspotenzials definiert ist.

System. Das Koordinatensystem, in dem die Rotationsdiffusion beschrieben wird, ist ebenso molekülfest, aber nicht notwendigerweise koinzident mit ersterem, sondern mit diesem i.A. über die Eulerwinkel Ω_D ($\alpha_D, \beta_D, \gamma_D$) verbunden. Aufgrund der nahezu axialsymmetrischen Form der \hat{g} und \hat{A} Tensoren der verwendeten Markermoleküle können hier α_D und γ_D vernachlässigt werden, so dass nur β_D , der Winkel zwischen der z -Achse des Diffusionstensors z_R und des magnetischen Koordinatensystems z_M berücksichtigt werden muss. Die Symmetrieachse des Direktors definiert das dritte Bezugssystem, das mit dem Diffusionssystem über die (dynamischen) Eulerwinkel Ω (α, β, γ) verknüpft ist.

Das Potenzial U wird als Funktion dieser Eulerwinkel Ω in eine Reihe von Elementen der Wignerschen Rotationsmatrizen D_{0K}^L [69] entwickelt:

$$U(\Omega_D) = -k_B \cdot T \cdot \sum_{L,K} c_K^L \cdot D_{0K}^L(\Omega_D) \quad (2.42)$$

In vielen Fällen genügt es, die Entwicklung nach dem ersten Glied abzuberechnen:

$$U(\gamma) = -0.5 \cdot k_B \cdot T \cdot c_0^2 \cdot (3 \cdot \cos^2 \gamma - 1) \quad (2.43)$$

so dass das Potenzial lediglich von dem Polarwinkel γ zwischen dem Direktor und der z -Achse des Diffusionskoordinatensystems abhängt. Der erste Koeffizient definiert, wie aus Abbildung 2.4 ersichtlich, den axialen Ordnungsparameter S [117]:

$$S(\gamma) = -0.5 \cdot \langle 3 \cdot \cos^2 \gamma - 1 \rangle \quad (2.44)$$

Die Klammern stellen die räumliche Mittelung dar.

Das Direktorkoordinatensystem muss schließlich mit dem Laborkoordinatensystem korreliert werden, in dem das äußere Magnetfeld die z -Richtung definiert. Dies erfolgt durch die Polarwinkel ζ und ϕ . Der isotropen Verteilung der Moleküle wird durch Integration über diese Winkel Rechnung getragen.

Bindet man dieses Modell der Bewegung in einem axialsymmetrischen Potenzial in einen Rotationsdiffusionstensor ein, so erhält man als kompletten Satz von Eigenfunktionen Wignersche Drehmatrizen, die die beschriebenen Transformationen beinhalten.

Gleichung 2.40 stellt dann einen Satz partieller Differentialgleichungen dar, der mittels eines komplizierten mathematischen Apparats zu lösen ist. Auf eine Diskussion dieser Mathematik wird hier verzichtet und auf die ausführliche Behandlung z.B. in [5], [117] verwiesen. Dieses Modell wurde ebenfalls bereits zur Simulation der ESR-Linienform spinmarkierter Lipide verwendet, z.B. [36]. Genauso ermöglicht es die Beschreibung der ESR-Spektren von Adsorbaten auf Festkörperoberflächen, wie Nitroxiden [6] und spinmarkierten Fettsäurefilmen [109]. Die Anwendung auf ESR-Spektren spinmarkierter Proteine wird im Rahmen des folgenden, gesonderten Abschnitts der Site-directed Spin Labeling Technik besprochen.

2.1.3 Site-directed Spin Labeling

Die meisten Proteine sind - ebenso wie Lipide - diamagnetische Stoffe und zeigen daher kein ESR-Signal. Im Gegensatz zu Lipiden sind Proteine jedoch nicht in einfacher Weise auf organisch-präparativem Wege darstellbar. Daher werden molekularbiologische Methoden verwendet, um die Proteine mit einem Spinmarker zu versetzen. Durch ortsgerichtete Mutagenese kann jede Aminosäure von Interesse durch eine Aminosäure, die eine chemisch reaktive Seitenkette enthält, ersetzt werden. Eine selektive Kopplung mit einem stabilen Spinmarkierungsreagenz führt dann einen ungepaarten Spin an der gewünschten Stelle der Primärsequenz ein. In dieser Arbeit wurde die häufig verwendete Kopplung über ein Cystein angewandt, das mit dem Methanthio-sulfonatreagenz unter Bildung eines Disulfids reagiert (s. Abbildung 2.5).

Die Analyse der ESR-Linienform spinmarkierter Proteine ergibt in erster Linie Aufschluss über die Dynamik des Nitroxids. In dem molekularen Ver-

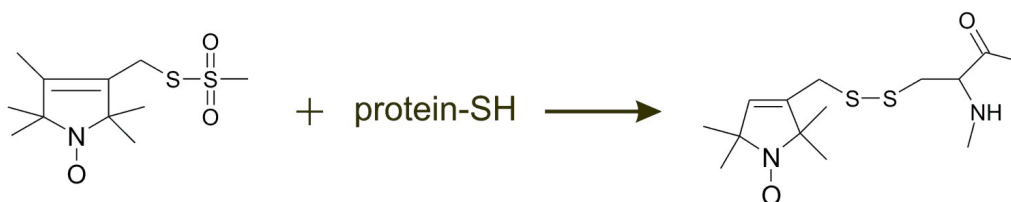


Abbildung 2.5: Reaktion des Methanthiosulfonatreagenz I mit Cystein zur Bildung der spinmarkierten Seitenkette R1.

bund ist die Bewegung des Nitroxids bestimmt durch die Rotation um Einfachbindungen. Veränderungen der chemischen Struktur der spinmarkierten Seitenkette verändern diese Rotationseigenschaften und damit auch die Korrelationszeit der Bewegung. In einer Reihe von Untersuchungen wurden die Markierungsreagenzien derart optimiert, dass die Dynamik des Nitroxids in der Seitenkette im Bereich von einigen Nanosekunden, d.h. im sensitiven Bereich der ESR-Spektroskopie, liegt [92], [19]. Damit eröffnet sich aus der Messung der spektralen Eigenschaften des Markers der Zugang zu einer Vielzahl von Informationen über die Proteinstruktur und -dynamik. Die verwendeten spinmarkierten Seitenketten sind derart aufgebaut, dass die Rotationsbewegung zu einer Anisotropie sowohl der Frequenz als auch der Amplitude der Bewegung des Nitroxids führt, so dass die erhaltenen ESR-Spektren nicht den isotropen Grenzfall eines Dreilinienspektrums darstellen, sondern sensitiv auf die lokale Umgebung des Markers reagieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bewegung der Seitenkette lediglich von zwei Faktoren bestimmt wird: der Bewegung des Proteinrückgrats und der lokalen Umgebung der Seitenkette [19]. (Dies gilt für kleine Proteine nur, wenn die Rotation des gesamten Moleküls durch Verwendung viskoser Lösungen auf der Zeitskala der ESR eingefroren wird.) Ersteres ergibt sich aus einer Wechselwirkung des Proteinrückgrats mit dem Disulfid der Seitenkette, wodurch die Bewegung des Proteinrückgrats an die des Nitroxids gekoppelt wird [92] und somit Sekundärstrukturelemente durch ihre unterschiedliche Dynamik des Rückgrats unterschieden werden können. Die sterisch eingeschränkte Rotation der C-C_{Ring}-Einfachbindung führt zu einer gehinderten Bewegung des Nitroxids, die empfindlich auf weitere Einschränkungen reagiert und somit die lokale Umgebung sondiert. Daher stellt jedes ESR-Spektrum zum einen einen Fingerabdruck für diese markierte Stelle dar, und kann zum anderen durch Linienformanalyse zur Bestimmung der sequenzspezifischen Sekundär- und Tertiärstruktur [54] sowie zur Untersuchung der Proteinrückgratdynamik verwendet werden [20].

Schon eine qualitative Analyse, unter Benutzung der zentralen Linienbreite und der spektralen Breite als Parameter für die Mobilität der Seitenkette, erlaubt eine globale Unterscheidung von Sekundär- und Tertiärstrukturelementen, da Amplitude und Frequenz abhängig von der Sekundärstruktur sind [92]. So oszillieren diese Parameter beim Durchgang durch eine α -Helix mit einer Periode von 3.6 (der Anzahl Reste pro Helixwindung) und befinden sich für verschiedene Sekundärstrukturelemente in unterscheidbaren Bereichen eines von diesen Parametern aufgespannten Phasendiagramms [54]. Eine quantitative Linienformanalyse wird durch die in Abschnitt 2.1.2.3 beschriebene Methodik erreicht. Hiermit kann die Bewegung der markierten Seitenkette sowohl an helicalen Stellen [19, 20] als auch an markierten β -Faltblattseitenketten [72] quantitativ mit der lokalen Struktur und Dynamik des Proteins korreliert werden.

Durch Verwendung zweifach markierter Proteine kann aus der Linienverbreiterung der Abstand der Seitenketten gemessen werden. Im rigiden Grenzfall kann Gleichung 2.15 explizit im Hamiltonoperator berücksichtigt werden [53]. Da nun die ESR-Linienform abhängig vom Abstand der koppelnden Spins ist, kann dieser als Parameter einer Simulation ermittelt werden.

Im Fall isotroper Verteilung der Proteine in Lösung und damit der Nitroxide zueinander ist dies nicht mehr einfach möglich, da Inter-spinvektor und Magnetfeld nicht nur eine Orientierung zueinander einnehmen. Es hat sich jedoch empirisch erwiesen, dass die Linienform durch Faltung der Summe der Spektren der einfach markierten Proteine mit einer Linienverbreiterungsfunktion, die als Pake Funktion bekannt ist, angenähert werden kann [106]. So können bei physiologischen Temperaturen Abstände in Proteinen im Bereich von ca. 6-22 Å bestimmt werden [1].

Alle diese Informationen können genutzt werden, um strukturelle Veränderungen zu beobachten. So wurden bereits Veränderungen in Spektren tertiärer Kontakte, die aufgrund starker Wechselwirkungen zwischen Seitenketten eine hohe Ordnung des Spinmarkers reflektieren, zur Untersuchung der Konformationsänderung beim Übergang von Rhodopsin vom Dunkel- in den Lichtzustand genutzt [32], die Veränderung des Abstandes von Seitenketten zur Aufdeckung der Scharnierbewegung von T4 Lysozym beobachtet [93] und qualitative Mobilitätsmessungen zur Analyse der Veränderung der Sekundärstruktur bei Substratbindung an einen Membrantransporter angewandt [94].

2.2 Die Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen

Setzt man eine Festkörperoberfläche einer wässrigen Proteinlösung aus, so wird häufig die spontane Adsorption des Proteins an der Grenzfläche beobachtet. Diese hohe Oberflächenaffinität der Proteine ist eine intrinsische Eigenschaft, die auf der komplexen Natur dieser Biopolymere beruht und nicht einem einzigen Charakteristikum zugeschrieben werden kann. Vielmehr sind an der Wechselwirkung nahezu ebenso viele (und teilweise die identischen) Wechselwirkungen wie an der Proteinfaltung beteiligt. Welche Wechselwirkungen für ein bestimmtes Grenzflächensystem relevant sind, wird zum einen von der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur des untersuchten Proteins bestimmt, aber zum anderen auch von den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberfläche. Im Folgenden werden zunächst die Kräfte zusammengefasst, die in der Literatur im Zusammenhang mit Proteinadsorption diskutiert werden. Kapitel 2.3 stellt sodann das untersuchte Modellprotein vor.

2.2.1 Van-der-Waals-Kräfte

Van-der-Waals-Kräfte entstehen aus miteinander wechselwirkenden Dipolen, seien es zwei permanente Dipole, ein induzierter und ein permanenter oder zwei induzierte Dipole. In letzteren beiden Fällen ist die potentielle Energie proportional zur inversen sechsten Potenz des Abstands, lediglich der Vorfaktor vor diesem Abstandsterm ist verschieden. So ist die Wechselwirkungsenergie zwischen einem permanenten und einem induzierten Dipol gegeben durch:

$$V = -\frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2}{4 \cdot \pi \cdot \varepsilon_0} \cdot \frac{1}{r^6} \quad (2.45)$$

wobei μ_1 das Dipolmoment des polaren Moleküls und α_2 die Polarisierbarkeit des zweiten Moleküls ist. Die Wechselwirkungsenergie zwischen zwei permanenten Dipolen ist proportional zur inversen dritten Potenz des Abstands. Die thermische Mittelung der Wechselwirkung zwischen mobilen Dipolen führt allerdings auch hier zu einer r^{-6} -Abhängigkeit.

Wenn zwei große Körper in Wechselwirkung treten, kann die gesamte van-der-Waals-Energie durch Summation über Paarwechselwirkungen der einzelnen Dipole angenähert werden. Dadurch gehen in den entsprechenden Ausdruck für die Wechselwirkungsenergie die Geometrie der beteiligten Körper ein sowie die Materialeigenschaften (gemäß den erwähnten Vorfaktoren). In

Abhängigkeit der angenommenen Geometrie erhält man nach Hamaker für ein Vielteilchenproblem eine zu Gleichung 2.45 äquivalente Beziehung, in der die Materialeigenschaften in der sog. Hamakerkonstante A zusammengefasst sind [42]. Nähert man die Form des untersuchten Proteins durch eine Kugel an, erhält man für die Wechselwirkung mit einer planaren Oberfläche eine Konstante, die Anteile des Lösemittels (1), des Proteins (2) und der Oberfläche (3) enthält [55]:

$$A_{213} = \left(\sqrt{A_{22}} - \sqrt{A_{11}} \right) \cdot \left(\sqrt{A_{33}} - \sqrt{A_{11}} \right) \quad (2.46)$$

Diese Gleichung zeigt an, dass van-der-Waals-Kräfte zwischen identischen Materialien immer anziehend sind, jedoch für verschiedene Stoffe abstoßend werden, sobald die Hamakerkonstante des Lösemittels zwischen der des Proteins und der Oberfläche liegt. Der Gewinn an freier Enthalpie ergibt sich nach der Hamaker Näherung zu [112]:

$$\Delta G = -\frac{A_{213}}{6} \cdot \left(\frac{R}{6} + \frac{R}{d+2 \cdot R} + \ln \frac{d}{d+2 \cdot R} \right) \quad (2.47)$$

wobei R den Radius des sphärisch angenommenen Proteins bezeichnet. d ist der Abstand zwischen der Protein- und der Adsorberoberfläche. Für ein Protein mit einem Radius von 2 nm im Kontakt mit einer Glasoberfläche wurde ein Gewinn an freier Enthalpie von $0.62 kT$ berechnet, sofern sich das Protein in einem Abstand von 1 nm von der Oberfläche befindet [113]. Bei einem Abstand von 0.1 nm erhöht sich der Beitrag auf $4.6 kT$. Es muss jedoch erwähnt werden, dass durch die Annahme idealisierter Geometrien, wie die Annahme eines kugelförmigen Proteins, die Wechselwirkungsenergie deutlich überschätzt wird [113].

2.2.2 Elektrostatische Kräfte

Das elektrische Potenzial Φ , das von einer bestimmten Ladungsverteilung in einem Medium mit der relativen Dielektrizitätskonstanten ε_r erzeugt wird, lässt sich durch die Poisson-Gleichung beschreiben:

$$\nabla^2 \Phi = -\frac{\rho}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \quad (2.48)$$

wobei ρ die Ladungsdichte bezeichnet.

Für eine Proteinlösung in Wechselwirkung mit einer Festkörperoberfläche kann diese Gleichung sowohl auf die Elektrolytlösung als auch auf das Protein angewandt werden. Geladene Seitenketten des Proteins bauen eine

Ladungsdichte und somit ein elektrostatisches Potenzial auf. Die ursprüngliche Homogenität der Ladungsdichte der umgebenden Elektrolytlösung, wie sie durch die Salzkonzentration und Ionenstärke der vorhandenen Ionen gegeben ist, wird in der Nähe des Proteins durch dessen hohe Ladungsdichte gestört. Aufgrund der elektrostatischen Anziehung werden Gegenionen in die Umgebung des Bereichs hoher Ladungsdichte transportiert. Da die Wärmebewegung diesem Effekt der Ausbildung von Ladungswolken entgegenläuft, kann man eine Boltzmannverteilung für die Ladungsdichte ρ_E im Elektrolyten annehmen:

$$\rho_E = \sum_i z_i \cdot e \cdot c_{i\infty} \cdot \exp\left(-\frac{z_i \cdot e \cdot \Phi_E}{k_B \cdot T}\right) \quad (2.49)$$

z_i ist die Ladung des Ions i und $c_{i\infty}$ die Konzentration des Ions in der Lösung. Dasselbe gilt für geladene Festkörperoberflächen, deren Potenzial durch die Oberflächenladungsdichte σ gegeben ist.

Löst man die zwei sich hieraus ergebenden, gekoppelten Poisson-Boltzmann-Gleichungen für Protein und Oberfläche, so kann aus dem erhaltenen elektrischen Potenzial die gesamte elektrostatische Wechselwirkungsenergie berechnet werden [112]:

$$G = 0.5 \cdot \int_A \sigma \cdot \Phi_E \cdot dA + 0.5 \cdot \sum_j q_j \cdot \Phi_P(\vec{r}_j) \quad (2.50)$$

wobei Φ_E und Φ_P die elektrischen Potentiale in der Elektrolytlösung bzw. im Protein bezeichnen. q_j gibt die Proteinladung an der Position \vec{r}_j an. Die Integration des Festkörperoberflächenanteils läuft über die gesamte Fläche; die Summation über alle Proteinladungen j .

Das Potenzial der Oberfläche wird durch die Ladungen des Elektrolyten abgeschirmt. Unter Annahme eines exponentiellen Abfalls des Potenzials in die Raumrichtungen wird der Parameter Debye-Länge r_D definiert, der als charakteristische Länge für den Radius der Ionenwolke verwendet werden kann. Das abgeschwächte Potenzial Φ_x am Ort x ergibt sich demnach aus dem reinen Coulomb-Potenzial Φ_0 :

$$\Phi_x \approx \Phi_0 \cdot e^{-\frac{x}{r_D}} \quad (2.51)$$

Nach der Debye-Hückel-Theorie, die aufgrund der vereinfachenden Annahmen so nur für kleine Oberflächenpotentiale und Ionenstärken gilt, lassen sich die Größen abschätzen, die in die Abschirmung eingehen. Demnach ist die Debye-Länge nur von Eigenschaften des Elektrolyten abhängig:

$$r_D^2 = \frac{\varepsilon \cdot k_B \cdot T}{2 \cdot N_A \cdot e^2 \cdot I} \quad (2.52)$$

nämlich von der Ladungsdichte ρ und der Ionenstärke I . (ε bezeichnet die Dielektrizitätskonstante, N_A die Avogadrokonstante und e die Elementarladung). Die Abschirmung steigt mit der Ionenstärke und sinkt mit der Temperatur.

So wurde für HEW Lysozym in Kontakt mit einer negativ geladenen Oberfläche ($\sigma = -2.2 \mu\text{C}/\text{cm}^2$) bei pH=7 und in einer 0.1 M Elektrolytlösung eine Wechselwirkungsenergie im Bereich von $1.4 kT$ berechnet [112]. Dabei entspricht die verwendete Oberflächenladungsdichte ungefähr derer einer PC/PS (3:1) Lipidschicht.

2.2.3 Hydrophobe Kräfte

Unpolare Stoffe haben in wässrigen Medien im Allgemeinen eine geringe Löslichkeit und bilden bevorzugt Aggregate. Die dieser Beobachtung zugrunde liegende Wechselwirkung bezeichnet man als hydrophob. Sie beruht auf der Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen in wässrigen Medien. Unpolare Stoffe können keine Brücken zu Wasser ausbilden, so dass die Wassermoleküle in der Nähe dieser Stoffe untereinander eine höher geordnete Struktur ausbilden, um eine ähnliche Brückenstruktur wie in reinem Wasser aufrecht zu erhalten. Die Balance mit dem Entropiegewinn, der im Gegenzug bei einer Minimierung der Anteile dieser geordneten Struktur erzielt wird, bestimmt im Wesentlichen den Gewinn an freier Energie der Wechselwirkung. Da die hydrophobe Wechselwirkung nicht durch Ladungen hervorgerufen wird, sollte sie nicht durch die Anwesenheit von Ionen abgeschirmt werden. Empirisch wurde ermittelt, dass es im Bereich unter 10 nm Abschirmungseffekte der hydrophoben Wechselwirkung gibt und oberhalb dieser Marke nur geringfügige [55]. Daher ist diese Wechselwirkung unter physiologischen Bedingungen von Elektrolytlösungen langreichweitig. Auch die absolute Größenordnung ist bedeutsam. So liegt die Transferenergie pro exponierter Oberfläche einer unpolaren Aminosäure in wässriger Umgebung bei $84 - 180 J \cdot \text{mol}^{-1} \text{Å}^{-2}$. Der Beitrag zum Gewinn an freier Energie eines Proteins, das zehn unpolare Seitenketten an der Oberfläche enthält, ergibt sich unter Annahme einer dem Lösungsmittel exponierten Oberfläche von 10Å^2 pro Aminosäure auf ca. $5 kT$. Ein ähnlicher Betrag wird zudem bei der Freisetzung der Wassermoleküle von der Festkörperoberfläche frei.

2.3 Das Modellprotein T4 Lysozym

T4 Lysozym ist ein kleines globuläres Protein aus 164 Aminosäuren mit einer Masse von ca. 19 kDa (s. Abbildung 2.6), das strukturell detailliert mittels Kristallstrukturanalyse [85], NMR-Spektroskopie (z.B. [39]) sowie ESR-Spektroskopie (z.B. [92]) aufgeklärt ist. Trotz der geringen Größe unterscheidet man aufgrund der Kristallstruktur zwei Domänen: Die N-terminale Domäne, die das einzige β -Faltblatt und den Großteil der flexiblen Elemente enthält, ist über eine lange α -Helix mit der C-terminalen Domäne verbunden, die rein helikal ist und in der sich die meisten der positiven Überschussladungen befinden. T4 Lysozym als basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt über 9.0, ist bei neutralem pH neunfach positiv geladen [90].

Das Protein ist ein Enzym, eine Muramidase des Bacteriophage T4, das in seiner biologischen Funktion die Peptidoglykane der Zellwände des Wirtsbakteriums spaltet [57]. Die Substrattasche befindet sich zwischen den beiden Domänen, die sich unter Anbindung des Substrats in Form einer Scharnierbewegung zueinander bewegen [61], [93].

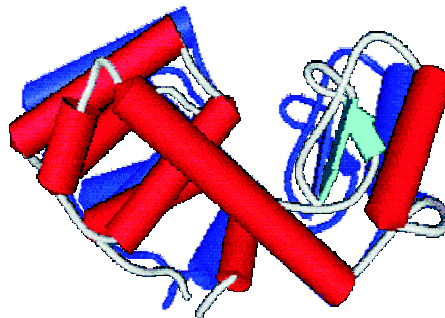


Abbildung 2.6: Strukturmodell von T4 Lysozym (pdb-Datei 3lzm). Die scharnierartige Bewegung ist in blau skizziert.

Kapitel 3

Experimentelles

3.1 Verwendete Materialien

Das pseudo-natürliche, cysteinfreie Gen von T4 Lysozym, das die Substitutionen C45T und C97A enthält, wurde von W.L. Hubbell (UCLA, CA) zur Verfügung gestellt. Das Fusionsprotein aus Annexin 12 und T4 Lysozym wurde von S. Oga (Gruppe W.L. Hubbell UCLA, CA) kloniert und hergestellt und für die gezeigten Messungen zur Verfügung gestellt. Die Primere wurden von der Firma IDT (Coralville, IA) synthetisiert.

Das Spinmarkierungsreagenz 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrolin-3-methylmethanthiosulfonat (MTSSL) wurde von Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada) bezogen. Alle verwendeten Chromatographiesäulen stammen von Amersham Biosciences. Der Flüssigkeitschromatograph (HPLC) war ein Knauer Maxi Star K1000. Das Lipid Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) ist ein Produkt von Fluka. Alle anderen Lipide wurden bei Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) gekauft. Dithiolbissuccinimidylundecanoat und N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure (AB-NTA) wurden bei Dojindo (Japan) gekauft. Triethylenglykolamin ist ein Produkt von Molecular Biosciences (Boulder, CO). Dioxan wurde wasserfrei und in p.A.-Qualität von Fluka bezogen. Alle anderen Lösungsmittel und die Puffersubstanzen wurden in p.A.-Qualität von Sigma, Fluka oder Roth bezogen. Die Zusammensetzungen der verwendeten Pufferlösungen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Die ESR-Messzellen stammten von Wilmad (WG-812-Q, bzw. WG-812-SQ), Bruker (ER160FC-Q) bzw. von Hellma (Spezialanfertigungen).

	Puffersubstanz	c (NaCl)	Sonstige	pH
Bindungspuffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM NaH ₂ PO ₄	500 mM		7.5
Imidazolpuffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM NaH ₂ PO ₄	500 mM	500 mM Imidazol	7.0
Lysatpuffer	25 mM Tris 25 mM MOPS	250 mM		7.6
HEPES-Puffer	10 mM Hepes	100 mM		7.4
Puffer A	100 mM HEPES	100 mM		7.4
Puffer B	100 mM HEPES	100 mM	1 mM CaCl ₂	7.4
Markierungspuffer	50 mM MOPS	25 mM		6.8

Tabelle 3.1: Verwendete wässrige Pufferlösungen.

3.2 Herstellung der T4L Mutanten

3.2.1 Konstruktion des Plasmids

Alle molekularbiologischen Arbeiten fanden in dem Labor von Prof. W.L. Hubbell, Jules Stein Eye Institute, UCLA, Los Angeles, CA, USA statt.

Das pseudo-natürliche Gen wurde in den pET-28b(+) Vektor (Novagen), der eine N-terminale Histidinanker(His₆)-Konfiguration trägt, überführt. Dafür wurde das Gen durch Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) mit den benötigten Restriktionsstellen BamHI und NdeI versehen und vervielfältigt. Die verwendeten PCR Primere sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Nach sukzessivem Restriktionsverdau des PCR Produkts bzw. Vektors mit zunächst NdeI und dann BamHI und Isolierung der Produkte durch Gelelektrophorese wurde das gewünschte Plasmid durch Ligation erhalten.

3.2.2 Klonierung der Cysteinmutanten

In dieser Arbeit werden ESR-Spektren neun verschiedener Mutanten gezeigt (F4C, E22C, D61C, D72C, D76C, T109C, V131C, I150C, E22C/T109C; hierbei benennt der erste Einbuchstabencode die Aminosäure, welche durch Cystein ersetzt wurde). Davon sind acht einfache Cysteinmutationen und E22C/T109C bezeichnet die Doppelmutation. D72C wurde analog des pseudo-natürlichen T4L durch Restriktion und Ligation aus dem entsprechend mutierten Gen im Ausgangsvektor erhalten. Alle anderen Mutationen wurden in das Plasmid über die Quikchange (Stratagene) Methode durch PCR eingeführt. Die verwendeten Primere sind in Tabelle 3.2 angegeben. Die Doppel-

Pl. V.	AGGTCATATGAATATATTTGAAATG
Pl. R.	TAAGGATCCTTATAGATTTTATACGCG
4C	CCGCGCGGCAGCCATATGAATATATGTGAAATGTTACG
22C	AGACACATGCGGCTATTACACTATTGGCATCGGTCATTT GCTTAC
61C	CTATTGGGCGTAATACTAATGGTGTAATTACAAAATGTG AGGCTG
76C	GGATGTTGATGCTGCTGTTTGC GGAATTCTGAGAAATGC
109C	GCATTGATTAATATGGTTTTCCAAATGGGAGAATGCGG TGTGGC
131C	GCTTCAACAAAACGCTGGGATGAAGCAGCATGTAACCT AGC
150C	CGCGCAAAACGAGTCTGTACAACGTTTAGAACTGGCAC

Tabelle 3.2: Die PCR-Primere, jeweils 5'- ... -3'. Pl.V. bezeichnet den Vorwärts-Primer zur Darstellung des Plasmids; Pl.R. den entsprechenden Rückwärts-Primer.

mutation wurde dabei sukzessive durch Mutation von E22C mit dem Primer von T109C eingeführt. Die Nukleotidsequenzen aller Mutanten wurde durch Sequenzierung des gesamten Gens verifiziert (Sequenzierungsprimer war der T7-Promoter Primer).

3.2.3 Expression und Reinigung

Die Expression und Aufreinigung der Mutanten erfolgte nach einem Protokoll von L. Columbus (Gruppe W.L. Hubbell UCLA, CA), vgl. [21, 92]. Dabei wurden alle Proteine in *Escherichia coli* BL21 DE3 Zellen exprimiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 60 mL Luria Broth (LB), das 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanomycin enthält, inokuliert und bei 37°C über Nacht gewachsen. Je 30 mL dieser Vorkultur wurden in 500 mL LB/Kanomycin, das mit 0.5 mg Glucose versetzt wurde, gegeben. Die Kulturen wurden bei 37°C gewachsen bis die optische Dichte bei 600 nm in den Bereich von 1.0-1.2 gelangte. Dann wurden die Zellkulturen mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch zwanzigminütige Zentrifugation mit ca. 10000 g bei 4°C sedimentiert.

Der Zentrifugationsrückstand einer Zellkultur wurde in 30 mL Lysatpuffer (s. Tabelle 3.1), dem 10 mM DTT zugegeben wurde, auf Eis suspendiert. Die Zellen wurden durch fünfminütige Beschallung in einem Spitzenultraschall Desintegrator (Branson Sonifier) auf Eis aufgeschlossen. Nach Zentrifugati-

on des Aufschlusses bei 27000 g und 4°C wurde der Überstand durch einen 0.2 mm Spritzenfilter von Schwebpartikeln befreit und direkt auf eine Kationenaustauschsäule (SP Sepharose Hi-Trap) gegeben.

Unter Verwendung eines linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M NaCl wurde T4L bei ca. 0.25 M NaCl eluiert. Die Reinheit des Proteins wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) überprüft (8-25% Gel). Lag diese unterhalb 95% wurde eine weitere Reinigung über eine Nickelaffinitätssäule (HiTrap chelating) vorgenommen. Nach Anbindung über den Histidinanker wurde T4L durch Spülen mit einem Imidazol enthaltenden Puffer gewonnen. Die gereinigten Mutanten wurden in Anwesenheit von Dithiothreol (DTT) bei -20 bzw. -80°C gelagert.

3.2.4 Spinmarkierung

Zur Kopplung der Cysteinmutanten mit dem Markierungsreagenz MTSSL wurden die Proteinlösungen über eine Gelfiltrationssäule (Hitrap Desalting, Amersham Biosciences) von DTT befreit und in den Spinmarkierungspuffer überführt (s. Tabelle 3.1). Die Proteinlösungen wurden mit einem zehnfachen molaren Überschuss an MTSSL versetzt und 1-4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trennung des markierten Proteins von überschüssigem Markierungsreagenz erfolgte über dieselbe Chromatographiesäule. Durch die Wahl des Elutionspuffers wurde das Protein in den benötigten Adsorptionspuffer überführt (s. Abschnitt 3.1). Die Proteinlösungen wurden mittels Zentrifugationsfilter (Microcon concentrator, 10 kDa cutoff) konzentriert.

Die spinmarkierten Mutanten werden im Folgenden mit der Position der Mutation und der Abkürzung R1 für die spinmarkierte Seitenkette bezeichnet.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der verwendeten Lösungen erfolgte über die Intensität der ESR-Spektren. Die Eichung der ESR-Intensität wurde mittels Proben hoher Konzentration anhand der Absorption bei 280 nm vorgenommen.

3.3 Präparation der Oberflächen

Es wurden drei Modelloberflächen zur Strukturbestimmung adsorbierten T4 Lysozyms präpariert: eine reine Quarzoberfläche, Lipiddoppelschichten ver-

schiedener Struktur und chemischer Zusammensetzung und ein selbstorganisierender Thiolfilm auf einer Goldoberfläche.

3.3.1 Die Quarzoberfläche

In den Untersuchungen zur Adsorption von T4L an Quarzoberflächen dienten die beiden Innenseiten der Fenster einer ESR-Flüssigkeitszelle (s. 3.4) als Oberflächen zur Proteinadsorption. ESR-Flüssigkeitszellen bestehen aus zwei planen Fenstern aus hochreinem synthetischen Quarz. In der Zelle ER160FC-Q (Bruker), welche für die in Kapitel 6 beschriebenen Experimente verwendet wurde, ist dies Suprasil und die innere Fläche der Zellwände beträgt jeweils ca. 9.5-60 mm. Das Volumen im Flachbereich beträgt 150 μ L. Vor der Proteinadsorption wurde die Zelle einer intensiven Reinigungsprozedur unterworfen. Diese beinhaltet sequentielles Spülen mit Wasser, Ethanol, Aceton und Chloroform sowie mindestens vierstündiges Lagern in Chloroformlösung und nachfolgendes Spülen mit den Lösungsmitteln in umgekehrter Reihenfolge. Zwischen der Ethanol und Wasserspülung wird ein dreiminütiges Beschallen im Ultraschallbad eingefügt. Die im Stickstoffstrom getrocknete und von Schwebpartikeln befreite Zelle wurde sofort in einen Muffelofen überführt und sechs Stunden bei 600°C geheizt. Die Aufheizrate betrug maximal 5 K/min und die Abkühlrate maximal 3 K/min. Nach Abkühlen auf 40-80°C wurde die Zelle mit Stickstoff gespült bis sie Raumtemperatur hatte und direkt mit Proteinlösung in Bindungspuffer befüllt. Die Reaktionszeit betrug vier Stunden. Danach wurde durch Spülen mit 3 mL Bindungspuffer überschüssiges Protein entfernt. Zur Messung der Desorption wurde die Oberfläche nach 24 h wiederum mit 3 mL Bindungspuffer gespült.

3.3.2 Die Lipiddoppelschichten

Lipiddoppelschichten wurden in Lösung als sphärische Vesikel sowie auf einer Quarzoberfläche in Form unilamellarer planarer Schichten dargestellt. Zur ESR-spektroskopischen Untersuchung wurden 2% eines spinmarkierten Lipids zugefügt. Hierfür wurde 1-Palmitoyl-2-Stearoyl-(7 bzw. 14-doxyl)-phosphatidylcholin (7- bzw. 14-doxyl PSPC) verwendet.

3.3.2.1 Vesikellösungen

Zur Darstellung wässriger Lipidsuspensionen wurden die in Chloroform gelagerten Lipide im gewünschten molaren Verhältnis gemischt, im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit und nach einstündiger Evakuierung im

Exikkator über Nacht getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden in der entsprechenden wässrigen Pufferlösung suspendiert. Im Falle der Dioleoylphosphatidylserin (DOPS) / Dioleoylphosphatidylcholin DOPC Lipiddoppelschichten war dies Puffer A; zur Herstellung aller anderen Lipiddoppelschichten wurde zunächst der Bindungspuffer verwendet (s. Tabelle 3.1).

Zur Herstellung großer unilamellarer Vesikel wurden die vorliegenden großen multilamellaren Vesikel durch Extrusion durch Polycarbonatmembrane definierter Porengröße zerstört [79]. Dabei wurden Membrane mit Porendurchmessern von 100, 400 und 1000 nm verwendet und die Lipidsuspension jeweils 20fach durch die Membrane abnehmender Porengröße geführt. Diese Prozedur liefert für die kleinste Porengröße Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 120 nm.

Kleine unilamellare Vesikel (mit Durchmessern von 15-50 nm) wurden, wie erstmals von Bärenholz et al beschrieben [4], durch Öffnung der multilamellaren Vesikel im Ultraschall mittels eines Spitzenultraschall Desintegrators (Branson Tip Sonifier) dargestellt. Die kleinen Vesikel wurden durch Ultrazentrifugation in einer Beckmann Airfuge Zentrifuge ($\simeq 135\,000\text{ g}$) von größeren Vesikeln und Titanverunreinigungen aufgrund der Ultraschallspitze getrennt.

3.3.2.2 Festkörpergestützte Lipiddoppelschichten

Die Adsorption der wie in 3.3.2.1 dargestellten kleinen unilamellaren Vesikel auf sauberen Quarzoberflächen führt unter geeigneten experimentellen Bedingungen (pH, Ionenstärke) zur Ausbildung einer unilamellaren Lipiddoppelschicht auf der Oberfläche [23]. Als Trägeroberfläche wurden hier die beiden Innenflächen von ESR-Flachzellen (s. Abschnitt 3.4) benutzt, die vorher in 3.3.1 beschriebenen Reinigungsprozedur unterworfen wurden. Danach wurde die Zelle direkt mit Vesikellösung befüllt und zwei Stunden inkubiert. Die überschüssigen Vesikel wurden mit 3 mL der Pufferlösung, die zur Adsorption verwendet wurde, entfernt.

Die so dargestellten planaren Lipiddoppelschichten wurden je nach folgendem Experiment unterschiedlichen Bedingungen unterworfen.

Zur Proteinadsorption auf der neutralen chelatisierenden Lipiddoppelschicht (DOPC/ DOGS-NTA Ni¹ 9:1) (Kapitel 5) wurde diese zunächst mit einem phosphatfreien Puffer (HEPES-Puffer, s. Tabelle 3.1) gespült und wenige Minuten mit einer 0.1 M NiSO₄-Lösung versetzt, um die vollständige Beladung der NTA-Gruppen mit Nickel sicherzustellen. Nach Entfernen der Nickelionen mit phosphatfreiem Puffer wurde die Schicht wieder mit Bin-

¹1,2-Dioleoyl-3-{[N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure]succinyl}Nickel

dungspuffer äquilibriert.

Der negativ geladenen, chelatisierenden Lipiddoppelschicht (DOPC/ DOPS/ DOGS-NTA Ni 6.5:2.5:1) wurden keine Nickelionen angeboten, um Phaseneffekte aufgrund der Wechselwirkung zweiwertiger Ionen in Lösung mit den PS-Lipiden zu verhindern (vgl. Kapitel 7). Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke wurde die Lipiddoppelschicht nach Vesikelspreizung mit 10 mM HEPES-Puffer variierender NaCl-Konzentration äquilibriert.

Die DOPC/DOPS Lipiddoppelschicht, die zur Anbindung des Annexin-Fusionsprotein dargestellt wurde (Kapitel 4, 5), wurde mit Puffer B (s. Tabelle 3.1) gespült, der 1 mM Calciumionen enthält, um eine Adsorption des Annexins zu initiieren.

3.3.2.3 Proteinadsorption

Zur Anbindung von T4L an chelatisierende Lipidvesikel (DOPC/ DOGS-NTA Ni 9:1) wurden 0.3 mg/mL T4L in Bindungspuffer mit einem 5-10 fachen molaren Überschuss an Vesikelsuspension inkubiert. Nach einstündiger Reaktionszeit wurde eine quantitative Umsetzung des Proteins ESR-spektroskopisch in Form der verlangsamten globalen Rotation des Proteins beobachtet.

Auf den quarzgestützten, planaren Schichten dieser Lipide wurde T4L ebenfalls durch Anbieten von Proteinlösungen in Bindungspuffer adsorbiert. Hierbei konnten jedoch geringere Konzentrationen verwendet werden; diese lagen im Bereich von ca. 0.2 mg/mL. Als Adsorptionszeit wurden vier Stunden gewählt. Dagegen wurde bei der Adsorption des Proteins auf der negativ geladenen, chelatisierenden Lipiddoppelschicht bei Proteinkonzentrationen im Bereich von 0.1 bis 0.4 mg/mL explizit gezeigt, dass das System sich bereits nach einer Stunde in der Sättigung befindet.

Die Anbindung des Annexin-T4L Fusionsproteins an die DOPS/DOPC Membran erfolgte ebenfalls nach einstündiger Exposition einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 0.2 mg/mL in Puffer B.

Das Lösen der spezifischen Protein-Oberflächen-Wechselwirkung geschah in allen Fällen durch Beimischen von 0.05 M EDTA zu dem zur Proteinadsorption verwendeten Puffer.

3.3.3 Der selbstorganisierende Thiofilm (SAM)

Die Verwendung selbstorganisierender Thiofilme als Modelloberflächen zur Untersuchung der Proteinadsorption eröffnet den Zugang zu einer vielfältigen Kopfgruppenchemie (s. Kapitel 4) und damit einer Variation der che-

mischen Eigenschaften der Modelloberflächen. Zugleich werden die zugehörigen experimentellen Schritte beträchtlich erschwert. Dies beginnt bereits mit der Präparation der Oberfläche, da funktionalisierte Thiole kaum käuflich erwerbbar sind, und deren Herstellung üblicherweise bereits ein eigenes Gebiet organisch-chemisch ausgerichteter Arbeitsgruppen darstellt. Des Weiteren muss die Präparation und Messung in verschiedenen Zellen durchgeführt werden, da die Wände der Messzelle nicht mehr gleichzeitig als Probenoberfläche verwendet werden und somit dort unerwünschte, zusätzliche Proteinadsorption stattfinden würde. Dabei bedarf das Handling der Proben besonderer Beachtung, da die Proteine labil gegenüber Luft sind und somit fortwährend unter gepuffert wässriger Umgebung umgesetzt, transferiert und analysiert werden müssen. Die ESR-spektroskopische Untersuchung dieser Proben stellt weitere Anforderungen an den experimentellen Aufbau. Daher wurden in dieser Arbeit die experimentellen Grundlagen zur Präparation und Analyse dieser Systeme gelegt und in ersten Experimenten getestet. Zunächst wurde eine Synthese einer chelatisierenden Ethylenglykolfunktionalisierten Thiolschicht durchgeführt, die ohne großen präparativen Aufwand durchführbar ist (s. Kapitel 4). Der ESR-spektroskopische Aufbau ist in 3.4.3 beschrieben.

Zur Präparation der Thiolfilme wurden Goldoberflächen durch Sputtern von 2 μm dicken Goldschichten auf beiden Seiten eines beidseitig polierten, gereinigten Siliziumwafers der Maße 12·60·0.5 mm hergestellt. Damit liegt die Dicke der Goldschicht im Bereich der Eindringtiefe von Mikrowellen in Gold (2.5 μm), so dass ein Großteil der Mikrowellen nicht bis zum Silizium vordringt und der goldbeschichtete Wafer für die Mikrowellenstrahlung hauptsächlich als Metall erscheint. Vor der Beschichtung wurde der Wafer mit Trichlorethan gereinigt, in Caroscher Säure für 10 min auf 100°C erhitzt, mit Wasser gespült, im Ultraschallbad von Ablagerungen befreit und schließlich im Stickstoffstrom getrocknet. Als Haftschrift zwischen der Waferoberfläche und Gold wurden 20 Å Chrom aufgebracht. Die Qualität der erhaltenen Oberflächen wurde anhand der Ordnung eines Octadecanthiolfilmes IR-spektroskopisch über die Banden der CH_2 -Streckschwingungen überprüft. Mit Banden bei 2850 cm^{-1} und 2919 cm^{-1} der symmetrischen bzw. asymmetrischen Streckschwingung, die nahe am kristallinen Grenzfall liegen, ergibt sich das Bild einer molekular flachen Goldschicht, die bei diesen Dicken nicht durch Aufdampfen erreicht werden konnte. Die frisch präparierten Goldschichten wurden direkt aus der Sputterkammer für zwei Stunden in ein Rollrandglas mit einer Lösung von 16 mg (2.5 mM) Dithiolbissuccinimidylundecanoats in 24 mL Dioxan gegeben. Nach Waschen mit Dioxan, Ethanol und Wasser wurden die Wafer in 25 mL einer wässrigen 0.01 M $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ (x, y=1,2) Lösung (pH 8) überführt, die 18 mg (20 mM) N-(5-

Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure (AB-NTA) und 70 μL (20 mM) Triethylenglykolamin (EG_3NH_2) enthielt und für 2 h zur Reaktion gebracht. Nach Waschen mit reiner Phosphatlösung wurde der Film für 30 min in Phosphatlösung bei pH 7.5 hydrolysiert. Nach Spülen mit phosphatfreiem Puffer wurde der Film wie in Abschnitt 3.3.2.3 beschrieben mit Nickelionen beladen. Zur Proteinadsorption wurde eine 0.2 mg/mL T4L-Lösung in einem Teflonschlitz von 1-60 mm mit dem Wafer bei RT inkubiert. Der Teflonschlitz wurde so gefertigt, dass an den Enden eine seitliche Halterung besteht, damit die erforderliche Proteinmenge minimiert und gleichzeitig auf beiden Seiten der Thiofilm erhalten bleibt. Von da an wurde die Berührung der Oberfläche mit Luft vermieden. Daher wurde der Wafer in einem Pufferbad (500 mL Bindungspuffer) geschwenkt, um überschüssiges Protein zu entfernen, und dort in die Messzelle überführt (s. Abschnitt 3.4).

3.4 ESR-Spektroskopie

Die ESR-spektroskopischen Messungen wurden an einem Bruker EMX Spektrometer durchgeführt. Im Folgenden sollen kurz die hier enthaltenen wichtigsten Baugruppen aufgeführt werden.

Die Mikrowellenstrahlung wird von einem Halbleiterbauelement, der Gunn Diode, erzeugt. Die Frequenz der Strahlung liegt zwischen 9 und 10 GHz. Sie wird in der ESR-Spektroskopie üblicherweise X-Band genannt. Die Magnetfeldstärke, die bei einem g-Faktor von 2 benötigt wird, liegt bei etwa 3500 G und wird durch einen Elektromagneten erzeugt. Da die Magnetfeldstärke in einfacherer Weise variiert werden kann als die Frequenz der Mikrowellenstrahlung wird in gewöhnlichen cw-ESR-Spektrometern das Magnetfeld und nicht die Frequenz der anregenden Strahlung verändert, um ein Spektrum zu erzeugen. Für die hier gezeigten Spektren wurde die Magnetfeldstärke in einem Bereich von 100 G variiert.

Die Ausgangsleistung von 200 mW kann mittels eines Abschwächers um bis zu 60 dB reduziert werden. Die Abschwächung wird so gewählt, dass die Probe mit der maximalen Leistung bestrahlt wird, die noch keine Sättigungseffekte hervorruft. Für die in dieser Arbeit dargestellten ESR Spektren betrug die Abschwächung stets 20 dB (2 mW). Diese Strahlung wird über einen Zirkulator in einen Hohlraumresonator geleitet. Befindet der Hohlraum sich bei der eingestrahlten Strahlung in Resonanz, so ist die auf die Probe einwirkende elektromagnetische Energie um ein Vielfaches größer als die einer sich frei ausbreitenden Welle. Der Hohlraumresonator wird vor dem Experiment an die eingestrahlte Mikrowellenstrahlung kritisch gekoppelt. Dies bezeichnet die Situation, in der die vom Resonator reflektierte Leistung keine

Funktion der eingestrahlten Leistung ist und somit die maximale elektromagnetische Energie im Resonator gespeichert wird. Hierfür wird zunächst die Frequenz der Mikrowellenstrahlung an diejenige des Resonators nach Beladen mit der Probe angepasst. Die Frequenz hängt dabei von den dielektrischen Eigenschaften der Probe und der Resonatorwände sowie der geometrischen Anordnung der Probe im Resonator ab. Anschließend wird der Resonator mittels einer Iris-Schraube so geregelt, dass die reflektierte Leistung des Resonators minimal ist. Damit wird die Impedanz von Hohlwellenleiter und Resonator angepasst.

Zudem können Resonatoren verschiedener Geometrie und somit verschiedener Feldverteilung hergestellt werden, die so gewählt werden können, dass die magnetische Komponente der Strahlung am Ort der Probe maximal und die elektrische Komponente minimal ist. Letzteres ist insbesondere für wässrige Proben von entscheidender Bedeutung, weil sie sich durch hohe dielektrische Verluste auszeichnen. In der ESR-Spektroskopie werden alle Verluste in der Güte des Resonators, d.h. dem Quotienten aus in den Resonator eingebrachter und gespeicherter Leistung, parametrisiert. Die erhaltene ESR-Intensität ist direkt proportional zu der Güte.

Während des ESR-Experiments befindet sich der Resonator innerhalb des statischen Magnetfeldes. Wird nun ein Spinübergang induziert, so kommt es im Resonator zu einer Adsorption von Mikrowellenstrahlung. Dies führt zu einer Verstimmung des Resonators und damit zu einer Veränderung der Reflexion. Die reflektierte Strahlung wird durch den Zirkulator auf eine Kristalldiode geleitet und die reflektierte Leistung in Form eines Diodenstroms gemessen. Das ESR-Signal wird somit in einer Änderung des Diodenstroms detektiert. Da Kristalldioden erst oberhalb einer gewissen Strahlungsleistung ihr Empfindlichkeitsmaximum erreichen, wird die Diode durch einen Referenzarm vorgespannt.

Die gemessenen Änderungen sind jedoch sehr klein im Verhältnis zu dem Grundsignal. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wird nicht direkt der Diodenstrom als Messsignal verwendet sondern die sog. Lock-in-Technik angewandt. Das statische Magnetfeld wird durch eine Helmholtzspule, die am Resonator angebracht ist, mit einer einstellbaren aber festen Frequenz (hier 100 Hz) moduliert. Damit wird der Diodenstrom moduliert und von einem phasensensitiven Detektor wird nun nur die modulierte Signalkomponente gemessen. Nach Gleichrichtung mittels eines Lock-in-Verstärkers erhält man als Ausgangssignal des Lock-in-Verstärkers die Änderung des Messsignals mit dem Feld oder auch die erste Ableitung des ESR-Absorptionsspektrums. Die Modulationsamplitude und Frequenz sowie die Zeitkonstante des Lock-in-Verstärkers müssen dabei so gewählt werden, dass sie die Gestalt des ESR-Spektrums nicht beeinflussen. Zur Aufnahme der gezeigten Spektren

	Amp	P [mW]	ν [kHz]	t_c [ms]	t_{conv} [ms]	B_{mod} [G]
Lipide	$1 \cdot 10^4$	2	100	5.24	10.48	2
Proteine	$1 \cdot 10^4$	2	100	5.24	10.48	3

Tabelle 3.3: Die verwendeten Parameter des ESR-Spektrometers, wobei Amp die Verstärkung, P die Mikrowellenleistung, ν die Modulationsfrequenz, t_c die Zeitkonstante des Lock-in-Verstärkers, t_{conv} die Akkumulationszeit pro Punkt und B_{mod} die Modulationsamplitude bezeichnet.

wurden die in Tabelle 3.3 angegebenen Parameter benutzt.

Die verwendeten Modulationsamplituden sind nahe an der Grenze dessen, was zu einer Verbreiterung der Linien führt. Da in dieser Arbeit jedoch jeweils mit einer Anzahl von Spins gearbeitet wurde, die am Rande des Detektionsgrenzwertes liegen, musste die Modulationsamplitude so hoch als möglich gewählt werden. Dies hat zur Folge, dass die sehr mobilen Teile der Spektren, die von entfaltendem oder global rotierendem Protein produziert werden, durch die Modulation beeinflusst werden. Diese Verbreiterung zeigt sich auch bereits bei der mobilsten markierten Stelle 22. Die Spektren in Lösung wurden zum Vergleich unter identischen Parametern aufgenommen. Um das Ausmaß von Modulationseffekten aufzuklären, wurde die Modulationsamplitude gesenkt, bis keine Veränderung der Spektren stattfand.

Zur Aufnahme eines Spektrums wurden in der Regel 1000 scans zu 10 s akkumuliert. Dies ergibt eine Messzeit von ca. 170 min. Je nach der Anzahl der vorhandenen Spins wurde diese Zeit zwischen 50 und 850 min variiert.

3.4.1 Messungen an Lipiddoppelschichten

Alle Messungen an quarzgestützten Lipiddoppelschichten wurden in einem Resonator sphärischer Geometrie durchgeführt. Dieser Resonator zeichnet sich im unbeladenen Zustand durch eine hohe Güte von $\simeq 10000$ aus (die hier angegebenen Werte für die Güte beziehen sich jeweils auf die Messung im Bruker WinAcquisit Programm). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Orientierungsmessungen unter Variation des Winkels zwischen Magnetfeld und Probe hat dieser Resonator zudem den Vorteil, dass die Probe im Resonator gedreht werden kann, ohne dass die Güte wesentlich verändert wird, da die Knotenebenen des elektrischen Feldes im sphärischen Feldverlauf dicht liegen. In Abbildung 3.1 ist die magnetische Felddichtevertellung einer solchen Mode dargestellt. Die hellen Stellen bezeichnen dabei Maxima in der magnetischen und Minima in der elektrischen Feldstärke.

Als Quarzunterlage dienten jeweils die Innenwände von ESR-Flachzellen

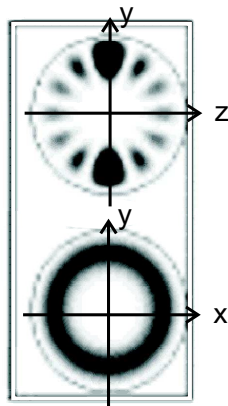


Abbildung 3.1: Die magnetische Felddichteverteilung in einem sphärischen Resonator [130].

aus Quarz. Diese wurden für wässrige (und damit verlustreiche) Proben jedoch zur Messung in Standard Rechteckresonatoren optimiert. Der Messbereich besteht aus zwei rechteckigen Fenstern im Abstand von 0.3 mm. Sind die Fenster in der Knotenebene des elektrischen Feldes ausgerichtet, so ergibt eine Schichtdicke des Wassers von 0.3 mm eine Optimierung des analysierbaren Probenvolumens und der dielektrischen Verluste. In dieser Arbeit wurde zunächst von Standardzellen der Firma Wilmad bzw. Bruker ausgegangen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Güte des hier verwendeten sphärischen Resonators sehr stark von der genauen Schichtdicke des Wassers abhängt und deren Streuung für Standardzellen derart hoch sind, dass sie bei Einbringen der gefüllten, gekauften Flachzellen in einem Bereich von 3600 bis 4800 schwankt. Da die Zellen in dieser Arbeit hauptsächlich zur Untersuchung der Oberflächenspezies und nicht der darüber liegenden Lösung benutzt wurden, vergrößert die Maximierung der Schichtdicke nicht das erhaltene ESR-Signal. Die Wasserschicht wird lediglich als Umgebung für den Lipidfilm bzw. die adsorbierte Proteinschicht benötigt. Es ist jedoch wünschenswert, dass ein Durchflussbetrieb der Zelle möglich ist. Daher wurde in der Folge eine Zelle konstruiert, die eine Schichtdicke von 0.2 mm besitzt. Diese wurde von der Firma Hellma angefertigt. Aufgrund der von der Firma Hellma verwendeten Technik erniedrigt sich die innere Fensterbreite um ca. 1 mm. Aufgrund der geringeren Dicke der Wasserschicht erhöht sich die Güte des sphärischen Resonators in Anwesenheit der gefüllten Zelle auf ca. 6000, die erhaltene Oberflächenintensität gleicht jedoch aufgrund der verringerten Probenfläche derjenigen der „besten“ WG-812-Q Zelle. Die in Kapitel 5 beschriebenen Orientierungsmessungen wurden in der „besten“ WG-812-Q-Zelle durchgeführt,

die zu einer Güte von 4800 des sphärischen Resonators führt. Die Messungen an der Quarzoberfläche wurden in der ER160FC-Q-Zelle vorgenommen (Kapitel 6). Die spezialangefertigte Zelle wurde zusammen mit der WG-812-SQ-Zelle ($Q \simeq 4000$) für die in Kapitel 7 dargestellten Untersuchungen verwendet.

Um die Güte für jede Probe zu optimieren, wurde die Probenposition im Resonator vor jedem Experiment mittels Probehaltern feinjustiert, die ein Verkippen der langen Achse der Zelle erlauben. Hierbei wird die Flüssigkeitsschicht der Probe möglichst exakt in die Knotenebene des Resonators gebracht.

ESR-Messungen unter Variation des Winkels θ zwischen statischem Magnetfeld und Oberflächennormale wurden durch Rotation der Flachzelle im Resonator und Messung des Winkels mit Hilfe eines selbst konstruierten Goniometers durchgeführt.

Die Spektren der Lipiddoppelschichten wurden bei konstanter, definierter Temperatur aufgenommen. Hierfür wurde eine Einheit zur Temperaturkontrolle konstruiert, die auf der Temperierung eines Luftstroms, der durch den Resonator geführt wird, basiert. Hiermit wurden Temperaturen zwischen 18 und 28°C erreicht, die mit Hilfe eines Platinwiderstandelements gemessen wurden.

Die Spektren der adsorbierten Proteine wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Da der Magnet gekühlt wird, ist diese im Resonator relativ konstant und liegt im Bereich von 19-24°C.

3.4.2 Messungen in Lösung

Die ESR-Spektren von in Lösung befindlicher Proben, Proteine und Lipidvesikel, wurden ebenfalls in Quarzflachzellen im sphärischen Resonator erfasst. Zu den Proteinen wurden 30 Gew.% Sucrose gegeben, um die Viskosität der Lösung derart zu erhöhen, dass die Zeitskala der globalen Rotation von T4L in Bereiche verschoben ist, die das Protein für die ESR-Spektroskopie statisch erscheinen lassen [92]. Gleichzeitig verändert Sucrose dieser Konzentration nicht die Mobilität der Seitenketten [67]. Für die Vesikel ist dies aufgrund des größeren hydrodynamischen Radius nicht nötig.

3.4.3 Aufbau einer Messanordnung für selbstorganisierende Thiofilme

Die ESR-spektroskopische Untersuchung von Proteinen, die an Thiofilmen auf Goldoberflächen adsorbiert sind, stellt durch die Anwesenheit eines Metalls und eines verlustreichen Dielektrikums (Wasser) im Resonator eine große

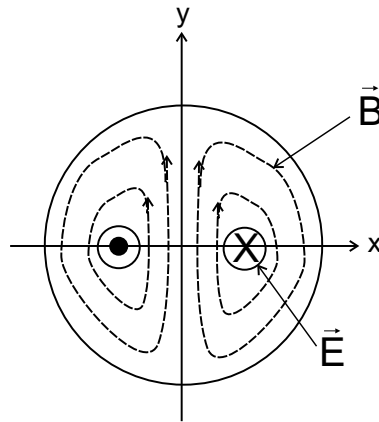


Abbildung 3.2: Das Feldlinienschema des magnetischen und elektrischen Feldes in einem TM_{110} Resonator.

Herausforderung dar. Analog der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Quarzzellen, gilt auch hier eine Obergrenze von 0.3 mm für die gesamte Wasserschicht. Jedoch verändert gleichzeitig das im Resonator befindliche Gold den Feldverlauf der stehenden elektromagnetischen Welle, weil alle elektrischen Feldlinien auf dem Metall enden. Diese Veränderungen werden minimiert, wenn die Metallschicht nahe des resonatoreigenen Minimums des elektrischen Feldes positioniert wird. Im Falle des sphärischen Resonators wurde der Gütewert durch Einführen des goldbeschichteten Wafers nahezu auf null reduziert. Dies zeigt, dass im sphärischen Resonator die Feldlinien so dicht sind, dass die Störung durch den Wafer zu einem Zusammenbruch der ursprünglichen Feldverteilung führt. Daher wurde für die ESR-Messungen an den Thiofilmen ein zylindrischer Resonator verwendet, der in einer transversal magnetischen TM_{110} Mode betrieben wird. Dabei geben die Indizes die Variation des (hier magnetischen) Feldes entlang der x, y und z-Achse in Einheiten der halben Wellenlänge an. Da die Mode in z-Richtung nicht variiert, ist in Abbildung 3.2 der Verlauf der elektrischen und magnetischen Feldlinien lediglich im Schnitt in der xy-Ebene dargestellt. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass der Resonator eine zentrale Knotenebene des elektrischen Feldes besitzt. Die Güte im unbeladenen Zustand von 5500 verringert sich in der Anwesenheit des goldbeschichteten Siliziumwafers nur auf 2500, da die zentrale Knotenebene breiter als diejenigen des sphärischen Resonators ist. Zudem zeichnet er sich durch einen hohen Füllfaktor aus. Dies bedeutet, dass größere Probenmengen in den Resonator eingebracht werden können, wodurch die erhaltene ESR-Intensität erhöht wird.

Als Probenküvette wurde eine Zelle konstruiert, die ebenfalls von der

Firma Hellma gefertigt wurde. Diese besteht aus einem Flachzellenbereich mit abnehmbarem Fenster und einer Schichtdicke von 0.8 mm, an den zwei Röhren für den Durchflussbetrieb angebracht sind. So kann sich in Anwesenheit des 0.5 mm Wafers eine Wasserschicht von ca. 0.3 mm ausbilden. Die Flächen sowie die kurzen Seiten des Fensters sind poliert, ebenso wie die entsprechenden Dichtungsbänke der Zelle. Zur vollständigen Dichtung wurde zudem eine dünne Vakuumfettschicht (Beckmann) benötigt, die keine ESR-Störsignale produziert. In dieser Anordnung kann eine Güte des gefüllten TM_{110} -Resonators von 1500 erreicht werden. Es zeigt sich jedoch auch hier, dass eine Verringerung der Schichtdicke des Wassers wünschenswert ist. Bei Verringerung der Wasserschicht durch Zugabe dünner Glasplättchen auf 0.15 mm erhöht sich die Güte auf 2300. Hierbei wird zudem beobachtet, dass erst eine gleichmäßige Verteilung des Wassers auf beide Seiten des Wafers diese Verbesserung der Güte ermöglicht.

Da die Zelle in dem TM_{110} -Resonator nicht gedreht werden kann, wird zur Messung winkelabhängiger Spektren der Magnet um den Resonator gedreht. Hierfür wurden die Polkappen des Elektromagneten durch dünnere ersetzt, so dass der Abstand der Kappen vergrößert und alle Winkel θ zwischen 0 und 90° zugänglich werden.

3.5 Infrarotspektroskopie

Zur Aufnahme der Infrarot(IR)-Absorptionsspektren wurde ein Fourier-Transform-IR-Spektrometer der Firma BIO-RAD verwendet, BIO-RAD FTS-40 VM, das im Rahmen der Doktorarbeit von J. Schmidt an eine Vakuumkammer angekoppelt wurde [116]. Dabei wurde der IR-Lichtstrahl aus der Interferometerkammer ausgekoppelt, so dass er Proben in der Vakuumkammer unter streifendem Einfall bestrahlt, und danach mittels eines externen, durch flüssigen Stickstoff gekühlten MCT (Mercury, Cadmium, Tellur)-Detektor analysiert wird.

Jedes IR-Spektrum ist neben der Absorption durch die eigentliche Probe von den Emissionseigenschaften der Quelle, Abbildungseigenschaften der optischen Elemente und der Abbildungscharakteristik des Detektors bestimmt. Diese Anteile müssen durch Subtraktion einer Referenz eliminiert werden. Da das verwendete Spektrometer ein Einstrahlexperiment ist, erfolgt dies durch Subtraktion einer entsprechenden Referenzprobe. Hier waren dies Goldbeschichtete Wafer, die mit Ethanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet wurden. Die untersuchten Thiofilme wurden ebenfalls jeweils vor der Messung der IR-Absorption in dieser Weise endgereinigt. Da die Filme unter Atmosphärenbedingungen stabil sind, ist die Analyse unter Vakuumbedin-

gungen nur aufgrund der IR-Absorption der Atmosphäre erforderlich. Hierfür sind Hochvakuumbedingungen ausreichend (der Restdruck betrug üblicherweise 10^{-7} mbar)

Die Auflösung des Spektrometers beträgt 2 cm^{-1} . Zur Datenaufnahme und -transformation wurde das Programm WIN-IR 4.14 von BIO-RAD benutzt.

3.6 Auswertung und Fehlerbetrachtung

3.6.1 Bearbeitung der ESR-Spektren

Aufgrund der langen Messzeit treten in den ESR-Spektren der Oberflächen Basisliniendrifts auf. Die Subtraktion dieser Effekte gelingt jedoch nicht durch vorherige Aufnahme einer Basislinie, da sie von einer Reihe nicht reproduzierbarer Faktoren, wie z.B. die genauen Einstellungen der Mikrowellenbrücke oder die exakte Probenposition, bestimmt wird. Daher wurden die erhaltenen Spektren (der 1. Ableitung) manuell durch Subtraktion einer linearen Basislinie derart korrigiert, dass das Absorptionsspektrum an jeder Stelle positiv (bzw. null) ist. Die Drifts sind jedoch nicht stark und die vorgenommene Korrektur verändert die Linienformen nicht.

Insbesondere in den Proteinen in Lösung können sich noch Reste freien Spinmarkierungsreagenz befinden. Das zugehörige scharfe Dreilinienspektrum wurde isoliert aufgenommen und konnte in allen Fällen problemlos von dem (breiteren) Signal des Proteins getrennt werden.

Auch die verwendeten Flachzellen können, obwohl sie aus hochreinem Quarz bestehen, Störsignale produzieren. Dies wurde insbesondere bei der Bruker (ER160FC-Q)-Zelle deutlich (s. Kapitel 6). Da sie von der genauen Probenpositionierung abhängen, sind sie für eine saubere Basisliniensubtraktion nicht gut genug reproduzierbar. Daher wurden diese nicht korrigiert.

Der verwendete Parameter der Hyperfeinaufspaltung wird durch Ablesen der Nulldurchgänge der ESR-Spektren erhalten. Die hierbei auftretenden Fehler ergeben sich lediglich aus dem im Spektrum enthaltenden Rauschen. In den Oberflächenspektren der Lipide bzw. Proteine liegt er damit im Mittel bei ca. $\pm 0.2 \text{ G}$.

3.6.2 Bestimmung der adsorbierten Menge

Die Intensität eines ESR-Spektrums ist proportional zu der Anzahl beobachteter Spins. Der Proportionalitätsfaktor beinhaltet neben der Übergangs-

wahrscheinlichkeit und Temperatur der Spezies die Mikrowellenleistung, Detektorstellungen und die Güte des Resonators.

Unter identischen experimentellen Bedingungen kann somit die Intensität verwendet werden, um relative Probenmengen zu bestimmen. Um die Oberflächenbedeckung zu berechnen, muss zudem die beobachtete Fläche bekannt sein. Da die magnetische Feldstärke im Resonator nicht konstant ist sondern eine durch die Mode beschriebene Verteilung aufweist, ist dies nicht gegeben. Durch Variation der Position einer kleinen Probe im Resonator hat sich jedoch gezeigt, dass diese Fläche für den sphärischen Resonator ungefähr 10·10 mm im Zentrum des Resonators sind. Um die Spindichte zu erhalten, wurde die Intensität daher anhand einer Probe bekannter Packungsdichte geeicht. Hierfür wurden DOPC-Lipiddoppelschichten auf Quarz verwendet. Indem die Oberfläche des Lipidmoleküls bekannt ist, kann für jede Flachzelle das Verhältnis aus ESR-Intensität und Spindichte bestimmt werden.

Die Bedeckung der Oberfläche mit Protein kann nur auf der Basis der Annahme einer Adsorptionskonformation bestimmt werden. In dieser Arbeit wird in allen Kapiteln eine einheitlich Bedeckungnotation verwendet, um einen anschaulichen Vergleich der Situationen auf den untersuchten Oberflächen zu ermöglichen. Diese Notation beruht auf der Adsorptionskonformation bei vektorieller Anbindung von T4L an die neutrale Lipiddoppelschicht (vgl. Kapitel 5).

Die erhaltenen ESR-Spektren stellen die erste Ableitung der Absorptionsspektren dar. Daher muss das Doppelintegral gebildet werden, um die Intensität zu erhalten. Dieses ist insbesondere bei Oberflächenspektren aufgrund der diskutierten Basislinienfehler keine sehr genau bestimmbare Größe. Trotzdem geben die so erhaltenen Daten relative Bedeckungen in guter Weise wieder und können bei sauberer Fehlerbetrachtung verwendet werden, um Trends zu verfolgen. Hierfür wurde jedes Spektrum mehrfach basislinienkorrigiert und der Mittelwert des Integrals gebildet.

Der relative Fehler der gemessenen Intensität steigt mit sinkendem Signal-zu-Rausch-Verhältnis, indem die Basislinienfehler zunehmen. Da dieses proportional zur Quadratwurzel der den Detektor erreichenden Photonen ist, wird der Fehler der Bedeckung mit $1/\sqrt{I}$ skaliert. Der Fehler der Intensität bei Bedeckungen von $\theta = 1$ wird durch die Standardabweichung bestimmt, die bei Wiederholung der Integration desselben Spektrums auftritt. Diese sind für die verwendeten Zellen in Tabelle 3.4 angegeben.

3.6.3 Weitere Parameter

Die ESR-spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bildung des Doppelintegrals von Spektren hoher Intensität. Unter die-

Zelle	ΔI (bei $\theta = 1$)
WG-812-Q	0.1
WG-812-SQ	0.2
ER160FC-Q	0.2
Hellma	0.1

Tabelle 3.4: Abschätzung des prozentualen Fehlers in der Intensität I bei einer Bedeckung $\theta=1$ der Oberfläche mit Proteinen.

sen Bedingungen ist der relative Fehler zu vernachlässigen. Da die Eichung der Konzentration zur Intensität jedoch über die Absorption bei 280 nm des markierten Proteins mit dem Extinktionskoeffizienten des natürlichen, nicht markierten T4L erfolgt, können die Konzentrationswerte mit einem beträchtlichen systematischen Fehler behaftet sein. Für die in dieser Arbeit vorgenommenen Analysen sind jedoch lediglich relative Konzentrationen von Belang.

Die Einheit zur Temperaturkontrolle stellt die Temperatur mit einer Genauigkeit von ± 1 °C ein.

Das anfänglich verwendete Goniometer erlaubt die Einstellung des Winkels zwischen Probennormale auf $\pm 1.5^\circ$; bei neueren Messungen wurde ein verbessertes Goniometer mit einer Auflösung von $\pm 0.5^\circ$ verwendet.

Kapitel 4

Charakterisierung der Modelloberflächen

Für die Untersuchung der strukturellen Eigenschaften adsorbierter Proteine in Abhängigkeit der physikalischen und chemischen Eigenschaften der beteiligten Oberfläche ist es von entscheidender Bedeutung, ein geeignetes System von Modelloberflächen zur Verfügung zu haben, deren Struktur und Oberflächeneigenschaften definiert und charakterisierbar sind. Die Modelloberflächen müssen zudem auf der Zeitskala der Experimente – die in dieser Arbeit im Bereich von Tagen liegt – stabil und kompatibel mit biologischen Molekülen sein. Diese Kriterien erfüllen festkörpergestützte Lipiddoppelschichten, wie sie nach Adsorption von kleinen unilamellaren Vesikeln auf reinen Quarzoberflächen darstellbar sind [107]. Daher wurden diese im Großteil der vorgestellten Untersuchungen als Modelloberflächen gewählt. Zur Anbindung des Proteins an die Oberfläche wird eine spezifische Proteinbindungsstelle in die Lipidschichten eingeführt. Dies erfolgt durch Zugabe eines Lipids, das eine NTA-Kopfgruppe trägt, DOGS NTA Ni¹, in einem molaren Anteil von 10%. Wird das Protein mit einem Histidinanker versehen, der aus sechs zusätzlichen Histidinen am N-Terminus des Proteins besteht, so bildet es einen stabilen Nickelkomplex mit der NTA-Kopfgruppe des Lipids (s. Abbildung 4.1). Diese Komplexierung wird bereits in einer der Standardmethoden zur Reinigung von Proteinen in der Flüssigkeitschromatographie genutzt.

Alternativ zu der chelatisierenden Anbindung wird T4L über ein Fusionsprotein mit Annexin (12) auf einer Phosphatidylserin (PS) enthaltenden Membran immobilisiert, indem die Bindung zwischen Phosphatidylserin und Annexin in Anwesenheit von Calcium benutzt wird (s. Kapitel 5.2.6).

¹1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3{[N(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure]succinyl}-Nickel

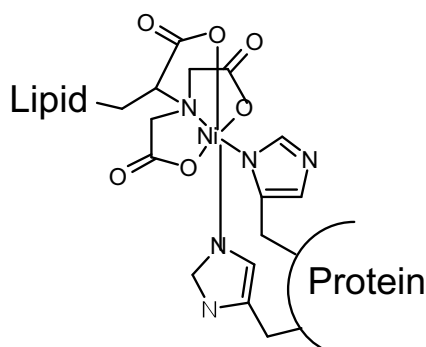


Abbildung 4.1: Nickelkomplex des Histidinankers des Proteins mit der NTA-Kopfgruppe des Lipids.

Festkörpergestützte Lipiddoppelschichten sind bereits intensiv untersucht worden. So kann mit Hilfe der Quarzmikrowaagentechnik die Spreizung adsorbierter Vesikel zu einem planaren Film detektiert und die Kinetik des Adsorptionsprozesses beleuchtet werden [59], da die Messgröße der Resonanzfrequenz der Oberfläche nicht nur von der adsorbierten Masse sondern auch von der Kopplung des Adsorbats mit der Festkörperoberfläche abhängig ist. Fluoreszenz- und Impedanzspektroskopie erlauben eine weitergehende Charakterisierung der dynamischen und elektrischen Eigenschaften der Filme [58, 142]. In diesen Untersuchungen zeigt sich, dass der Bildung der Lipiddoppelschicht die Adsorption intakter Vesikel vorausgeht, die bei geeigneten Bedingungen unter der Ausbildung der planaren Lipiddoppelschicht gespreizt werden. Sehr kleine Vesikel (mit Durchmessern im Bereich unterhalb von 50 nm) sind hierfür besonders geeignet, weil sie eine höhere Reaktivität zur Bildung größerer Aggregate mit benachbarten Vesikeln zeigen. Der pH-Wert und die Ionenstärke des Elektrolyten beeinflussen, insbesondere für Lipide mit geladenen Kopfgruppen, sowohl die Adsorption der Vesikel auf der negativ geladenen Quarzoberfläche als auch die Koagulation der identisch geladenen Vesikel [23].

Durch Verwendung eines geringen Anteils spinmarkierter Lipide kann die ESR-Spektroskopie zur Analyse von Lipidsystemen eingesetzt werden und ermöglicht so den Zugang zu einer Vielfalt struktureller sowie dynamischer Informationen dieser Systeme [50, 82, 127]. Dabei wird das Augenmerk bislang weniger auf orientierte planare Systeme als auf Lipiddispersionen gelegt. Zur Herstellung orientierter Lipidschichten werden üblicherweise Vesikel bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt der Lipide unter Druck auf Glasp-latten immobilisiert und nachträglich rehydratisiert. Auf diese Weise entstehen Lipidmultilagen deformierter großer Vesikel [128]. Die hohe Anzahl von

Lipiddoppelschichten erhöht das Signal drastisch und erleichtert somit die ESR-spektroskopische Analyse. Die Vesikel werden dort jedoch nicht wie im Falle der Adsorption auf Quarz vollständig geöffnet. Dies und die Überlagerung mehrerer Schichten erniedrigt die Gesamtordnung des Films. Daher stellen die einzelnen Lipiddoppelschichten auf planaren Quarzoberflächen den Prototyp eines orientierten Lipidfilms dar, die bisher noch nicht mit Hilfe einer quantitativen Linienformanalyse durch Simulation der ESR-Spektren untersucht wurden. Untersuchungen an selbstorganisierenden Fettsäurefilmen haben jedoch gezeigt, dass eine detaillierte ESR-spektroskopische Analyse festkörpergestützter Filme möglich ist [109].

Die Charakterisierung der Struktur und Dynamik aller in dieser Arbeit verwendeten Lipiddoppelschichten erfolgt durch die qualitative und quantitative Linienformanalyse der ESR-Spektren von Lipidfilmen, die mit 2% des in Abbildung 2.3 dargestellten Sondenlipids versetzt werden. Ist die Bewegung des Spinmarkers ausreichend anisotrop, so hängt die ESR-Linienform nicht nur von der Dynamik und Umgebung des Lipids sondern auch von dem Winkel ab, den der Spin und das äußere Magnetfeld einschließen. Liegen die Spinmarker in einem makroskopisch geordneten Ensemble vor, so kann aus Messungen unter Variation des Winkels zwischen Probenormale und äußerem Magnetfeld die Orientierung der Moleküle bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze verwendet, die in Kapitel 2 erläutert sind: Das Modell des Grenzfalles der schnellen Bewegung, das in der vorliegenden Form von Griffith et al. formuliert wurde, und das Modell nach Freed und Mitarbeitern, das durch Lösen der quantenmechanischen Bewegungsgleichung Bewegungen beschreiben kann, die im Bereich der Zeitskala der ESR-Spektroskopie ablaufen. Nach Untersuchung der Anwendbarkeit dieser Modelle auf die planaren Lipiddoppelschichten, werden die Struktur und die Dynamik der in Kapiteln 5 und 7 verwendeten Modelloberflächen analysiert.

Auch selbstorganisierende Monolagen (SAM), wie sie durch Adsorption von Alkanthiolen auf Goldoberflächen dargestellt werden können, stellen stabile organische Oberflächen dar. Im Gegensatz zu Lipiddoppelschichten sind sie weder lateral mobil noch a priori biomimetisch. Die Darstellung und Charakterisierung biokompatibler selbstorganisierender Filme ist ein intensiv bearbeitetes Forschungsgebiet, im Zuge dessen bereits einige biokompatible Oberflächen identifiziert wurden [104]. Der entscheidende Vorteil dieser Filme liegt in der Möglichkeit der flexiblen Variation der Oberflächeneigenschaften mittels präparativ-chemischer Veränderung der Kopfgruppenfunktion. Um diese Oberflächen in Zukunft zur ESR-spektroskopischen Strukturuntersuchung adsorbierter Proteine verwenden zu können, wird in Abschnitt 4.3 die Synthese und Charakterisierung eines Ethylenglykolfunktionalisierten Films vorgestellt.

4.1 Die zwitterionische Lipiddoppelschicht

Als Modellmembran geringer Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen dient eine Lipiddoppelschicht, die aus einem Phosphatidylcholin mit zwei einfach ungesättigten Seitenketten, Dioleoylphosphatidylcholin, besteht und 10% des Chelatorlipids zur spezifischen Proteinanbindung, DOGS NTA enthält. Phosphatidylcholone sind zwitterionische Moleküle, die unter physiologischen Bedingungen insgesamt ungeladen sind. Das spinmarkierte Sondenlipid ist ebenfalls ein Phosphatidylcholin, das jedoch keine ungesättigten Reste trägt. Es wurden zwei verschiedene Positionsisomere des markierten Lipids eingesetzt, in welchen sich die spinmarkierende Doxylgruppe an der Stelle 7 bzw. 14 der Fettsäurekette befindet. Die Werte der \hat{A} - und \hat{g} -Tensoren für den Spinmarker sind Hochfeldstudien entnommen (7-doxyl PSPC) [73] bzw. von Ge et al. (14-doxyl-PSPC) übernommen [37] (s. Tabelle 4.1).

Position	g_x	g_y	g_z	$A_{xx}[\text{G}]$	$A_{yy}[\text{G}]$	$A_{zz}[\text{G}]$
<i>7-doxyl</i>	2.00895	2.00628	2.00263	6.5	5.5	33.7
<i>14-doxyl</i>	2.0082	2.0062	2.0020	5.5	5.5	33.3

Tabelle 4.1: Die verwendeten Hauptwerte der magnetischen Tensoren [73, 37].

4.1.1 Das Modell des effektiven Hamiltonoperators

Wie in Kapitel 2.1.2.2 beschrieben, können die ESR-Spektren von Radikalen, die sich auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie schnell bewegen, unter Verwendung eines effektiven, dynamisch gemittelten Hamiltonoperators simuliert werden. Zur Aufstellung des effektiven Operators in dieser Näherung wird das Bewegungsmodell nach Griffith et al. benutzt, das ebenfalls in Kapitel 2.1.2.2 erläutert wurde [133]. Dort wird die Bewegung des Spinmarkers durch eine Rotation beschrieben, deren Amplitude bei Rotation um zwei der Achsen (x, y) eingeschränkt ist.

Obiges Bewegungsmodell wurde in ein LabView Programm umgesetzt, das zunächst ein Strichspektrum aus Adsorptionsbanden liefert. Das Strichspektrum wird mit einer Funktion für die Linienbreite gefaltet, die abhängig vom Winkel zwischen der z-Achse des Koordinatensystems des effektiven Hamiltonoperators und der Kernspinquantenzahl m sind (s. 2.1.2.2). Die Parameter dieser Funktion werden unabhängig von dem Bewegungsmodell bestimmt. Die Anpassung der simulierten Spektren an die experimentellen erfolgt graphisch. In Lösungen sphärischer Vesikel nimmt der Spinmarker alle möglichen Orientierungen zum äußeren Feld ein, so dass die Spektren

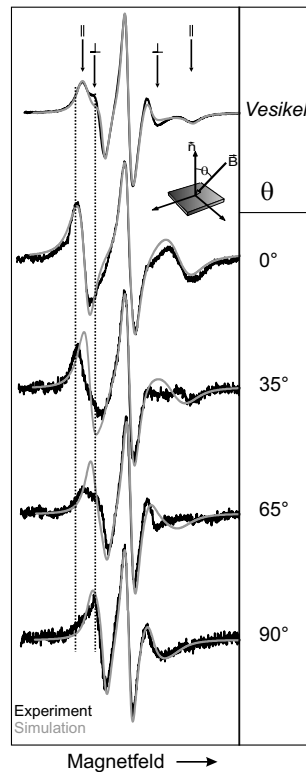


Abbildung 4.2: ESR-Spektren der DOPC/DOGS-NTA/7-doxyl PSLC (88/10/ 2%) Lipide als unilamellare Vesikel bzw. als Lipiddoppelschichten auf Quarz. Letztere wurden unter den angegebenen Polarwinkel θ zwischen magnetischem Feld und Oberflächennormale aufgenommen. Die Scanbreite ist 100 G. Experimentell erhaltene Spektren sind schwarz, mittels des Modells der schnellen Bewegung simulierte Spektren hell dargestellt.

durch Integration über alle Orientierungen zwischen dem molekülfesten Rotationskoordinatensystem und dem Laborkoordinatensystem, in dem das äußere Magnetfeld definiert ist, erhalten werden. Dagegen ist die lange Achsen des Lipids, die als z-Achse des Rotationskoordinatensystems gewählt wurde, in einer perfekt geordneten, planaren Lipiddoppelschicht parallel zur Oberflächennormalen orientiert, so dass hier nur eine Orientierung zwischen den Koordinatensystemen in die Berechnung eines Spektrums eingeht. Eine, auf der Zeitskala der ESR, statische Unordnung der Lipidmoleküle führt wiederum zu einer Mittelung einiger Orientierungen, die hier durch eine Gauß-Verteilung der Orientierungen der z-Achse des Lipids um den Winkel 0° beschrieben werden, wobei die Standardabweichung σ den Unordnungsgrad parametri-

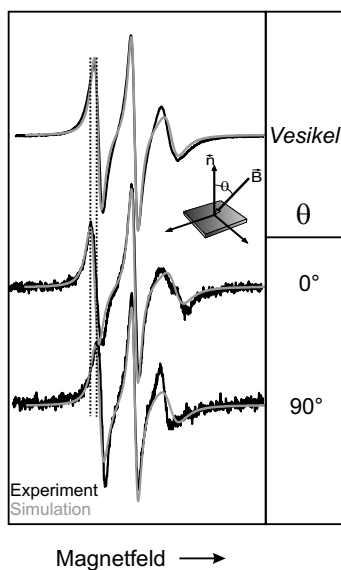


Abbildung 4.3: ESR-Spektren der DOPC/DOGS-NTA/14-doxyl PSPC (88/10/ 2%) Lipide als unilamellare Vesikel bzw. als Lipiddoppelschichten auf Quarz. Letztere wurden unter den angegebenen Polarwinkel θ zwischen magnetischem Feld und Oberflächennormale aufgenommen. Die Scanbreite ist 100 G. Experimentell erhaltene Spektren sind schwarz, mittels des Modells der schnellen Bewegung simulierte Spektren hell dargestellt.

siert.

In Abbildung 4.2 und 4.3 sind die ESR-Spektren der 7-doxyl PSPC bzw. 14-doxyl PSPC markierten Lipiddoppelschichten als Vesikel und als orientierte Filme wiedergegeben. Qualitativ können diese Spektren bereits im Rahmen des vorgestellten Bewegungsmodells verstanden werden. Geht man zunächst vom einfachen Grenzfall aus, in dem die Achse des Stickstoff p-Orbitals, das das freie Elektron enthält (vgl. Kapitel 2), parallel zur Lipidachse orientiert ist, so ergibt die (freie) Rotation des Lipids um diese Achse eine Mittelung der x und y Komponenten in eine „senkrechte“ Komponente. Die ursprüngliche z-Komponente bildet die „parallele“ Komponente des axialsymmetrischen effektiven Hyperfeintensors. Die Libration des Markers dagegen führt zu einer teilweisen Mischung dieser beiden Komponenten. Dies wird im Spektrum in einer Annäherung der beiden Komponenten deutlich.

Aufgrund der fehlenden Ausrichtung der Nitroxide in Vesikellösungen werden hier beide Komponenten im Spektrum sichtbar. Dies wird insbesondere im Spektrum der mit 7-doxyl PSPC markierten Vesikel deutlich. In Abbildung 4.2 sind senkrechte und parallele Komponente des Vesikelspek-

trums markiert. Eine derartige qualitative Differenzierung ist im Spektrum der 14-doxyl PSPC nicht möglich, da die Unterschiede in der Hyperfeinaufspaltung geringer sind als in den Spektren des 7-doxyl PSPC. Hier verringert eine weitgehende Mittelung der beiden Komponenten die maximal beobachtbare Hyperfeinaufspaltung. Dies reflektiert eine stärkere Libration und damit eine erhöhte Mobilität des Markers an der Stelle 14 der aliphatischen Kette als an der kopfgruppennäheren Stelle 7.

Im Falle eines geordneten Films sind parallele und senkrechte Komponenten in Anteilen gemäß ihrer Richtungsosini im Spektrum vorhanden. Dies wird in der Veränderung der Linienformen der Spektren von sowohl 7-doxyl als auch 14-doxyl PSPC bei Rotation der Probe im magnetischen Feld deutlich. Die Extrema liegen bei den Werten $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 90^\circ$. Bei ersterem wird das Spektrum durch die parallele Komponente dominiert und bei 90° durch die senkrechte Komponente. Damit wird bereits qualitativ auf eine Ausrichtung der Lipide in der Oberflächennormalen hingewiesen. Aufgrund der stärkeren dynamischen Mittelung der Anisotropie im Fall des 14-doxyl PSPC variiert die Linienform geringer mit θ . Daher sind in Abbildung 4.3 nur die Spektren für zwei Winkel zwischen Oberflächennormale und Magnetfeld dargestellt.

Da die ESR-Linienform durch die Dynamik der spinmarkierten Lipide bestimmt wird, zeigt sie eine Abhängigkeit von der Temperatur. Dabei bewirken höhere Temperaturen eine stärkere dynamische Mittelung. Um diese Veränderung zu verfolgen, wurde die doppelte Hyperfeinaufspaltung bei $\theta = 0^\circ$ als Parameter gewählt. Dieser lässt sich, wie in Abbildung 4.4 illustriert, aus der Differenz der Nulldurchgänge bei $m = 1$ und $m = -1$ der ESR-Spektren bestimmen und gibt den Abstand der entsprechenden Peaks des Absorptionsspektrums wieder. In Abbildung 4.4 ist der Verlauf dieses Parameters im Bereich von Raumtemperatur für die Spektren von 7-doxyl PSPC dargestellt.

In Abbildungen 4.2 und 4.3 sind die besten Fits an die experimentellen Spektren im Rahmen des beschriebenen Modells hell dargestellt. Die verwendeten Parameter sind in Tabellen 4.2 und 4.3 aufgelistet, ebenso wie die abgeschätzten Fehler. β_D gibt eine Verkippung zwischen magnetischen Koordinatensystem des Nitroxids (vgl. Abbildung 2.3) und dem Rotationskoordinatensystem an. Aufgrund der angenäherten Axialsymmetrie der magnetischen Tensoren des verwendeten Markermoleküls genügt die Berücksichtigung des Kippwinkels zwischen den z-Achsen. S wird in der Literatur als Ordnungsparameter bezeichnet und ist (gemäß der Definition in Abschnitt 2.1.2.2) ein Maß für die Einschränkung der Libration des Nitroxids. Dagegen gibt σ die Standardabweichung der Orientierung der Lipidachsen aus der Oberflächennormalen an und umfasst alle Anteile, die auf der Zeitska-

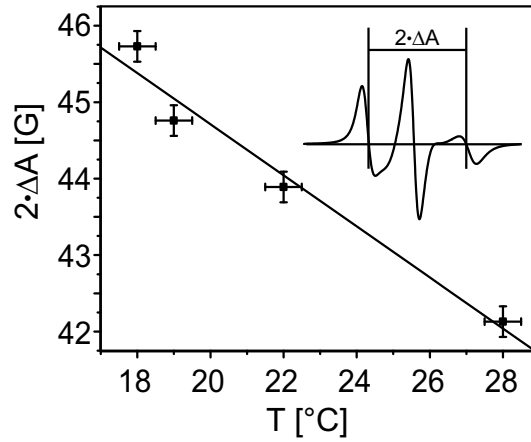


Abbildung 4.4: Temperaturabhängigkeit der Hyperfeinaufspaltung ΔA der ESR-Spektren der DOPC/DOGS-NTA/7-doxyl PSPC (88/10/2%) Lipiddoppelschicht auf Quarz.

la der ESR-Spektroskopie statisch sind. Somit beinhaltet dieser Parameter ein Maß für die (ESR-spektroskopisch) statische Ordnung der Lipide auf der Oberfläche.

Die Linienbreiten lassen sich nur mit moderater Genauigkeit angeben (ca. ± 1 G), weil A und B stark korreliert sind. Die genauen Fehler sind somit nur schwer anzugeben. Da diese Parameter jedoch nicht physikalisch interpretiert werden, wird auf Fehlerangaben verzichtet. Der Ordnungsparameter S und der Kippwinkel β_D wurden anhand eines Fits über das Vesikelspektrum sowie der winkelabhängigen Spektren bestimmt, und die Standardabweichung

Position	β_D [°]	γ [°]	S	σ
7-doxyl	0	49 \pm 10%	0.55 \pm 10%	20 \pm 15%
14-doxyl	0	83 \pm 10%	0.07 \pm 10%	0

Tabelle 4.2: Die Fitparameter im Modell des effektiven Hamiltonoperators.

Position	A(-1)[G]	A(0)[G]	A(1)[G]	B(-1)[G]	B(0)[G]	B(1)[G]
7-doxyl	2	2.5	4	5	2	5
14-doxyl	3	2.3	6	0	0	0

Tabelle 4.3: Die Linienformparameter der Redfield Behandlung. A sind die winkelunabhängigen, B die winkelabhängigen Anteile.

der Orientierung der Lipidmoleküle (σ) wurde aus den Oberflächenspektren extrahiert. Die Parameter der Linienbreite wurden für das Vesikelspektrum und die Oberflächenspektren getrennt festgelegt. Obwohl ein Fit mit einem von 0° verschiedenen Kippwinkel β_D möglich ist, verbessert dies die Fits nicht wesentlich, so dass die Verwendung dieses Parameters nicht begründbar ist. Dies steht im Widerspruch zu der Arbeit von Gaffney et al., in der ein Winkel von $\beta_D = 30^\circ$ für Spektren orientierter 5-doxyL PSPC Lipide gefunden wurde [34]. Obwohl S und σ schwach korreliert sind, können sie für jeden Parametersatz getrennt werden, da jeweils mehrere winkelabhängige Spektren verfügbar sind. Dabei vergrößert ein steigender Ordnungsparameter S die Veränderung der Hyperfeinaufspaltung bei Variation von θ . Damit wird bei 0° eine größere Hyperfeinaufspaltung mit steigendem S gemessen, während ein Erhöhen von σ die Verteilung der Hyperfeinaufspaltungen verbreitert und so die dort gemessene Hyperfeinaufspaltung senkt.

Der Vergleich der experimentellen mit den simulierten Spektren zeigt, dass die Fits auf der Basis dieses Bewegungsmodells die generellen Eigenschaften der Linienform wiedergeben. Bei der Simulation der Spektren des 7-Positionsisomers sind die Fits an die Spektren bei $\theta = 0^\circ, 90^\circ$ besser als die bei $\theta = 35^\circ, 65^\circ$. Da erstere die reineren Komponenten (senkrecht, parallel) reflektieren und damit eindeutiger bestimmt sind als die Überlagerung der Komponenten in dem Zwischenbereich, wurde der Fit mit dem Schwerpunkt auf diese beiden Winkel optimiert. Der Fit an die weniger komplizierten Linienformen der Spektren des 14-doxyL PSPC liefert bessere Resultate, jedoch ergeben sich auch hier Schwierigkeiten in der gleichzeitigen Beschreibung der Tieffeld- und der Hochfeldaufspaltung.

Für die Simulation der Spektren des 7-doxyL Positionsisomers im geordneten Film ist die Berücksichtigung einer Verteilung der Lipidachsen um die Richtung der Oberflächennormale mit einer Standardabweichung notwendig, während dies für die Simulation der Spektren des 14-doxyLs nicht der Fall ist. Eine Variation der experimentellen Bedingungen (pH, Ionenstärke) bei Adsorption der Vesikel auf der Quarzoberfläche führt zu unterschiedlichen winkelabhängigen ESR-Spektren des 7-doxyL PSPC, die durch identische Parameter (S, β_D) bei variiertem σ simuliert werden können. Zur Bestimmung des minimal möglichen σ wurde eine reine DOPC Lipiddoppelschicht hergestellt. Phosphatidylcholindoppelschichten wurden bereits anhand einer Vielzahl von Methoden charakterisiert (s. z.B. [114]) und können als Referenzsystem für einen optimal geordneten Film gelten. Es zeigt sich, dass die Ionenstärke bei Spreizung der Lipidvesikel sehr hoch eingestellt werden (> 400 mM bei pH 7.5) muss – wenn im neutralen pH-Bereich gearbeitet werden soll – damit die ESR-Spektren des chelatisierenden Films denen des reinen DOPC Films gleichen. Letztere sind dagegen schon bei Ionenstärken im Bereich von 100 mM

bestmöglich geordnet. Die oben dargestellten Spektren wurden daher von Filmen aufgenommen, die bei hohen Ionenstärken ($I=500$ mM) präpariert wurden. Hierfür ergibt sich ein minimaler Wert für σ von 20° .

Diese Analyse macht deutlich, dass die Simulationen auf der Basis dieses Modells die grundlegenden Eigenschaften von ESR-Spektren der Lipiddoppelschichten auf der Quarzoberfläche wiedergeben. Die Abweichungen der Fits von den Spektren des 7-doxyl PSPC bei 35° und 65° weisen auf die Vereinfachungen hin, die durch die implizite Behandlung der Dynamik entstehen. Dadurch wird die Linienform, die mit dem Experiment verglichen werden kann, erst durch eine nachfolgende Faltung mit einer Lorentzlinie erhalten, deren Parameter a posteriori angepasst werden. Des weiteren ist die Annahme einer statischen Unordnung durch die Notwendigkeit bedingt, die recht breiten Strukturen im Tief- bzw. Hochfeldbereich der Spektren (insbesondere von 7-doxyl PSPC) zu beschreiben. Es ist an dieser Stelle nicht eindeutig abschätzbar, inwiefern diese Ergebnisse dem vereinfachten Bewegungsmodell geschuldet sind. Daher soll im folgenden Abschnitt geprüft werden, ob eine Beschreibung der Dynamik im Liouville-Formalismus diese Uneindeutigkeiten aufheben kann.

4.1.2 Das Modell der langsamen Bewegung

Die Simulationen auf der Basis einer gleichzeitigen quantenmechanischen Behandlung der dynamischen und magnetischen Eigenschaften des Systems wurden unter Verwendung einer leicht modifizierten Version des NLSL Programms durchgeführt, das in der Gruppe von Freed entwickelt und z.B. in [14] beschrieben wurde. Wie in Kapitel 2.1.2.3 eingeführt, beruht das Simulationsprogramm auf der numerischen Lösung der stochastischen Liouville-Gleichung. Hierfür wird die Bewegung des Nitroxids als Rotationsdiffusion in einem axialsymmetrischen Potenzial modelliert.

Die Expansionskoeffizienten c_{ij} zur Entwicklung des Potenzials stellen einen Satz dynamischer Fitparameter dar. Auch hier wird die resultierende Einschränkung der Amplitude in den Ordnungsparametern S_{ij} parametrisiert. Die Berechnung des Ordnungsparameters S des ersten Koeffizienten c_{20} ist exemplarisch in Kapitel 2.1.2.3 angegeben. Der axialsymmetrische Diffusionstensor kann aus praktischen Gründen durch eine isotrope Rotationskonstante R_{par} und den Asymmetrieparameter $N = R_{par}/R_{perp}$ dargestellt werden, der sich aus dem Verhältnis der parallelen zur senkrechten Komponente des Tensors berechnet. Es wird wiederum von einer mittleren Orientierung der Lipidachse in der Richtung der Oberflächennormalen ausgegangen und die Möglichkeit einer Verteilung der Lipidachsen um die Oberflächennormale in Form einer Gaußverteilung des Direktors des Potenzials mit der Standard-

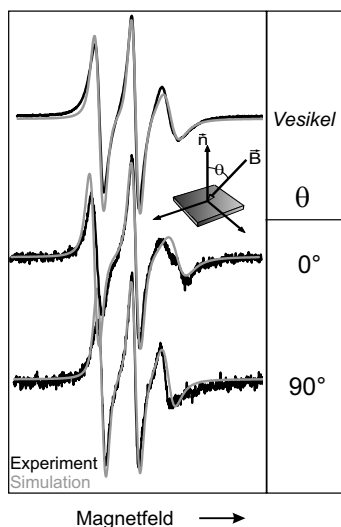


Abbildung 4.5: Fit im Rahmen des Modells nach Freed et al. (hell) an die Spektren des 14-doxyl PSpC (schwarz). Die Scanbreite ist 100 G.

abweichung σ in das Programm implementiert.

Wie der Vergleich von Abbildung 4.5 mit Abbildung 4.3 verdeutlicht, verbessert sich die Übereinstimmung zwischen den Fits und den experimentellen Spektren des 14-doxyl PSpC, wenn von dem Modell des effektiven Hamiltonoperators zu einer Beschreibung der Dynamik durch numerisches Lösen der Liouville-Gleichung übergegangen wird. Zudem wird die Linienbreite nicht – wie im vorherigen Modell – im Nachhinein empirisch angepasst, sondern ergibt sich direkt aus der Dynamik. Lediglich eine inhomogene Linienverbreiterung wird zusätzlich in Form einer Gaußlinie mit einer Breite von 1 G berücksichtigt. Dies erhöht die Aussagekraft der angepassten dynamischen Parameter bezüglich der Struktur und Dynamik des Lipidfilms. Gleichzeitig treten jedoch Schwierigkeiten bei der eindeutigen Bestimmung der Fitparameter auf, da nun nicht nur die Amplitude sondern auch die Frequenz der Bewegung in die Simulation eingehen, deren Einflüsse auf die Linienform häufig nicht getrennt werden können [83]. So erlauben verschiedene Wertepaare der Anisotropie der Bewegung (N) und des Ordnungsparameters S eine Anpassung vergleichbarer Güte an die Spektren der Lipiddoppelschichten.

Bei Simulation der Spektren des kopfgruppennäheren Isomers 7-doxyl PSpC wird dies besonders deutlich. In Abbildung 4.6 sind Fits unter Verwendung zweier Parametersätze dargestellt, wobei jeder Fit gewisse Charakteristika der Reihe winkelabhängiger Spektren gut beschreibt, während beide einen guten Fit an das Vesikelspektrum ergeben. Abbildung 4.6a) zeigt

den besten Fit an die experimentellen Spektren, der in dieser Arbeit gefunden wurde. Dieser beschreibt die Spektren für $\theta = 0^\circ$, 35° und 90° sehr gut, während die Linienform des Spektrums für $\theta = 65^\circ$ weiterhin nur mäßig gut wiedergegeben wird. Der verwendete Parametersatz ist in Tabelle 4.4 dargestellt und beinhaltet die Berücksichtigung zweier Koeffizienten des Rückstellpotenzials, c_{20} und c_{22} , wobei letzterer einen leicht negativen Wert annimmt. In vielen Untersuchungen wird die Expansion des Potenzials auf den ersten Koeffizienten c_{20} beschränkt. So ist dieser auch zur Beschreibung der ESR-Spektren des 14-doxyl PSPC enthaltenden Films ausreichend. Die Einführung von c_{22} bedeutet eine Stauchung des von c_{20} aufgespannten zylindersymmetrischen Potenzials in der xy-Ebene unter Erniedrigung der $D_{\infty h}$ Symmetrie auf D_{2h} (vgl. [36]). Dies wird insbesondere zur Beschreibung des Doppelpeaks im Tieffeldbereich des 7-doxyl PSPC Vesikelspektrums benötigt. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits von Ge et al. für das 5-doxyl PSPC gefunden [35]. Weiterhin werden die Fits im Rahmen dieses Modells durch die Berücksichtigung einer Verkippung der Direktorachse des Potenzials zur magnetischen z-Achse ($\beta_D = 30^\circ$) verbessert, indem dies die Wiedergabe der asymmetrischen Hyperfeinaufspaltungen erlaubt.

In dem alternativen Fit, der in Abbildung 4.6b) dargestellt ist, kann erstmals das Spektrum für $\theta = 65^\circ$ befriedigend simuliert werden. Demgegenüber ergeben sich Defizite in der Beschreibung des Hochfeldbereichs des Spektrums für $\theta = 90^\circ$ und das Spektrum unter Ausrichtung des Magnetfeldes in der Oberflächennormale ($\theta = 0^\circ$) wird unbefriedigend wiedergegeben. Die Verwendung eines kleineren Koeffizient c_{20} des Potenzials reflektiert eine geringere Ordnung als Fit a). Demgegenüber ist die Anisotropie der Bewegung um eine Größenordnung gegenüber Fit a) erhöht. Dies bedeutet, dass die Rate der senkrechten Komponente bei $4.9 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ liegt und damit in den starren Grenzfall fällt. Demgegenüber nähert sich die parallele Komponente mit einer Frequenz von $9.2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ dem Fall der schnellen Bewegung an. Der Kippwinkel β_D ist mit 15° kleiner als der in Fit a) verwendete.

Die Einbindung einer Gaußschen Verteilung der Orientierung des Direktors analog der oben beschriebenen verbessert beide Fits an die Spektren des

Position	$\beta_D [^\circ]$	R [$\cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$]	N	S ₂₀	S ₂₂	σ
7-doxyl ^a	30	5	10	0.37	-0.18	20 \pm 15%
7-doxyl ^b	15	14	200	0.1	-	15
14-doxyl	0	16	4	0.11	-	0

Tabelle 4.4: Fitparameter der Simulation der Lipidspektren in dem Modell von Freed et al.

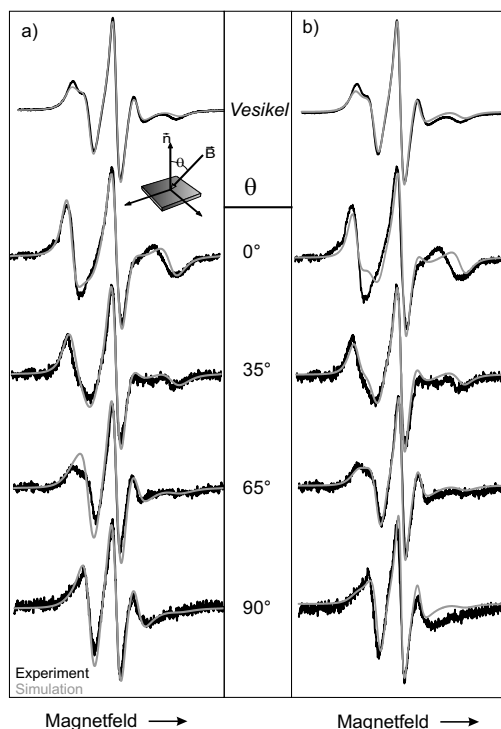


Abbildung 4.6: Fit im Rahmen des Modells nach Freed et al. (hell) an die Spektren des 7-doxyl PSC (schwarz) unter Verwendung verschiedener Parametersätze (a, b)) Die Scanbreite ist 100 G.

7-doxyl PSC und es wird eine Standardabweichung von ca. 20° gefunden. Die Linienformen im Rahmen von Fit a) werden dadurch insbesondere bei 0° und 90° den experimentellen besser angenähert. Die Simulation der Linienformen des 14-Isomers benötigt die Einführung dieses Parameters nicht.

Die erniedrigte Mobilität der Lipidkette in Position 7 gegenüber Position 14 spiegelt sich in Fit a) sowohl in einer erniedrigten Frequenz der Bewegung als auch in einer Erhöhung des Ordnungsparameters wider.

4.1.3 Diskussion der Linienformanalyse

Schon das vom mathematischen Apparat her sehr einfache Modell des effektiven Hamiltonoperators erlaubt die Simulation der grundlegenden Charakteristika der ESR-Spektren der spinmarkierten Lipiddoppelschichten auf der Basis des zugrunde gelegten dynamischen Modells. Die hieraus extrahierten physikalischen Eigenschaften des Lipidsystems stimmen qualitativ mit denjenigen überein, die aus der Simulation der Spektren mit Hilfe des Modells

nach Freed et al. gewonnen werden. So wird in beiden Fällen eine Vorzugsrichtung der Lipide in Richtung der Oberflächennormale gefunden, um welche die Lipide des Ensembles mit einer Standardabweichung von ca. 20° variieren. Da diese Unordnung ebenso Ergebnis der Simulation im Modell der langsamen Bewegung wie im Modell des schnellen Grenzfalls ist, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Parameter nicht nur einer unzureichenden theoretischen Beschreibung der Bewegung geschuldet ist, sondern eine physikalische Eigenschaft der Oberfläche beschreibt. Diese ESR-spektroskopisch statischen Beiträge beschreiben im Modell alle Kippbewegungen der Lipide mit Korrelationszeiten größer als 50 ns.

Es wird jedoch deutlich, dass insbesondere die Beschreibung der Spektren des 7-doxyl Positionsisomers mit Hilfe des Modells der schnellen Bewegung deutliche Defizite aufweist, die im Rahmen einer quantenmechanischen Beschreibung der Bewegung verringert werden können. Dies zeigt, dass hier die Näherung der schnellen Bewegung eine zu weitgehende Annahme darstellt.

Die gute Beschreibung der Spektren des 7-doxyl PSPC in Fit a) basiert auf der Einführung eines zweiten Expansionskoeffizienten des Potentials. Die Symmetrierniedrigung gibt einen Hinweis auf die komplizierte Natur der Umgebung des Markers, die in einem Modell der Bewegung in einem einfachen Konus, wie von Griffith verwendet, nicht beschrieben werden kann. Weiterhin wird für die Simulation der Spektren des 7-doxyl PSPC im Rahmen des Modells nach Freed die Einführung eines Kippwinkels β_D benötigt. In einer statischen *all-trans* Konformation der Fettsäurekette liegen die z-Achsen des magnetischen Koordinatensystems und des Lipidmoleküls parallel zueinander [136]. Daher wurde die Notwendigkeit des Kippwinkels β_D mit einer abweichenden Konformation des Fettsäurerestes begründet [36], die durch die Wechselwirkung der Kopfgruppen hervorgerufen werde. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass dies zur Beschreibung der Spektren des 16-doxyl PSPC nicht nötig ist [36], wie es hier auch für 14-doxyl bestätigt wird.

Die Ergebnisse der Simulationen können in einem molekularen Modell der Lipidschicht verstanden werden, in dem die Lipide im Mittel in Richtung der Normalen ausgerichtet sind. Die adsorbierten Lipide drehen sich schnell um ihre lange Molekülachse. Im hydrophoben Teil der Lipidschicht wird die *cis/trans*-Isomerisierungsbewegung kaum behindert, so dass auch die Akkumulation dieser Rotationen zu einer schnellen Bewegung auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie führt und die Kettenenden sich im ESR-spektroskopischen Mittel in einer *all-trans* Konformation befinden. Rotationen um kopfgruppennahe Einfachbindungen werden dagegen durch die umgebende Lipidschicht stärker eingeschränkt. Dies ergibt sich einerseits aus einer rigideren Struktur der Umgebung, die durch die Wechselwirkung der Kopfgruppen hervorgerufen wird. Andererseits sind die entstehenden di-

sorientierten Kettensegmente länger und stören daher die umgebende Lipidschicht stärker. Die Rücktransformation in die trans-Konformation kann daher nicht in ähnlich leichter und damit schneller Weise erfolgen wie am Kettenende. Somit führt ein Kettensegment in cis-Konformation zu einer ESR-spektroskopisch statischen Fehlorientierung der entsprechenden Lipidkette außerhalb der Oberflächennormalen. Damit wird die Packungsdichte der Lipide erniedrigt und die mögliche Amplitude der Kippbewegungen der umgebenden Lipide erhöht. Der eingeführte Parameter der Standardabweichung der Ausrichtung von der Oberflächennormalen ist dann ein Maß für die Anzahl derartiger Fehlstellen und hieraus resultierender Kippbewegungen. Auch wenn diese Fehlstellen transientser Natur sind, wird durch den Parameter die mittlere Unordnung der Lipiddoppelschicht charakterisiert.

Obwohl Fit a) auf der Basis der Beschreibung größerer Bereiche von θ als bester Fit identifiziert werden kann, trägt Fit b) als lokales Minimum der Fitprozedur zum Verständnis der Anwendbarkeit des in NLSL verwendeten Bewegungsmodells auf die Simulation von ESR-Spektren der Lipiddoppelschichten bei. Zum einen wird die Bedeutung der Aufnahme einer Reihe winkelabhängiger Spektren zur Analyse der Struktur und Dynamik von Lipidschichten deutlich, da die Qualität der Fits unter ausschließlicher Verwendung von Vesikelspektren identisch erscheinen würden, während die zugrunde liegenden Bewegungsformen stark verschieden sind. Im Speziellen genügt eine Analyse der Spektren bei 0° und 90° , wie sie in bisherigen Simulationen mittels des NLSL Programms vorgenommen wurde (z.B. [35]), nicht, um die in dieser Arbeit aufgezeigten Schwierigkeiten bei der Beschreibung der winkelabhängigen Spektren zu berücksichtigen. Zum anderen zeigt der Vergleich mit Fit b), dass hier die Spektren der in dieser Arbeit zusätzlich betrachteten Winkel 35° und 65° durch Annahme einer Bewegungsform, die sich dem Bewegungsmodell der schnellen Bewegung und statischer Unordnung (Abschnitt 4.1.1) annähert, exakt reproduziert werden können. Damit wird deutlich, dass auch das Modell nach Freed et al. keine vollständige Beschreibung der überlagerten Bewegungen von Lipid und Nitroxid an kopfgruppennahen Positionen erlaubt. Da die geringere Mobilität der Lipidkette an diesen Stellen jedoch dazu führt, dass die Spektren mehr Information über die Dynamik des Lipids enthalten als die des 14-doxyl PSPC, ist es von großem Interesse, die gesamte strukturelle und dynamische Information dieser Spektren extrahieren zu können.

Hierfür bedarf es einer umfassenderen Beschreibung der Bewegung des spinmarkierten Lipids. In einem Modell von Lange et al., das zur Simulation von Lipidmultilagen verwendet wurde, wurden die globale Rotation des Lipidmoleküls und die trans-gauche Isomerisierung der Alkylkette getrennt in einem Liouville-Formalismus behandelt [64]. Während erstere ähnlich des

Modells nach Freed et al. durch eine kontinuierliche Bewegung in einem axialsymmetrischen Potenzial beschrieben wurde, wurde letztere durch einen Sprungprozess angenähert. Hierbei zeigte sich, dass langsame Bewegungen insbesondere für die globale Dynamik der Lipidketten von großer Bedeutung sind und somit die Redfield Theorie hier nicht anwendbar ist. Weiterhin wurde die molekulare Unordnung in Form der Anzahl der gauche-Defekte und die Unordnung der Probe über die Orientierung der Lipidachsen parametrisiert. Für letzteres wurde jedoch nicht wie in dieser Arbeit eine Gaußsche Verteilung, sondern eine Verteilungsfunktion benutzt, die in der Theorie von Flüssigkristallen Anwendung findet. Hier wurde für DMPC in der flüssigen Phase eine kontinuierliche Verteilung der Direktororientierung zwischen 0° und 25° zur Normalen gefunden. Dies ist konsistent mit der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Interpretation der verwendeten Standardabweichung mit einer Unordnung der quarzgestützten Lipiddoppelschichten.

Die Problematik einer adäquaten Beschreibung der Bewegung des Spinmarkers in derartigen Systemen wird dann aufgelöst, wenn die Trajektorie der N-O Bindung im Raum bekannt ist. Hieraus kann das ESR-Spektrum direkt berechnet werden. Zur Simulation eines ESR-Spektrums muss jedoch die Länge der Trajektorie in der Größenordnung der transversalen Relaxationszeit T_2 , d.h. im Bereich von einigen 100 ns, liegen. Um eine ergodische Trajektorie zu erhalten, wird zudem eine Vielzahl dieser Trajektorien benötigt [123]. Aufgrund der hohen Rechenzeiten ist dies bisher nicht gelungen.

4.1.4 Eigenschaften der neutralen Lipiddoppelschicht

Auf der Basis der detaillierten Analyse der verwendeten Simulationsmodelle können die erhaltenen Parameter zur Charakterisierung der hergestellten Lipiddoppelschichten verwendet werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die Ordnung der Lipiddoppelschichten. Dabei muss zunächst festgestellt werden, ob die Vesikel sich auf der Oberfläche zu einem planaren Film aufspreizen. Zudem ist für die Anzahl der oben diskutierten gauche-Defekte von Interesse.

Indem die Standardabweichung σ der Ausrichtung der Lipidmoleküle sinkt, wenn die Ionenstärke auf mind. 400 mM erhöht wird, zeigt sich, dass die Ordnung des Films mit der Ionenstärke steigt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Phasendiagrammen für die Spreizung von Vesikeln auf Quarzoberflächen, die durch Messung der Dynamik mittels Fluoreszenzregenerierung nach Photobleichen (FRAP) aufgestellt wurden [23]. Die Autoren schlagen dort vor, dass bei hohen pH-Werten und niedrigen Ionenstärken keine Vesikelspreizung negativ geladener Lipide stattfindet, da hier die Quarzoberfläche stark negativ geladen ist und so Vesikel-Oberflächen- und Vesikel-Vesikel-

Wechselwirkungen repulsiv sind.

Der Fall des DOGS NTA Lipids ist komplizierter, da DOGS NTA (dreifach) negativ geladen ist, aber zum teilweisen Ladungsausgleich ein zweiwertiges Nickelion chelatisiert. Die Abhängigkeit der Ordnung von der Ionenstärke verdeutlicht, dass DOGS-NTA sich als negativ geladenes Lipid verhält und die Abstoßung untereinander und mit der Quarzoberfläche erst durch hohe Ionenstärken abgeschirmt werden kann. Die Anteile der Unordnung, die durch ungespreizte Vesikel sowie durch oben diskutierte Fehlstellen hervorgerufen werden, können zwar nicht getrennt werden. Es kann aber sichergestellt werden, dass unter den gewählten Bedingungen hier, ebenso wie bei reinen DOPC-Schichten, wohlgeordnete, planare Lipidschichten vorliegen.

Der beschriebene Verlauf der Mobilität in der Kette bei Markierung der Positionen 7 und 14 kann zur Untersuchung des Phasenverhaltens der Lipiddoppelschicht benutzt werden. Der Gel-Flüssigkeit-Phasenübergang von DOPC liegt bei 11°C [40]. Daher sollte sich die DOPC Doppelschicht bei Labortemperatur, bei der die Proteinstrukturuntersuchungen durchgeführt werden, in der flüssigen Phase befinden. Das Phasenverhalten der Lipiddoppelschicht kann sich jedoch durch das Beimischen von 10% DOGS NTA Ni und die Immobilisierung auf der Quarzoberfläche verändern. An die flüssige Phase schließt sich zu tieferen Temperaturen hin eine Gelphase an. Hier sind die Lipide bereits soweit erstarrt, dass ESR-spektroskopisch kein Unterschied in der Dynamik der verschiedenen Positionen der Fettsäurekette feststellbar ist, während in der flüssigen Phase die Mobilität der Fettsäurekette von der Kopfgruppe zum hydrophoben Ende steigt [126]. Dies kommt dadurch zustande, dass in der Gelphase auch in den hydrophoben Teilen der Lipide die trans/gauche-Isomerisierungsrotationen nicht mehr angeregt werden können. Somit stellt die höhere Mobilität des Markers an der Stelle 14 gegenüber der kopfgruppennäheren Stelle 7 einen Indikator für eine flüssige Phase dar. Wie obige qualitative Betrachtung darlegt, kann die Beweglichkeit der Position der Lipidkette, an der sich der Spinmarker befindet, anhand der Hyperfeinaufspaltung verfolgt werden. Dabei wird ein Phasenübergang von flüssiger zu Gelphase in der Temperaturabhängigkeit der Hyperfeinaufspaltung in Form einer Unstetigkeit sichtbar [126]. Da in dieser Arbeit ein stetiger Verlauf der Hyperfeinaufspaltungen bei 0° mit der Temperatur beobachtet wird, kann zudem ein Phasenübergang im betrachteten Bereich um Raumtemperatur ausgeschlossen werden.

4.2 Die negativ geladenen Lipiddoppelschichten

Durch Beimischen von Phosphatidylserin (PS) zu einer neutralen Lipiddoppelschicht wird dem System eine zusätzliche negative Ladung in Form einer Carboxylgruppe zugeführt. Dies ist für zweierlei Experimente von Interesse. Einerseits erfolgt die alternative Immobilisierung von nativem T4L mit Hilfe des Fusionsprotein über die Bindung von Annexin 12 an Phosphatidylserin enthaltende Membrane. Hierfür wurde in Anwesenheit von 1 mM Calciumionen eine DOPC/DOPS (4:1) Lipiddoppelschicht hergestellt. Anhand des Vergleichs der ESR-Spektren des 7-doxyl PSPC Films mit denen der neutralen Lipidschicht wird geprüft, ob der so erhaltene Film ebenso wie diese eine wohlgeordnete Lipiddoppelschicht darstellt.

Die negativ geladene chelatisierende Lipiddoppelschicht der Zusammensetzung DOPC/DOPS/DOGS NTA Ni (6.5:2.5:1) wird zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenen Modellprotein und einer negativ geladenen Lipidoberfläche verwendet. Diese Lipidschicht ergibt sich aus der in Abschnitt 4.1 detailliert charakterisierten Lipidschicht durch Ersetzen eines Teils des DOPC durch DOPS.

In Abbildung 4.7 sind exemplarisch die ESR-Spektren des 7-doxyl PSPC enthaltenden DOPC/DOPS (4:1) Films dargestellt. Der Vergleich mit Abbildung 4.2 zeigt, dass die charakteristischen Eigenschaften der Linienform sich nicht von denen des neutralen Lipidfilms unterscheiden. Selbiges gilt für die Spektren beider Positionsisomere des DOPC/DOPS/DOGS-NTA Ni Films. Dies beweist, dass die in Abschnitt 4.1 erarbeiteten strukturellen und dynamischen Eigenschaften auch für die in dieser Arbeit präparierten PS-enthaltenden Filme gelten. Es liegen also auch hier geordnete, planare Lipiddoppelschichten vor, die sich in einer fluiden Phase befinden.

Neben der qualitativen Übereinstimmung der Spektren hinsichtlich ihrer Winkelabhängigkeit und dem Einfluss der Position des Spinmarkers finden sich aber auch Unterschiede in den Linienformen der winkelabhängigen Spektren der neutralen und der negativ geladenen Lipiddoppelschichten. Diese werden beispielsweise in der höheren Linienbreite des Tieffeldpeaks im Spektrum der negativ geladenen Lipiddoppelschicht bei 0° deutlich. Der Vergleich der Hyperfeinaufspaltungen ermöglicht eine Quantifizierung der feinen Unterschiede: In Abschnitt 4.1 wurde gezeigt, dass ein sinkender Unordnungsparameter σ mit einer steigenden Hyperfeinaufspaltung bei $\theta = 0^\circ$ verbunden ist. In dem dort erarbeiteten molekularen Modell kann dies mit der sinkenden Anzahl von gauche-Defekten und dichterem Packen der Lipide interpretiert werden. Daher kann die Hyperfeinaufspaltung $\theta = 0^\circ$ als Parameter für die

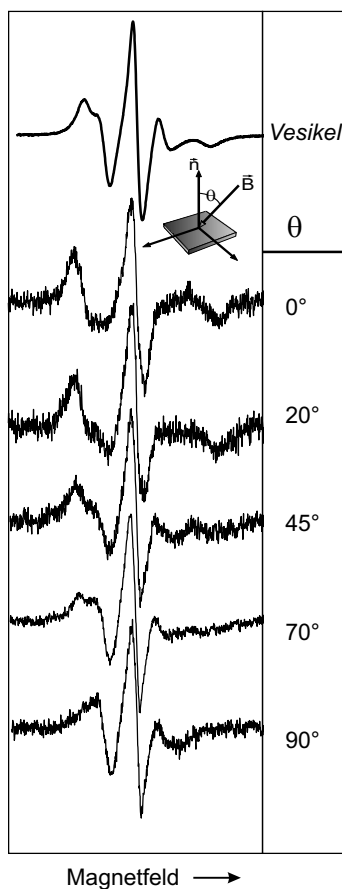


Abbildung 4.7: ESR-Spektren der DOPC/DOPS/7-doxyl PSPC (78/20/2%) Lipide als unilamellare Vesikel bzw. als Lipiddoppelschichten auf Quarz. Letztere wurden unter den angegebenen Polarwinkeln θ aufgenommen. Die Scanbreite ist 100 G.

Ordnung der Lipidschicht verwendet werden.

In Abbildung 4.8 sind die entsprechenden Werte der doppelten Hyperfeinaufspaltung bei $\theta = 0^\circ$ (d.h. $2 \cdot A_{parallel}$, vgl. Abbildung 4.4) beider Positionisomere der negativ geladenen Filme im Vergleich zu denjenigen des neutralen Films aufgetragen. Hieraus ist ersichtlich, dass die Hyperfeinaufspaltungen der Spektren der negativ geladenen Lipiddoppelschichten größer sind als die Aufspaltungen, die in den Spektren des neutralen Films beobachtet werden. Damit weist die ESR-spektroskopische Analyse der negativ geladenen Filme auf eine gegenüber den neutralen Filmen erhöhte Packungsdichte der Lipide hin. Dichtes Packen der Lipide erhöht die Anforderungen, die an die Lipidkonformation gestellt werden. Die entstehenden entropischen Verluste

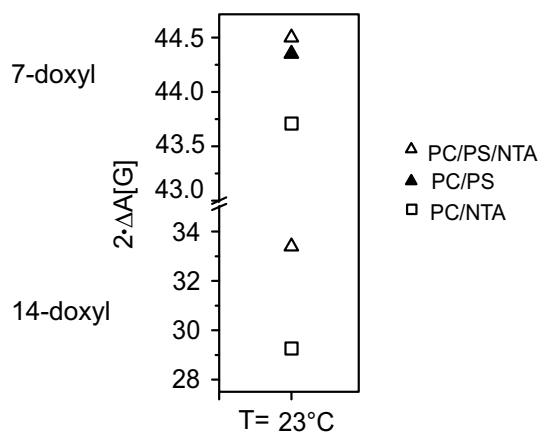


Abbildung 4.8: Hyperfeinaufspaltung ΔA der ESR-Spektren der DOPS enthaltenden Lipiddoppelschichten auf Quarz bei $\theta=0^\circ$ unter Markierung durch 14-doxyl- (unten) bzw. 7-doxyl-PSPC (oben) im Vergleich zu den Werten der neutralen Lipiddoppelschicht.

müssen durch attraktive Wechselwirkungen aufgebracht werden. Dies lässt sich nur über eine zusätzliche Interaktion der PS-Kopfgruppen erklären.

Die ausgeprägte Tendenz von Phosphatidylserin zu intermolekularen Wechselwirkungen wird in der Literatur bereits seit längerer Zeit diskutiert. Obgleich bereits 1980 mittels ^2H und ^{31}P NMR eine rigidere Struktur der Kopfgruppe des isolierten PS im Vergleich zu denjenigen von PC und Phosphatidylethanolamin (PE) gefunden wurde [13], ist der Einfluss der negativen Ladung der PS-Kopfgruppen auf die Struktur und Dynamik der Lipidschichten bisher nur in Ansätzen untersucht. Über NMR-Messungen an multilamellaren PS Vesikeln, die einen Anteil deuteriummarkierter Lipide enthielten, ermittelten Petrache et al. einen erhöhten Ordnungsparameter der DOPS Doppelschichten gegenüber den DOPC Schichten. Messungen in D_2O ergaben eine höhere Ordnung der Wasserstruktur in der Umgebung der Kopfgruppen. Dies geht einher mit einer niedrigeren Kopfgruppenfläche des PS im Vergleich zum PC, wie die Untersuchung der Röntgenstreuung ergab [102]. Dieser kondensierende Effekt wird mit einer verstärkten Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PS-Kopfgruppen erklärt, die Lewis und McElhaney IR-spektroskopisch nachgewiesen haben [70]. Alle zitierten Untersuchungen wurden an reinen PS-Membranen durchgeführt, während in dieser Arbeit PC/PS-Gemische untersucht wurden. Molekulardynamiksimulationen gemischter PC/PS-Membrane (5:1) weisen jedoch ebenfalls auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PC und PS hin, die PC Moleküle untereinander

nicht ausbilden können. Hierbei reagiert PS als $\text{NH}\cdots\text{O}$ Wasserstoffdonator für andere Lipidsauerstoffatome [99].

Im Lichte der Literaturlage lässt sich die ESR-spektroskopisch beobachtete Erhöhung der Ordnung in Anwesenheit von PS mit einem lateral komprimierenden Effekt des PS auf die gesamte PC/PS Lipiddoppelschicht über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen interpretieren. Dies impliziert, dass auch PC Lipide an der lateralen Wechselwirkung beteiligt sind.

Die zwei PS enthaltenden Filme stellen somit fluide geordnete Lipiddoppelschichten dar, die im Vergleich zu den PC Filmen eine erhöhte Kopfgruppenwechselwirkung aufweisen. Auf diese Weise werden durch Anwesenheit des PS nicht nur die chemischen, sondern auch die strukturellen und dynamischen Eigenschaften der Modelloberfläche verändert.

4.3 Darstellung und Charakterisierung eines chelatisierenden Thiofilms

In zukünftigen Untersuchungen soll die Anzahl der verfügbaren Modelloberflächen auf die Klasse der selbstorganisierenden Monolagen (SAM), wie sie durch Adsorption von Thiolen auf Goldoberflächen in geordneter Weise hergestellt werden können, z.B. [132], ausgeweitet werden. Durch die starke Gold-Schwefel-Bindung kann die Funktionalität der Kopfgruppe in einem weiten Bereich variiert werden, ohne dass die Organisation der Filme zusammenbricht.

In einer Reihe von Untersuchungen zur Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Kopfgruppe der SAM wurde Polyethylenglykol als resistent gegenüber Proteinadsorption charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Kopfgruppen, die mindestens drei Ethylenglykoleinheiten beinhalten, keine Proteinadsorption zeigen [43]. Der genaue Mechanismus dieser Resistenz, der mit der molekularen Struktur der PEG Ketten und den zugehörigen Wassermolekülen verbunden ist, ist weiterhin Gegenstand intensiver Untersuchungen [48]. In der Gruppe von Whitesides wurde bereits eine Präparation Ethylenglykol $(\text{EG})_n$ -funktionalisierter SAM durch Festphasensynthese vorgestellt [18]. Hierbei wurde ein Alkylcarboxythiol adsorbiert, auf der Oberfläche zunächst zum Säureanhydrid dehydratisiert und schließlich mit einem $(\text{EG})_3$ -Amin zu einem Amid gekoppelt.

Um in dieser Diskussion einen Beitrag zu leisten, sollen in ersten ESR-spektroskopischen Untersuchungen zur Struktur der adsorbierten Proteine derartige EG-terminierte Thiofilme als Modelloberflächen dienen. Die Immobilisierung des Proteins soll, wie bei den Lipidoberflächen erprobt, spezi-

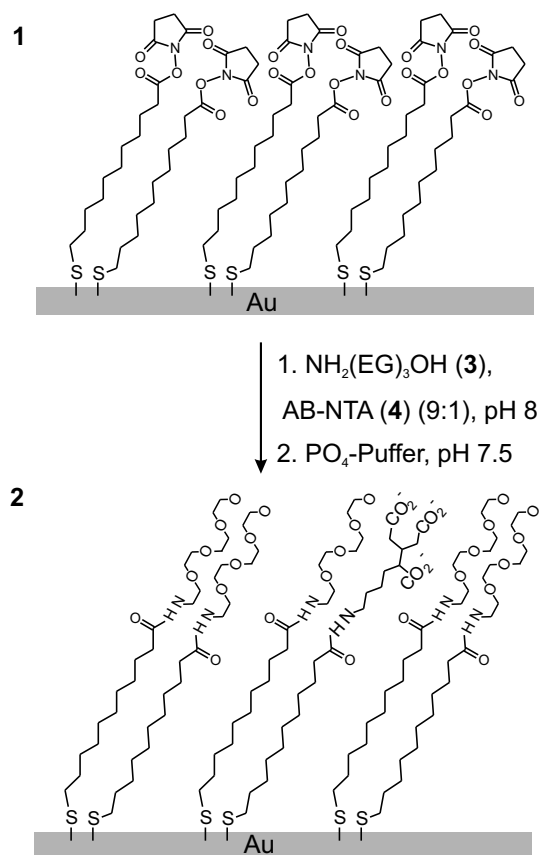


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der Präparation selbstorganisierender Thiolfilme, die $(\text{EG})_3^-$ bzw. NTA-Kopfgruppen tragen. Für Details s. Text.

fisch über die Bildung des stabilen Nickelkomplexes erfolgen, so dass NTA-Kopfgruppen in die Oberfläche eingebracht werden müssen. In Anlehnung an den von Chapman et al. vorgeschlagenen Weg erfolgte die Synthese auf der festen Phase [18]. Da kein organisch-synthetisches Labor zur Verfügung steht, wurde die Auswahl der Edukte auf käufliche Produkte beschränkt.

In Abbildung 4.9 ist der eingeschlagene Syntheseweg skizziert. Zunächst wird der Aktivester Dithiobis(succinimidylundecanoat) auf einer Goldoberfläche adsorbiert. Unter leicht basischen Bedingungen wird an diesen über eine Amidbindung sowohl die EG_3^- als auch die NTA-Funktion gekoppelt. Um ungefähr einen 10%igen molaren Anteil an NTA-Kopfgruppen zu erhalten, werden die Amine in einem molaren Verhältnis von 9:1 zugegeben. Schließlich wird der überschüssige Aktivester durch Hydrolyse deaktiviert. Die experimentellen Details sind in Kapitel 3 dargestellt.

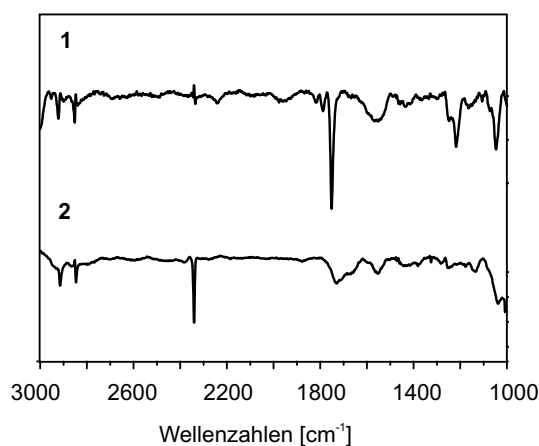


Abbildung 4.10: FT-IR-Spektren des Zwischenprodukts **1** und des Produktfilms **2**.

Die Verifizierung des Präparationsweges und Charakterisierung der Produkte erfolgt anhand der IR-Spektren der präparierten Oberflächen. Dafür wurde bei einer Probe die Präparation auf der Zwischenstufe **1** beendet und das entsprechende IR-Spektrum im Vergleich zu einer vollständig präparierten Probe **2** aufgenommen. Die IR-Spektroskopie erlaubt die Charakterisierung funktioneller Gruppen sowie die Bestimmung der Ordnung und Orientierung von Alkylketten mittels der C-H Streckschwingungen [103]. Auf den verwendeten Goldoberflächen gilt die Einschränkung der Oberflächenauswahlregel, so dass Schwingungsmoden, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Oberfläche sind, keine Absorption zeigen [41].

Abbildung 4.10 zeigt die IR-Spektren der Filme **1** und **2**. Der Peak bei 2340 cm^{-1} in **2** entspringt einer hier nicht komplett subtrahierbaren Verunreinigung des Detektors mit CO_2 und wird nicht weiter diskutiert. Die Bande bei 1220 cm^{-1} wird der asymmetrischen C-N-C Streckschwingung des Succinimidylesters zugeordnet [62]. Indem sie bei Umsetzen des Succinimidylesters mit den Aminen verschwindet, wird die quantitative Umsetzung des Aktivesters angezeigt. Die entstehenden Produkte lassen sich anhand der Banden in der Region der Carbonylstreckschwingungen analysieren. Diese Region ist in Abbildung 4.11 vergrößert dargestellt.

Im Spektrum der Zwischenstufe **1** werden drei Banden bei 1751 cm^{-1} , 1788 cm^{-1} und 1818 cm^{-1} beobachtet. Auf der Basis der Zuordnung von Lahiri et al. wird die Bande bei 1751 cm^{-1} der asymmetrischen, diejenige bei 1788 cm^{-1} der symmetrischen Streckschwingung der Carbonylfunktion des Succinimidylesters und die Bande bei 1818 cm^{-1} der Carbonylstreckschwin-

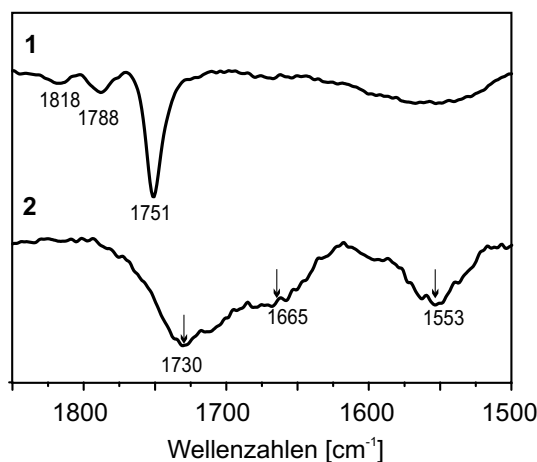


Abbildung 4.11: Detaillierte FT-IR-Spektren der Filme **1** und **2** in der Region von 1500-1900 cm^{-1} .

gung des Esters zugeordnet [62]. Nach Behandlung des aktivierten Films mit den Aminen **3** und **4** verschwinden die Banden des Aktivesters, und es erscheinen Banden bei 1730 cm^{-1} und 1553 cm^{-1} , sowie eine Schulter bei ca. 1655 cm^{-1} . Diese Banden sind ebenfalls mit denjenigen vergleichbar, die von Lahiri et al. beobachtet wurden, so dass hier dieselbe Zuordnung erfolgt. Demnach entspricht die Bande bei 1553 cm^{-1} den zwei N-H Biegeschwingungen und die Schulter bei 1655 cm^{-1} den Carbonylstreckschwingungen der zwei gekoppelten Amide. Die hier beobachteten Banden sind wesentlich breiter als die von Lahiri et al. beobachteten. Dies ist konsistent mit der Kopplung des Aktivesters mit zwei verschiedenen Aminen. Die Bande bei 1730 cm^{-1} wird den Carbonylschwingungen der freien Säure zugeschrieben und zeigt, dass teilweise Hydrolyse der aktivierten Säure stattgefunden hat.

Damit ergibt die Analyse der IR-Spektren, dass der Syntheseweg wie gewünscht über eine Amidkopplung verlaufen ist und der chelatisierende, Triethylenglykol-funktionalisierte Thiofilm **2** präpariert wurde. Dieser enthält jedoch Verunreinigungen an freier Säure.

Die Ordnung des Ausgangsfilms **1** kann anhand der CH_2 -Streckschwingungen in der Region von 2800-2960 cm^{-1} bestimmt werden, der in Abbildung 4.12 dargestellt ist. Bezug nehmend auf die Zuordnung der Banden unfunktionalisierter Alkanthiole [29], wird die Bande bei 2852 cm^{-1} der symmetrischen und diejenige bei 2922 cm^{-1} der asymmetrischen CH_2 -Streckschwingung der C_{12} -Kette zugeschrieben. Die Frequenzen der CH_2 -Streckschwingungen sind charakteristisch für die Konformation der Alkylkette. Kristalline Alkylketten in einer *all-trans* Konformation absorbieren bei 2850 und 2917 cm^{-1} [63].

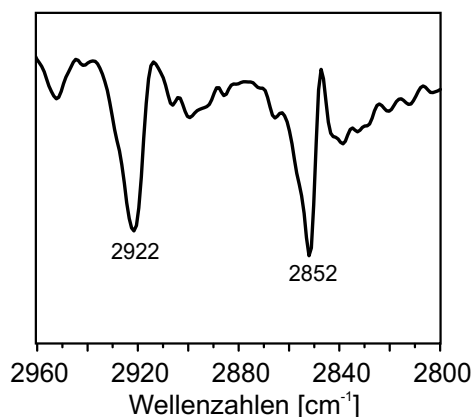


Abbildung 4.12: CH₂-Streckschwingungsregion des FT-IR-Spektrums von **1**.

Eine derart hohe Ordnung wird nur bei Filmen unfunktionalisierter Alkanthiole erreicht. Die Frequenzen steigen beim Übergang über eine ungeordnetere Konformation zur flüssigen Phase auf 2928 cm^{-1} bzw. 2856 cm^{-1} [121]. Die Positionen der Banden von **1** liegen zwischen den beiden Grenzwerten und zeigen somit, dass der funktionalisierte Film weiterhin eine Ordnung aufweist. Diese ist leicht geringer als von Chapman et al. für das dort verwendete Anhydridzwischenprodukt gefunden ($\nu_{as} = 2920\text{ cm}^{-1}$). Eine ähnliche Analyse des Films nach der Amidkupplung ist aufgrund der Überlagerung der verschiedensten Alkylschwingungen nicht in gleicher Weise möglich.

Die Reaktivität des präparierten Films kann ESR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Nach Umsetzen des Films mit Nickel(II)sulfatlösung und vierstündiger Exposition mit spinmarkierter T4L wird ein ESR-Spektrum immobilisierten Proteins aufgenommen. Der experimentelle Aufbau zur Messung von ESR-Spektren muss jedoch noch dahingehend verbessert werden, dass ein Signal-zu-Rausch Verhältnis erreicht wird, das eine detaillierte Analyse der Linienform zur Gewinnung struktureller Information erlaubt.

4.4 Zusammenfassung

Quarzgestützte Lipiddoppelschichten, die zur Proteinbindung ein Chelatorlipid enthalten, dienen den im Folgenden beschriebenen Strukturuntersuchungen adsorbierter Proteine als Modelloberflächen. In einem vorgelagerten Schritt wurden diese mit Hilfe der qualitativen und quantitativen Linienformanalyse der winkelabhängigen ESR-Spektren detailliert charakterisiert.

Die quantitative Linienformanalyse durch Simulation der ESR-Spektren einer neutralen Lipiddoppelschicht erfolgte durch den Vergleich zweier Modelle. Dabei zeigte sich, dass schon das mathematisch einfachere Modell des Grenzfalles schneller Bewegung auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie die Analyse eines Großteil der physikalischen Eigenschaften der Lipiddoppelschichten erlaubt, während Simulationen durch Lösen der quantenmechanischen Bewegungsgleichung zu einer besseren theoretischen Beschreibung der ESR-Spektren führt.

Im Rahmen einer molekularen Interpretation der Parameter des hierbei verwendeten Bewegungsmodells konnte sichergestellt werden, dass die quarzgestützten Lipiddoppelschichten als orientierte Filme vorliegen. Die verbleibenden Fehlstellen konnten parametrisiert und durch geeignete Wahl der Präparationsbedingungen minimiert werden. Eine Analyse der Beweglichkeit der Spinsonde bei Variation ihrer Position in der Fettsäurekette konnte beweisen, dass die Lipiddoppelschichten sich in der flüssigen Phase befinden.

Die Analyse der Modellmembrane, die das negativ geladene Lipid Phosphatidylserin enthalten, ergab ein ähnliches Bild. Hier wurde allerdings eine leicht erhöhte Ordnung der Schichten gefunden, die mit einer Wechselwirkungen der Kopfgruppen interpretiert wurde.

Für zukünftige Experimente wurde ein geordneter selbstorganisierender Triethylenglykolfunktionalisierter Film durch Reaktionen auf der Oberfläche präpariert und IR-spektroskopisch charakterisiert. Dieser Film eröffnet die Möglichkeit der ESR-spektroskopischen Untersuchung der Struktur und Dynamik von Proteinen in Kontakt mit den als biokompatibel geltenden EG-Oberflächen. Der Schwerpunkt weiterer Strukturuntersuchungen adsorbierter Proteine soll auf die Analyse der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und selbstorganisierenden Filmen verschiedener chemischer Eigenschaften gelegt werden. Die Synthese auf der Basis der Amidkopplung ist vielfältig variierbar, so dass sie durch Verwendung chemisch modifizierter Amine als Ausgangspunkt zur Präparation von Oberflächen diverser chemischer Eigenschaften verwendet werden kann.

Kapitel 5

Struktur und Orientierung von T4L auf einer Modellmembran

Während die quantitative Linienformanalyse von ESR-Spektren spinmarkierter Lipide bereits seit längerer Zeit zur Charakterisierung von Lipidsystemen herangezogen wird, wurde sie erst kürzlich auf die Behandlung spinmarkierter Proteine in Lösung erweitert [21], [19], [20], [72]. Dies stellt einen bedeutenden Fortschritt in der Entwicklung der Methodik des Site-directed Spin Labeling dar, weil nun Aussagen über die lokale Struktur und Dynamik des Proteins direkt aus der quantitativen Bestimmung der Dynamik der Seitenkette gewonnen werden können. Hierfür wurde das Bewegungsmodell für die Simulation der ESR-spektroskopisch langsamen Bewegung nach Freed et al. auf die Beschreibung der Dynamik der spinmarkierten Seitenkette R1 (vgl. Kapitel 2.1.2.3) angewandt. Auf diese Weise konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die Bewegung der spinmarkierten Seitenkette einzig durch die Dynamik des entsprechenden Sekundärstrukturelements und die Wechselwirkung mit der lokalen Umgebung bestimmt wird [21], welche zunächst nur mittels einer rein qualitativen Betrachtung der ESR-Linienformen spinmarkierter Proteine entwickelt wurde [92]. Die quantitative Linienformanalyse zeigt weiterhin, dass die Dynamik der spinmarkierten Seitenkette R1, wenn sie sich an einer der Lösung zugewandten Oberfläche einer Helix befindet, als Indikator für die Dynamik der entsprechenden Helices verwendet werden kann, da die interne Dynamik von R1 für verschiedene Helices und Helixpositionen von der Amplitude und Frequenz der Helixbewegung moduliert wird.

Zur Untersuchung der Strukturveränderung adsorbierter Proteine durch Wechselwirkung mit einer Oberfläche wird in einem ersten Schritt vom Grenzfall schwacher Wechselwirkung mit der Oberfläche ausgegangen. Wie in Kapitel 4 erläutert, dient hierbei eine festkörpergestützte, zwitterionische Phosphatidylcholin-Doppelschicht, die zur definierten Anbindung des Proteins

chelatisierende Lipide enthält, als Modellsystem einer biomimetischen, nicht-invasiven Oberfläche. Ziel ist hier, mittels quantitativer Linienformanalyse der ESR-Spektren spinmarkierter Proteine bereits kleine strukturelle Änderungen der adsorbierten Proteine in Form veränderter dynamischer Parameter zu erfassen.

Zudem wurde anhand der Analyse der ESR-Spektren der Lipiddoppelschichten bereits deutlich, dass die ESR-Spektroskopie die Bestimmung der Orientierung eines geordneten Ensembles adsorbierter spinmarkierter Moleküle erlaubt, solange die anisotrope magnetische Wechselwirkung der Spinsonde nicht durch deren Dynamik ausgemittelt wird. Voraussetzung für eine makroskopische Orientierung der Proteine in der Probe ist die Planarität der Modelloberfläche. Wie die Untersuchungen des vorangegangenen Kapitels zeigen, wird dies von den in dieser Arbeit verwendeten quarzgeträgerten Lipiddoppelschichten erfüllt. Die Möglichkeit der ESR-spektroskopischen Analyse der Orientierung adsorbierter Proteine konnte in einer vorhergehenden Untersuchung anhand zweidimensionaler Kristalle von Annexin 12 bereits nachgewiesen werden [110]. So wurde aus den erhaltenen winkelabhängigen ESR-Spektren im Rahmen des Modells der schnellen Bewegung (vgl. Kapitel 2.1.2.2, 4.1.1) die Orientierung einer Helix in Übereinstimmung mit der Kristallstruktur extrahiert.

Im Folgenden wird die ESR-spektroskopische Untersuchung adsorbierter Proteine auf eine Situation ausgeweitet, in der keine kristallinen Aggregate vorliegen. Darüber hinaus wird angestrebt, mit Hilfe des physikalisch exakteren Modells der langsamen Bewegung in einem axialsymmetrischen Potenzial nicht nur ein genaues Bild der Sekundär- und Tertiärstruktur des adsorbierten Modellproteins T4 Lysozym (T4L) zu zeichnen, sondern auch die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche zu extrahieren.

5.1 Die Adsorptionseigenschaften der neutralen Lipiddoppelschicht

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der Lipiddoppelschicht wurde das mit einem Histidinanker versehene Modellprotein T4L an einer beliebigen Stelle spinmarkiert (in Abbildung 5.1 an Stelle 72) und nach Anbieten mit Nickelionen (0.1 M) in einem Elektrolyten hoher NaCl-Konzentration (500 mM) der Oberfläche ausgesetzt. Nach vierstündiger Adsorption und Ersetzen der überstehenden Proteinlösung mit Pufferlösung wird ein ESR-Signal beobachtet, das adsorbiertem Protein zugeordnet werden kann. Dieses ist in Abbildung 5.1 dargestellt (a), ebenso wie nachfolgende Desorptionsexperimente durch Spülen mit EDTA-enthaltender Pufferlösung (b) sowie die Wiederbeladung durch sukzessives Spülen mit Nickelionen-enthaltender Pufferlösung und frischer Proteinlösung (c). Die dargestellten Experimente machen deutlich, dass das ESR-Signal der Oberfläche bei Entfernen des Nickels mit EDTA nahezu verschwindet. Die Wiederbeladung der Oberfläche mit Nickel und Protein ergibt, wie in Abbildung 5.1c ersichtlich, ein Spektrum, dessen Intensität als auch Linienform mit dem Spektrum der ersten Präparation identisch ist. Dies beweist, dass die Anbindung des Proteins an die Oberfläche spezifisch und reversibel über die künstlich eingeführte Wechselwirkung zwi-

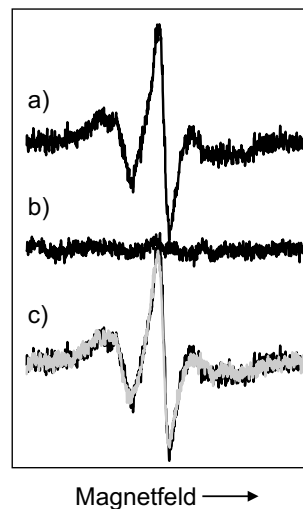


Abbildung 5.1: Reversibilität der Adsorption. Dargestellt ist ein Adsorptions-Desorptions-Readsorptionszyklus durch Anbieten von a) spinmarkiertem T4L (72R1), b) EDTA, c) Ni^{2+} , Protein (erste Präparation ist dunkel unterlegt). Die Scanbreite beträgt 100 G.

schen dem chelatisierenden Lipid und dem Histidinanker des Proteins durch Bildung eines stabilen Nickelkomplexes erfolgt. Dabei zeigt die Reversibilität der Bindung, wie sie nach einem Komplexbildungsmechanismus zu erwarten ist, dass keine anderen Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche einen relevanten Beitrag zur Adsorption des Proteins leisten. Daher kann die Anbindung des Proteins in definierter Weise durch Veränderung der Nickelionenkonzentration kontrolliert werden.

Aus der Analyse der ESR-Intensität kann, wie in Kapitel 3 dargestellt, die adsorbierte Proteinmenge gewonnen werden. Es zeigt sich, dass die ESR-Intensität verschiedener Präparationen mit einer Abweichung von 10% reproduzierbar ist. Auch eine Variation der Lösungskonzentration ergibt, bis zu einer Minimalkonzentration von ca. 0.05 mg/mL, keine unterschiedlichen Bedeckungen. Die fehlende Konzentrationsabhängigkeit der Bedeckung weist auf eine vollständige Besetzung von Adsorptionsplätzen mit einem großen Haftkoeffizienten hin. Der Haftkoeffizient kann in diesem Fall mit der Bildungskonstanten des Nickelkomplexes identifiziert werden. In der Literatur werden hierfür Werte im Bereich von $2.5 \cdot 10^5$ L/mol angegeben [28].

Eine rein spezifische Anbindung über einen stabilen Komplex sollte zu einer Monolage adsorbierten Proteins führen. Unter Annahme einer dichtesten Packung der Ellipsoide kann eine theoretische Spindichte pro Monolage berechnet werden. Motiviert durch die Lage des N-terminalen Histidinankers wird von einer *side-on* Adsorption des Proteins ausgegangen, in der die lange Achse eines Ellipsoiden, durch den die Form des Proteins angenähert wird, parallel zur Oberfläche ausgerichtet ist (Dies wird im Folgenden als *side-on* Konformation bezeichnet, vgl. Abbildung 5.2). Der Vergleich mit der experimentellen Spindichte ergibt, dass $75 \% \pm 15\%$ einer Monolage adsorbiert wurden. Die hohe Ungenauigkeit ergibt sich einerseits aus den erwähnten Basislinienproblemen. Andererseits ist der experimentell ermittelte Wert mit

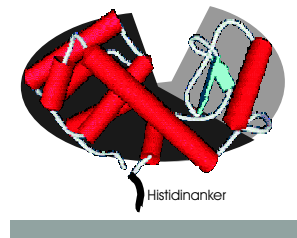


Abbildung 5.2: Side-on Adsorptionskonformation des ellipsoidal angesehenen T4 Lysozyms

einem systematischen Fehler versehen, der sich aus der zumeist nicht vollständig ablaufenden Markierungsreaktion der Proteine ergibt (die Ausbeute liegt für Helixoberflächenstellen zwischen 85 und 95%). Die Abweichung des experimentell bestimmten Wertes der Proteindichte von der rechnerischen Abschätzung lässt sich mit einer nicht perfekten Packung der Proteine auf der Oberfläche erklären, wie von einem nicht-kristallinen Ensemble zu erwarten ist. In dem untersuchten Fall muss aufgrund der vektoriellen Anbindung des Proteins von einer azimuthalen Unordnung ausgegangen werden. Somit wird deutlich, dass die theoretisch berechnete Spindichte einer Monolage eine obere Abschätzung darstellt, da hier von einer dichtesten Packung der idealisierten Ellipsoide und einer Markierungseffizienz von 100% ausgegangen wurde. Daher wird die erhaltene Intensität adsorbierten Proteins der Adsorption einer Monolage in *side-on* Konformation zugeordnet.

5.2 Winkelabhängige ESR-Spektren des adsorbierten T4 Lysozyms

Zur Analyse der Struktur und Dynamik von T4L nach Adsorption auf der Lipiddoppelschicht wurden zehn Mutanten von T4L hergestellt und spinmarkiert. In Abbildung 5.3 sind die Stellen von T4L eingezeichnet, an denen die jeweiligen Mutanten ein Cystein zur Spinmarkierung tragen. Die meisten markierten Stellen befinden sich auf der Oberfläche von α -Helices. Die Helixoberflächenstellen bezeichnen somit Seitenketten, die in die Lösung gerichtet sind und keine tertiäre Wechselwirkung mit dem Proteinrückgrat eingehen [92]. Damit wird an Helixoberflächenstellen die Konformation von R1 nicht durch Wechselwirkung mit benachbarten Seitenketten gestört. Die N-Termini von Helices unterscheiden sich jedoch in ihren ESR-Spektren von denjenigen der übrigen Helixoberflächenstellen [92], so dass im Folgenden die entsprechenden Spektren von 4R1, 61R1 und 109R1 getrennt behandelt werden. Zudem wird eine Stelle an einem Loop (22) und eine Seitenkette, die einen tertiären Kontakt eingeht (150), untersucht. Wie in Kapitel 2 erläutert, führt die gleichzeitige Einführung zweier spinmarkierter Seitenketten zu einer dipolaren Wechselwirkung derselben, die potenziell zur Bestimmung von Abständen zwischen den Seitenketten und, im Falle einer makroskopischen Ausrichtung, der Orientierung des Interspinvektors zur Oberfläche verwendet werden können. Hierfür wurden die Stellen 22 und 109, die sich an gegenüberliegenden Seiten der Öffnung der Substratbindungstasche befinden, gleichzeitig markiert.

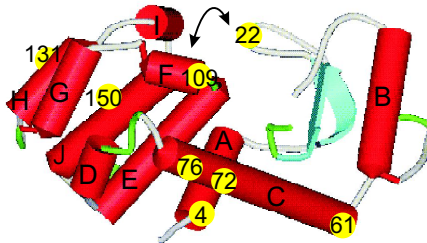


Abbildung 5.3: Das Modellprotein T4L (pdb-Datei 3lzm). Eingezeichnet sind die Aminosäuren, die jeweils in den verwendeten Mutanten in eine spinmarkierte Seitenkette überführt wurden. Der Pfeil stellt die Doppelmutante 22R1-109R1 dar, die neben den entsprechenden Einzelmутanten untersucht wird.

5.2.1 Helixoberflächen

In Abbildung 5.4 sind die ESR-Spektren der Mutanten 72R1, 76R1 und 131R1, die Positionen auf der Oberfläche von Helices markieren, in Lösung den Spektren des adsorbierten T4L gegenübergestellt. Die Spektren auf der Oberfläche wurden unter Variation des Winkels θ zwischen magnetischem Feld und Oberflächennormale aufgenommen. Die Reste 72 und 76 markieren beide die lange, domänenverbindende Helix C. Hierbei befindet sich 72 im Zentrum der Helix und 76 am C-Terminus derselben. Da die Fluktuationen des Proteinrückgrats vom Zentrum zu den Termini steigen, ist 76 einer stärkeren Dynamik des Rückgrats ausgesetzt als 72. Letztere wurde in frühen Untersuchungen bereits als ein Prototyp einer rigiden Stelle identifiziert, an der die ESR-spektroskopisch sichtbare Dynamik der spinmarkierten Seitenkette minimale Einflüsse der lokalen Fluktuationen des Rückgrats beinhalten [21], [19]. Dies schlägt sich qualitativ in verringerten Linienbreiten sowie verringerter Komplexität der Linienform des ESR-Spektrums von 76R1 im Vergleich zu 72R1 nieder. 131R1 wurde ebenfalls schon früher in Lösung untersucht [21]. Hierbei ergibt die quantitative Linienformanalyse in dem Modell von Freed und Mitarbeitern (2.1.2.3) eine identische Bewegungsform von 72R1 unter erhöhter Amplitude. Dies wurde mit stärkeren Fluktuationen der kleineren Helix H, an der sich 131 befindet, im Vergleich zu Helix C erklärt.

Ein qualitativer Vergleich der ESR-Linienformen dieser Mutanten in Lösung und auf der Oberfläche zeigt keine drastischen Veränderungen. Dies weist bereits darauf hin, dass die Sekundärstruktur der Helices C und H bei

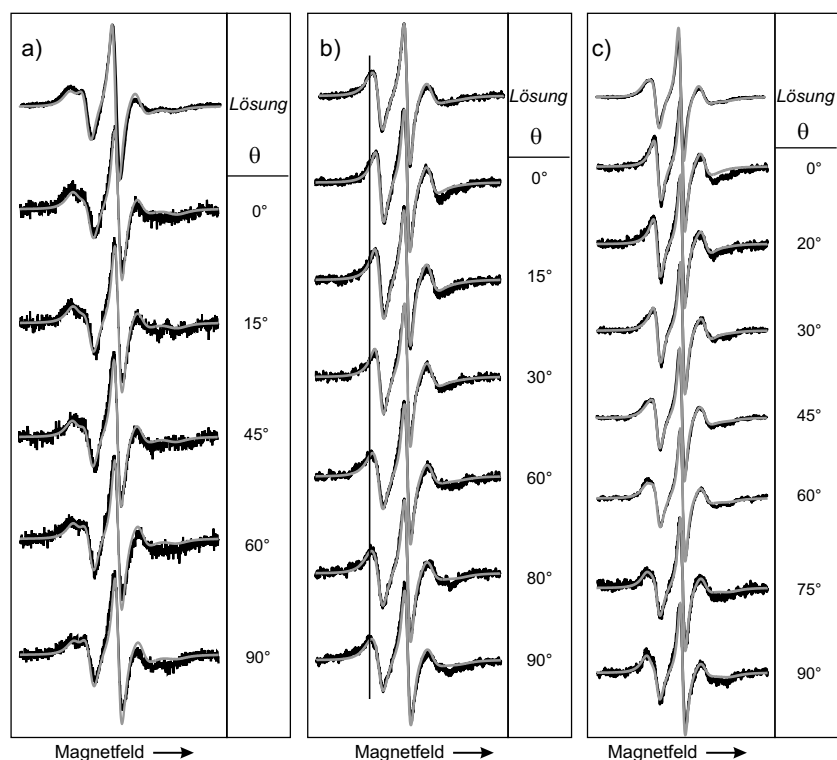


Abbildung 5.4: ESR-Spektren der T4L Mutanten 72R1 (a), 76R1 (b), 131R1 (c), die an Helixoberflächenstellen markiert sind. Vergleich der Spektren nach Adsorption auf der Lipidoberfläche mit den Spektren des Proteins in Lösung. Die Fits nach dem Modell von Freed et al. sind hell überlagert. Die Scanbreite beträgt 100 G.

Adsorption von T4L auf der neutralen Lipiddoppelschicht erhalten bleibt. Wie in Abbildung 5.4 anhand der Hilfslinie für 76R1 illustriert wird, variieren die Linienformen des adsorbierten T4L mit dem Winkel θ des Magnetfelds. Das ist ein Beweis für eine Vorzugsorientierung der adsorbierten Proteine. Diese Anisotropie wird insbesondere im Hoch- und Tieffeldpeak sichtbar. So verschiebt sich die Spitze in der Tieffeldregion von 76R1 bei Variation von θ zwischen 0° und 90° kontinuierlich zu kleineren Werten. Dabei fällt auf, dass die stärksten Linienformveränderungen in einem kleinen Bereich des Einfallswinkels stattfinden. So werden in den Spektren von 76R1 die stärksten Veränderungen im Bereich von 90° gefunden, während eine signifikante Veränderung des Tieffeldpeaks der Spektren von 131 in der Region von 60° beobachtet wird. Die Linienformen der Spektren von 72R1 erfahren die größten Veränderungen zwischen 45° und 60°. Da die Orientierung der spinmar-

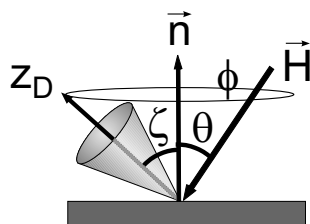


Abbildung 5.5: Zusammenfassung der geometrischen Parameter. ζ und ϕ sind die Polarwinkel zwischen dem proteinfesten Direktor (z_D) und der Oberflächennormale. θ gibt den experimentell eingestellten Winkel zwischen äußerem Magnetfeld und der Oberflächennormale an.

kierten Seitenkette der winkelabhängigen Linienform unterliegt, weist das unterschiedliche Verhalten der Spektren der verschiedenen Mutanten darauf hin, dass der Spinmarker an den Stellen jeweils unterschiedliche Winkel mit der Oberfläche einnimmt. Trotzdem können die exakten Orientierungen der spinmarkierten Seitenketten durch derartige qualitative Vergleiche nicht bestimmt werden, sondern es bedarf einer theoretischen Beschreibung der winkelabhängigen Linienform.

Zur Simulation der ESR-Spektren von Proteinen in Lösung, wird das MOMD Modell von Freed und Mitarbeitern („Mikroskopische Ordnung Makroskopische Unordnung“) verwendet, das in Kapitel 2 eingeführt und in Kapitel 4 bereits zur Beschreibung der ESR-Spektren der Lipidvesikel angewandt wurde. Die dynamischen Parameter der Simulationen der Proteinspektren sind, wie im Falle der Lipide, die Koeffizienten des Ordnungspotenzials und die Hauptwerte des Rotationsdiffusionstensors, die bei einem axialsymmetrischen Tensor durch den isotropen Wert R und den Anisotropieparameter N gefasst werden können (vgl. Kapitel 4.1.2). Dabei reicht zur Simulation der in dieser Arbeit untersuchten Mutanten jeweils die Berücksichtigung des ersten Koeffizienten c_{20} aus. Hieraus ergibt sich nach Gleichung (2.44) der Ordnungsparameter S . Die ESR-Spektren von Proteinen in Lösung werden – aufgrund der zufälligen Orientierung der Proteine im Raum – mittels Integration der Direktorachse des Ordnungspotenzials über alle Raumrichtungen berechnet.

Für den Fall adsorbierter Proteine, die eine Ausrichtung auf der Oberfläche aufweisen, ist letzteres analog des Falls orientierter Lipiddoppelschichten nicht mehr gültig. Der einzige Unterschied in der Beschreibung adsorbierter Proteine gegenüber der orientierter Lipiddoppelschichten liegt darin, dass der Winkel zwischen Direktor und Oberflächennormale im Normalfall nicht null ist. Dabei entspricht die Orientierung des Direktors des Bewegungsmodell ei-

ner Ausrichtung der spinmarkierten Seitenkette. Diese kann im Modell durch den Polarwinkel ζ zwischen dem Direktor des Ordnungspotenzials und der Oberflächennormale sowie durch den Azimuth ϕ berücksichtigt werden, der den Winkel zwischen Direktor und der Ebene festlegt, die von der Oberflächennormale und dem statischen Magnetfeld aufgespannt wird. (vgl. Abbildung 5.5). Die vektorielle Anbindung des Proteins sollte jedoch zu keiner Restriktion des Azimuthalwinkels ϕ führen. Daher wurden zur Berechnung der winkelabhängigen Spektren des adsorbierten Proteins die Möglichkeit eines definierten Winkels ζ in das Programm NLSL implementiert. ζ stellt einen neuen Fitparameter dar, während weiterhin über alle Winkel ϕ integriert wird. Die Möglichkeit einer Abweichung der Direktorachsen von einer perfekten Ausrichtung wird – wie in ähnlicher Weise zur Simulation der Spektren der Lipiddoppelschichten (vgl Kapitel 4.1) eingeführt – durch eine Gaußsche Verteilung um ζ mit einer Standardabweichung σ berücksichtigt.

Zur Bestimmung der dynamischen Parameter von R1 an einer bestimmten Position wurden zunächst die Lösungsspektren im MOMD Modell simuliert. Unter Verwendung dieser Parameter diente dann ein globaler Fit über alle winkelabhängigen Spektren zur Bestimmung der Orientierung, d.h. des Kippwinkels ζ und der Standardabweichung σ . Diese Vorgehensweise setzt voraus, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins, die in der Dynamik der Seitenkette kodiert ist [52], [51], bei Adsorption nicht verändert wird. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass ein konsistenter Fit aller winkelabhängigen Spektren und des Lösungsspektrums nicht nur die Orientierung des Direktors des Ordnungspotenzials liefert, sondern auch einen starken Hinweis auf die Bewahrung der Sekundär- und Tertiärstruktur des adsorbierten Proteins darstellt.

Die Hauptwerte der magnetischen Tensoren (\hat{A} , \hat{g}) der spinmarkierten Seitenkette wurden für alle Simulationen auf Literaturwerte festgelegt [21] (s. Tabelle 5.1). Daneben wurden die dynamischen Parameter der Mutanten 72R1 und 131R1 ebenfalls aus der Literatur übernommen [21]. In Anlehnung an das dort herausgearbeitete Resultat, dass die ESR-Linienformen von Helixoberflächenstellen durch ähnliche dynamische Parameter charakterisiert werden, wurden in dieser Arbeit die Werte von 72R1 jeweils als Anfangswerte

g_x	g_y	g_z	$A_{xx}[\text{G}]$	$A_{yy}[\text{G}]$	$A_{zz}[\text{G}]$
2.0076	2.0050	2.0023	6.2	5.9	37

Tabelle 5.1: Magnetische Parameter der Simulation der Proteinspektren nach Columbus et al. [21].

Position R1	%Komp.	R ($\cdot 10^7 s^{-1}$)	N	S	$\beta_D [^\circ]$	$\zeta [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$
4 -Komp.1	60 (80) ¹	2.9	3.2	0.6	65	80 \pm 5	15
4-Komp.2	40 (20) ¹	5.0	0.94	0.17	36	20 \pm 20	15
22	100	7.4	0.94	0	-	-	-
61 -Komp.1	70	2.5	2.51	0.44	65	20 \pm 10	15
61 -Komp.2	30	8.3	0.94	0.17	36	60 \pm 20	15
72	100	7.8	0.94	0.47	36	50 \pm 5	15
Anx-T4L72	100	7.8	0.94	0.47	36	70 \pm 10	25
76	100	7.6	0.94	0.27	36	90 \pm 5	15
109- Komp.1	94	7.2	1.1	0.38	36	42 \pm 5	15
109- Komp.2	6	12.6	1.0	0	-	-	-
131	100	7.8	0.94	0.35	36	73 \pm 5	15

Tabelle 5.2: Parameter der Simulation der ESR-Spektren von T4L, das an der angegebenen Position markiert wurde. Komp.: Komponente; ¹Anteil der Komponente in Lösung., Anx-T4L: Fusionsprotein mit Annexin.

te der Fitprozeduren zur Simulation der Spektren der übrigen helicalen (auch N-terminalen) Stellen verwendet. Columbus et al. betonen dabei insbesondere die strukturelle Bedeutung des Winkels β_D zwischen der Direktorachse und der z-Achse des magnetischen Koordinatensystems (vgl. Kapitel 2, Abbildung 2.4). Daher wurde der dort bestimmte Wert von 36° bei der Bestimmung der dynamischen Parameter von 76R1 konstant gehalten.

Die besten Fits sind in Abbildung 5.4 als helle Linien den experimentellen Daten überlagert. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. Abbildung 5.4 macht deutlich, dass eine gute Übereinstimmung zwischen simulierten und experimentellen Spektren erreicht wird. Dabei reagieren alle Fits der winkelabhängigen Spektren empfindlich gegenüber einer Variation der Direktororientierung. Unterschiede in der Sensitivität ergeben sich einerseits aus der intrinsischen Mobilität der Seitenkette an den unterschiedlichen Positionen, die zu einer dynamischen Mittelung führt, und andererseits aus dem vorliegenden Kippwinkel. Dabei sinkt die Empfindlichkeit mit steigender Mobilität und mit der Annäherung von ζ an die Umgebung 45° . Aufgrund der Kippwinkel von 90° bzw. 73° zeigen die recht mobilen Positionen 76 bzw. 131 weiterhin eine deutlich ausgeprägte Winkelabhängigkeit.

Der Kippwinkel von 50° führt bei den Spektren von 72R1 trotz geringer Mobilität zu einer geringen Anisotropie. Die geringe Anisotropie von 72R1 lässt sich jedoch nicht erschöpfend durch die Wahl dieses Kippwinkels beschreiben. Vielmehr wird hier deutlich, dass ein Teil der Anisotropie durch

eine polare Unordnung der Moleküle ausgemittelt wird. Die Spektren von 76R1 und 131R1 können ohne Annahme einer Verteilung der Direktorachse auf der Oberfläche zufriedenstellend beschrieben werden, während die Simulation der Spektren von 72R1 erst nach Berücksichtigung eines Gaußschen Unordnungsprofils mit einer Standardabweichung von $15^\circ \pm 5^\circ$ gelingt. Letztere Annahme verbessert auch die Qualität der Fits von 131R1 und 76R1. Hier sind die Verbesserungen jedoch zu gering, um allein die Einführung eines weiteren Parameters zu rechtfertigen. Es sollte an dieser Stelle bemerkt werden, dass – wie im Falle der Lipiddoppelschichten – die Beobachtung einer statischen Unordnung relativ zur Zeitskala der ESR-Spektroskopie zu sehen ist, die dynamische Moden mit Korrelationszeiten größer als ≈ 50 ns einschließt.

5.2.2 N-terminale Enden der Helices

Proteine, die an N-terminalen Stellen von Helices markiert sind, zeigen üblicherweise komplexere ESR-Spektren, die auf eine zusätzliche Wechselwirkung der spinmarkierten Seitenkette mit der Umgebung hinweisen [92]. Die Dynamik von R1, die zu dieser Linienform führt, wurde bisher nicht mittels spektraler Simulationen analysiert.

In dieser Arbeit werden drei N-terminale Stellen untersucht: 4 befindet sich am N-Terminus des Proteins in der ersten Windung der Helix A. Der Rest 61 stellt den Beginn der langen Helix C dar, die bereits mittels der Mutanten 72R1 und 76R1 mit Spinsonden versehen wurde. 109 ist Teil der kleinen Helix F. Die ESR-Spektren sowie die Fits dieser Mutanten sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Auch hier wird eine gute Beschreibung der experimentellen Spektren erreicht. Wie aus Tabelle 5.2 ersichtlich ist, werden für alle Stellen zwei Komponenten zur Beschreibung der Linienform benötigt. Zudem müssen die möglichen dynamischen Parameter über den Bereich der „typischen“ Helixoberflächenstellen hinaus erweitert werden. Dabei wird jeweils eine Komponente gefunden, die diesen Stellen ähnelt, während die zweite einen von 36° abweichenden Wert für β_D erfordert. Da dieser Parameter von Columbus et al. als wesentliches Charakteristikum einer von der Umgebung ungestörten Bewegung von R1 an der Oberfläche von Helices herausgearbeitet wurde [21], wird ein Wert von 36° im Folgenden als Indikator für das Vorliegen einer derartigen Bewegungsmode verwendet.

Das ESR-Spektrum von 109R1 in Lösung enthält neben einer den Helixoberflächenstellen ähnlichen Komponente (Komp. 1, vgl. Tabelle 5.2), die jedoch eine ungewöhnlich hohe Anisotropie der Bewegung (N) aufweist, eine schnelle, isotrope Komponente. Letztere liegt nur in einem geringen spektralen Anteil vor. Aus den winkelabhängigen Spektren adsorbierten 109R1

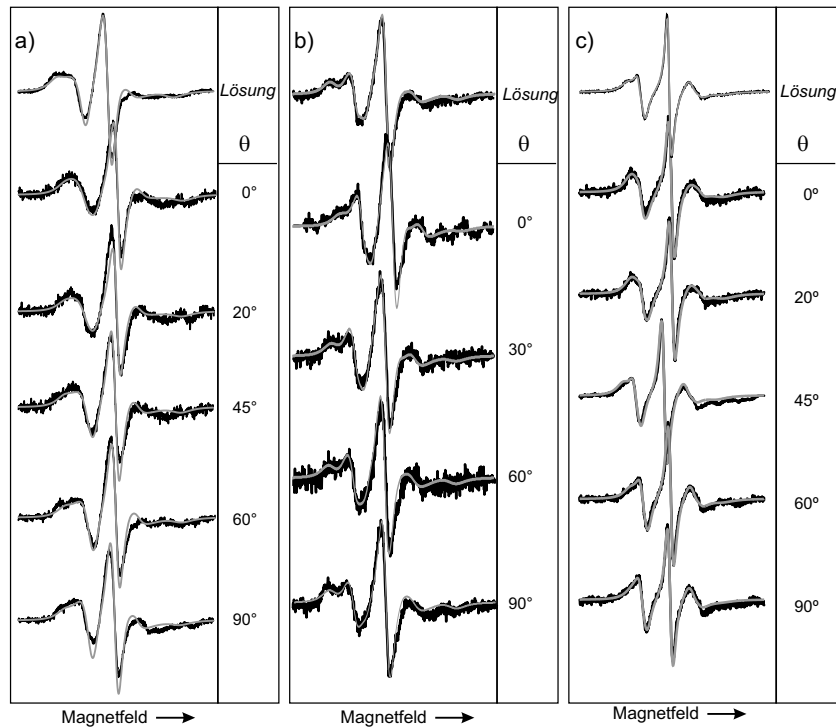


Abbildung 5.6: ESR-Spektren von Helix N-termini an den Stellen 4 (a), 61 (b), 109 (c). Vergleich der Spektren nach Adsorption auf der Lipidoberfläche mit den Spektren des Proteins in Lösung. Die Fits nach dem Modell von Freed et al. sind hell überlagert. Die Scanbreite beträgt 100 G.

wird ein Kippwinkel ζ der rigideren Komponente (1) von 42° erhalten. In der Simulation der Linienform der Spektren von 61R1 überwiegt die ungewöhnliche Komponente (1). Diese Komponente reflektiert eine relativ immobilisierte spinmarkierte Seitenkette, wie die geringe Frequenz der Bewegung anzeigt. Neben der hohen Anisotropie der Bewegung fällt insbesondere der veränderte Winkel β_D von 65° im Vergleich zu Helixoberflächenstellen auf. Die zweite Komponente dagegen zeigt lediglich eine leicht erhöhte Mobilität im Vergleich zu anderen Helixoberflächenstellen. Der berechnete Kippwinkel ζ dieser Komponente von 60° ist aufgrund der hohen Mobilität sowie des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit einem großen Fehler von $\pm 20^\circ$ behaftet. Wie in Tabelle 5.2 angegeben, beträgt der Kippwinkel für die langsamere Komponente 20° .

Das ungewöhnlichste Verhalten zeigen die Spektren des 4R1. Hier werden zwei Komponenten verringerter Mobilität gefunden, deren Bewegung – wie bei 61R1 – durch β_D -Werte von 36° bzw. 65° charakterisiert sind. Da-

bei ähnelt die Komponente mit ungewöhnlichem β_D der entsprechenden des 61R1. Es soll hier erwähnt werden, dass die Linienform von 4R1 stark von denen der intensiv untersuchten Helixoberflächenstellen abweicht, so dass die dort ermittelten Parameter hier als Anfangswerte nicht hilfreich sind. Dies resultiert in einer höheren Unwägbarkeit der Fitparameter. Es wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch kein weiterer Parametersatz gefunden, der eine vergleichbare Simulation der Linienform erlaubt. Ein globaler Fit der winkelabhängigen Spektren mit den dynamischen Parametern der Simulation des Lösungsspektrums gelingt nur, wenn das Verhältnis der Komponenten von 80/20 auf 60/40 zugunsten der mobileren Komponente verschoben wird (s. Tabelle 5.2). Unter dieser Annahme ergeben sich Kippwinkel ζ von 20° für die Komponente 2 und 80° für Komponente 1.

5.2.3 Tertiärer Kontakt

Die tertiäre Kontaktstelle 150R1 befindet sich in dem Bündel der Helices G, H, I und J. In der Kristallstruktur von 150R1 wird eine tertiäre Wechselwirkung von R1 mit Seitenketten sowohl in Helix H als auch I sichtbar. Diese Wechselwirkung bewirkt eine wohldefinierte Konformation der spinmarkierten Seitenkette [33]. Wie in Abbildung 5.7 deutlich wird, schlägt sich dies in einem stark strukturierten ESR-Spektrum nieder. In den Spektren von 150R1 nach Immobilisierung auf der Lipidoberfläche sind jedoch nicht mehr alle Charakteristika des Lösungsspektrums vorhanden. Dies tritt insbesondere in der Tieffeldregion hervor. Während das Lösungsspektrum hier zwei gut aufgelöste Peaks zeigt, scheinen die winkelabhängigen Spektren eine Verschiebung der spektralen Intensität hin zu niedrigeren Feldern wiederzugeben. Ein direkter qualitativer Vergleich ist aufgrund der Winkelabhängigkeit der Oberflächenspektren allerdings schwierig. Daher wurde 150R1 an große unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 400 nm gebunden. Das ESR-Spektrum dieser Dispersion kann nun direkt mit dem Lösungsspektrum verglichen werden. Der Vergleich in Abbildung 5.7 beweist, dass nach Adsorption auf der Lipidoberfläche ein verändertes ESR-Spektrum von 150R1 erhalten wird. In diesem Spektrum ist die aufgelöste Doppelpeakstruktur im Tieffeldpeak auf Kosten des Peaks bei leicht höheren Feldern verschmiert.

5.2.4 Loop

Die Dynamik der Seitenkette R1 wird, wenn sie an einen Loop angebracht wurde, von der hohen Mobilität des Proteinrückgrats in diesen Bereichen dominiert. Daher ist die Markierung der Stelle 22 ungeeignet, um die Orientierung des adsorbierten Proteins zu bestimmen. Demgegenüber ist sie für

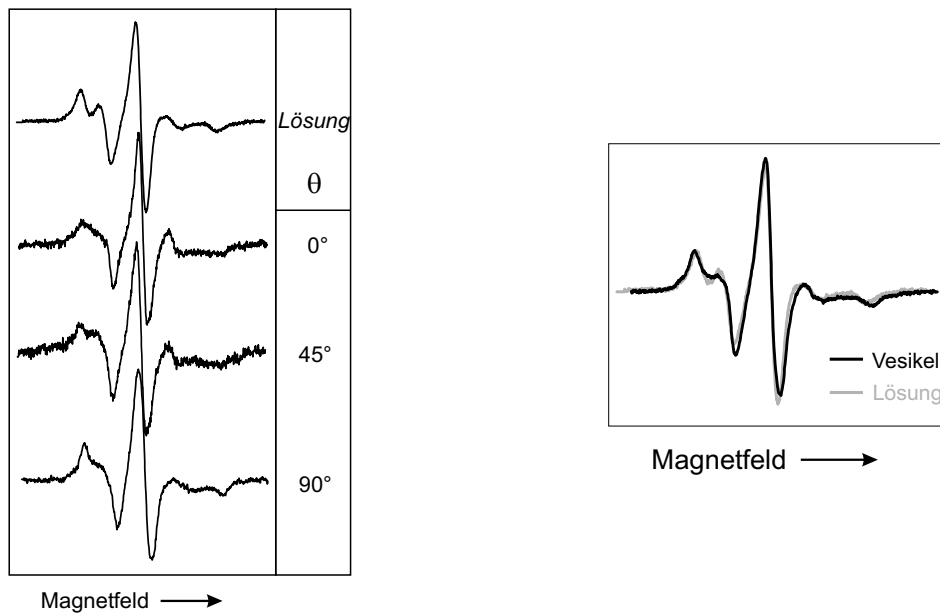


Abbildung 5.7: ESR-Spektren der tertiären Kontaktstelle 150R1. Links: Vergleich der Spektren nach Adsorption auf der Lipidoberfläche mit dem Spektrum des Proteins in Lösung. Rechts: ESR-Spektren von 150R1, das auf große unilamellare Vesikel (Durchmesser 400 nm) adsorbiert wurde (dunkel), im Vergleich zum Spektrum des Proteins in Lösung (hell). Die Scanbreite beträgt 100 G.

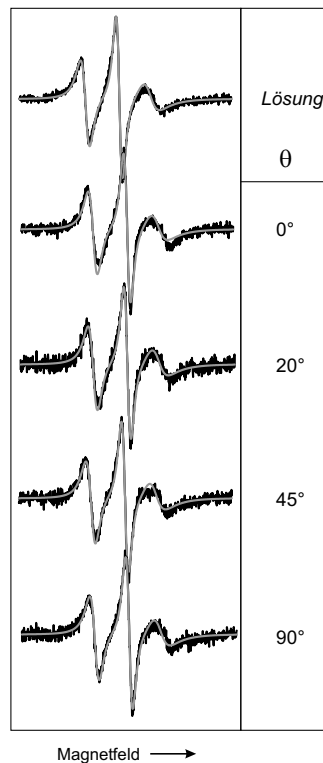


Abbildung 5.8: Vergleich der Spektren von 22R1 nach Adsorption auf der Lipidoberfläche mit den Spektren des Proteins in Lösung. Die Fits nach dem Modell von Freed et al. sind hell überlagert. Die Scanbreite beträgt 100 G.

die Bestimmung der Sekundärstruktur des adsorbierten Proteins von besonderem Interesse, da flexible mobile Bereich des Proteins besonders sensibel auf Veränderungen der Umgebung reagieren können. Dies gilt im Speziellen für den hier betrachteten Loop. Kristallstrukturuntersuchungen haben gezeigt, dass dieser Loop in Form der Wechselwirkung mit D20 an der Substratbindung beteiligt ist [61]. Damit wird die Annahme unterstrichen, dass hier ein sehr reaktiver Teil des Proteins vorliegt. Nicht zuletzt markiert 22 einen β -Turn des einzigen β -Faltblatts von T4L.

Die ESR-Spektren der adsorbierten Mutanten weisen jedoch nicht auf strukturelle Veränderungen hin, da Lösungs- und Oberflächenspektren mit identischen Parametern simuliert werden können (vgl. Abbildung 5.8). Hierfür wird kein Ordnungsparameter S benötigt, weil die Spektren isotrop sind. Damit sind weitere Informationen zur Proteinorientierung ausgeschlossen.

5.2.5 Doppelmutation

T109 befindet sich in dem E22 gegenüberliegenden Teil der Substratbindungstasche in der C-terminalen Domäne. Bei Substratbindung entfernen sich diese beiden Reste voneinander. Durch gleichzeitige Markierung der Reste kann dies im ESR-Spektrum anhand der Verbreiterung der Linienform verfolgt werden, die durch die dipolare Wechselwirkung der Spins hervorgerufen wird [93]. Eine quantitative Auswertung des Interspinabstandes durch Faltung der Summe der Einzelspektren mit einer abstandsabhängigen Linienverbreiterungsfunktion stellt eine neuere Entwicklung des SDSL dar (vgl. Kapitel 2 [106],[1]). Eine Anpassung des Spektrums von 22R1-109R1 in Lösung unter Verwendung dieses Modells ergibt für den Abstand der Nitroxide die in Abbildung 5.9 (rechts) dargestellte Abstandsverteilung. Die breite Verteilung spiegelt den stark mobilen Charakter insbesondere der Stelle 22 aber auch der Stelle 109 wider. Die Bimodalität deutet darauf hin, dass T4L in zwei Konformationen mit Abständen im Bereich von 22 Å bzw. 16 Å in einem Verhältnis von 2:3 (± 0.5) vorhanden ist.

Nach Adsorption des Proteins können ebenfalls ESR-Spektren der Doppelmutante aufgenommen werden, obwohl auch hier eine Verbreiterung der Spektren im Vergleich zu der Summe der einzeln markierten Proteine gefunden wird (s. Abbildung 5.9). Dies ist angesichts der beobachteten Proteinmenge nicht trivial, da breite Linien zu geringen Signalhöhen führen. Die Verbreiterung liegt bei einer qualitativen Abschätzung im Bereich dessen, was in Lösung beobachtet wurde.

Weiterhin fällt auf, dass die Linienverbreiterung mit dem Winkel θ variiert. So ist sie im Bereich von 20° stärker ausgeprägt als bei 90°. Dieser Verlauf wird insbesondere im Tieffeldpeak sichtbar.

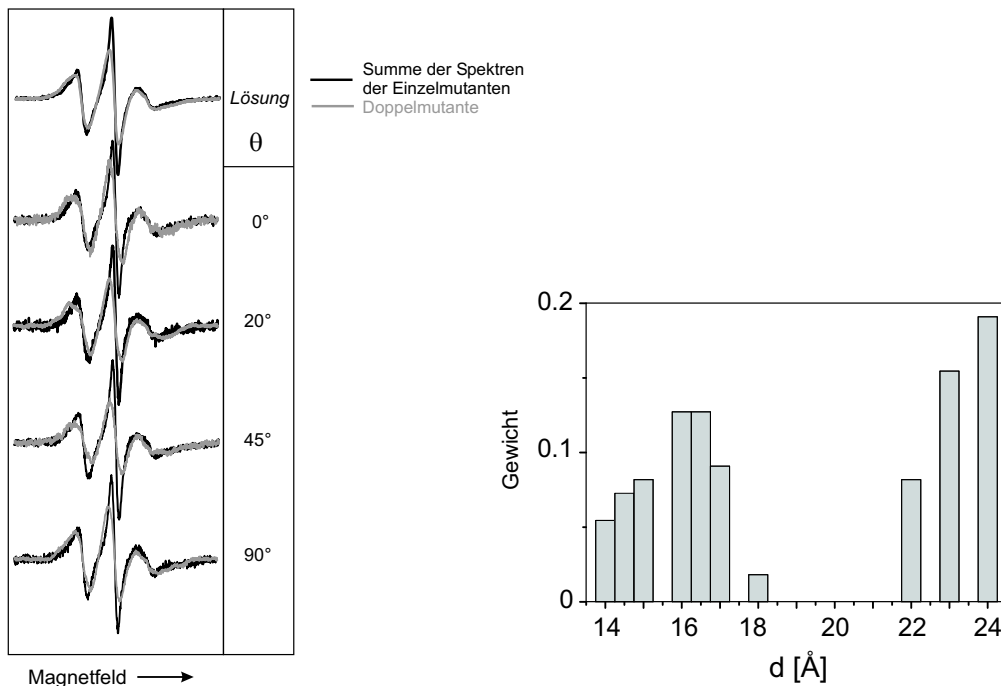


Abbildung 5.9: Links: ESR-Spektren der Doppelmutante 22R1-109R1 (hell) im Vergleich zu der Summe der Spektren der Einzelmutationen (dunkel). Die Scanbreite beträgt 100 G. Rechts: Abstandsverteilungsfunktion für die Anpassung des Lösungsspektrums über die Faltung der Einzelspektren mit einer Pake-Funktion.

5.2.6 Immobilisierung über ein Fusionsprotein mit Annexin12

Das membranassoziierte Protein Annexin (12) bindet, in Abhängigkeit der Anwesenheit von Calcium, unter Ausbildung zweidimensionaler Kristalle an Phosphatidylserin (PS) enthaltende Membrane. Die Verwendung eines Fusionsproteins von T4L mit diesem Protein eröffnet somit eine alternative Möglichkeit der definierten vektoriellen Immobilisierung von T4L. Wird T4L 72R1 über ein derartiges Fusionsprotein an eine DOPC/DOPS (4:1) Oberfläche gebunden (s. Kapitel 4.2), so ist die ESR-Intensität des adsorbierten Proteins um 40% gegenüber der komplex gebundenen Proteinschicht verringert. Aus der elektronenmikroskopischen Strukturanalyse ist die Packungsdichte der adsorbierten Annexinmoleküle direkt zugänglich und beträgt 1 Protein/40 nm²[12]. Hiermit ergibt sich, dass die Packungsdichte von Annexin ca. 50% der theoretisch abgeschätzten Obergrenze der Packung von T4L beträgt.

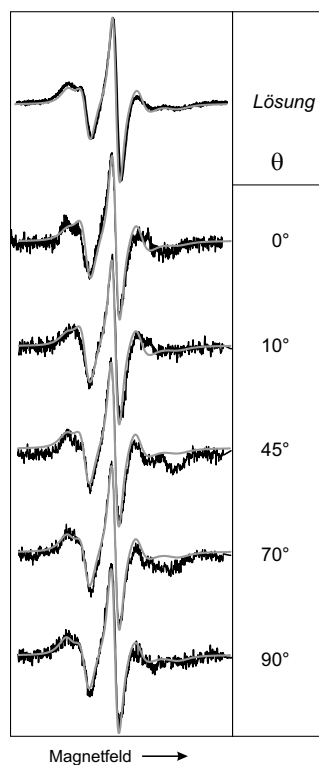


Abbildung 5.10: ESR-Spektren des Fusionsproteins Annexin12-T4L 72R1 vor und nach Adsorption auf einer PC/PS (4:1) Lipiddoppelschicht. Die Fits nach dem Modell von Freed et al. sind hell überlagert. Die Scanbreite beträgt 100 G.

Dies ermöglicht einerseits eine alternative Eichung der ESR-Intensitäten zur Berechnung der Proteindichte. Dabei liefert das Intensitätsverhältnis der verschiedenen Präparationen ebenfalls einen Wert von 75% einer optimalen dichtesten Packung der His₆-T4L Moleküle, der das Ergebnis aus 5.1 bestätigt. Andererseits zeigt diese Beobachtung, dass die Größe des Annexins eine laterale Separation der T4L Proteine auf der Oberfläche einführt, die aufgrund der Kristallinität hoch regelmäßig erfolgt.

Die winkelabhängigen Spektren der adsorbierten Mutante 72R1 des Fusionsproteins, die im Zentrum der langen Helix C von T4L markiert ist, sind in Abbildung 5.10 dargestellt. Der Vergleich mit den Oberflächenspektren von His₆-T4L 72R1 in Abbildung 5.4 a) zeigt leichte Unterschiede in der Variation der Linienform mit dem Winkel θ des Magnetfelds, während die Spektren in Lösung identisch sind. Daher wurden zur Simulation der winkelabhängigen Spektren des Fusionsproteins die dynamischen Parameter nach Columbus

et al. verwendet [21], mit Hilfe derer bereits die Oberflächenspektren von His₆-T4L 72R1 beschrieben werden konnten. Die Fitparameter sind nun lediglich der Orientierungswinkel ζ und der Unordnungsparameter σ . Wie in Tabelle 5.2 angegeben, unterscheiden sich die Werte, die für die verglichenen Anbindungen erhalten werden. So ergibt sich für das Fusionsproteine ein Kippwinkel ζ von $70^\circ \pm 10^\circ$ und eine Standardabweichung σ von 25° .

Eine derart erniedrigte polare Ordnung des adsorbierten T4L wird ebenfalls im Fall einer (aufgrund sehr niedriger Ausgangskonzentration des Proteins) unvollständig belegten chelatisierenden Lipidoberfläche mit His₆-T4L beobachtet. Diese Spektren können ebenfalls durch eine vergrößerte Standardabweichung der Proteinorientierung mit den Fitparametern der Spektren bei Monolagenbedeckung simuliert werden. Bei einer Belegung von 0.3 ML beträgt die Standardabweichung 30° .

5.3 Diskussion

5.3.1 Die Sekundär- und Tertiärstruktur des adsorbierten (His)₆-T4 Lysozym

Die Ähnlichkeit der ESR-Spektren des Proteins in Lösung und nach Adsorption auf der Lipidoberfläche bei Markierung der Oberflächenstellen an Helices C und H weist darauf hin, dass die Strukturen dieser Helices auf der Lipidoberfläche erhalten bleiben. Die qualitative Linienformanalyse der Spektren unterstützt diese Annahme, indem die Spektren der gelösten nativen Mutanten und der adsorbierten Spezies mit identischen dynamischen Parametern im Rahmen eines einfachen Modells für vektoriell ausgerichtete Moleküle beschrieben werden können. Da die Linienform des ESR-Spektrums einer Mutante, abgesehen von globalen Gemeinsamkeiten zwischen Sekundärstrukturelementen, auch als Fingerabdruck für die Dynamik der Seitenkette in der spezifischen lokalen Umgebung verwendet werden kann, liefert die konsistente Beschreibung der ESR-Spektren des Proteins in beiden Zuständen nicht nur einen empfindlichen Beweis für den Fortbestand der Helices, sondern zeigt zudem, dass die strukturellen Details der Umgebungen der markierten Stellen nicht verändert werden.

Diese Analyse profitiert von den bereits umfassend untersuchten dynamischen Eigenschaften der Helixoberflächenstellen. Dagegen stellt die Analyse der ESR-Spektren der N-terminalen helicalen Stellen 4, 61 und 109 eine erstmalige theoretische Beschreibung der Dynamik dieser Elemente der Sekundärstruktur dar. Dabei ist die Einführung zweier Komponenten konsistent mit der qualitativen Linienformanalyse einer Reihe von N-terminalen

Helixoberflächenstellen, in der bereits darauf hingewiesen wurde, dass ESR-Spektren dieser Mutanten kompliziertere Linienformen zeigen als die übrigen helicalen Stellen [92]. Dies wurde mit der Existenz mehrerer Komponenten und somit unterschiedlicher Bewegungsmodi von R1 interpretiert. Die Ähnlichkeit der Parameter jeweils einer Komponente mit denjenigen typischer Helixoberflächenstellen weist auf einen Anteil an Spinsonden mit ungestörter Bewegung hin. Hierbei stützt sich die Einordnung der Komponenten aufgrund der Analyse von Columbus et al. hauptsächlich auf den Wert des Kippwinkels zwischen dem magnetischen und dem Rotationskoordinatensystem von 36° für β_D , der eine ungestörte Bewegung charakterisiert [21]. Die Existenz jeweils einer Komponente in den Spektren von 61R1 und 4R1, die einen von 36° verschiedenen Kippwinkel zwischen dynamischem und magnetischem Koordinatensystem aufweist, deutet somit auf eine, gegenüber regulärer Helixoberflächenstellen, veränderte Konformation des Spinmarkers hin. Interessanterweise können die jeweiligen Komponenten von 4R1 und 61R1 mit ähnlichen Parametern simuliert werden. Hier fallen insbesondere die identischen Kippwinkel β_D und die hohe Anisotropie der Rotationsbewegung auf. Die niedrigere Mobilität, die sich in der Verringerung sowohl der Amplitude als auch der Frequenz der Bewegung niederschlägt, zeigt, dass die spinmarkierte Seitenkette in diesem Bewegungsmodus weiteren Einschränkungen unterliegt.

Eine erniedrigte Mobilität des Spinmarkers, wenn er an N-terminalen Stellen angebracht wird, ist nicht sofort einsichtig, da die Bewegungen des Helixrückgrats in Richtung der Helixenden zunehmen. So wurde im vorangegangenen Abschnitt für 76R1, das sich am C-terminalen Ende derselben Helix C wie 61R1 befindet, eine erhöhte Mobilität von R1 gefunden. Die Linienform von 61R1 ist hingegen charakteristisch für eine Wechselwirkung des Spinmarkers mit benachbarten Seitenketten. Eine vergleichbare Linienform wurde für T4L 119R1 gefunden [66]. Dort konnte diese Linienform mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse des spinmarkierten Proteins über eine Wechselwirkung mit einem benachbarten Glutamin erklärt werden. Eine derartige Wechselwirkung mit Seitenketten resultiert in einer veränderten Konformation der spinmarkierten Seitenkette. Im Rahmen des Bewegungsmodells der Linienformanalyse wird dies in einem veränderten Kippwinkel zwischen magnetischem und dynamischem Koordinatensystem (β_D) sichtbar. Zudem reflektieren die erniedrigte Frequenz und Amplitude sowie die höhere Anisotropie der Bewegung eine Einschränkung der Freiheitsgrade des Moleküls durch einen Wechselwirkungspartner. Eine derartige Situation kann mit der Beteiligung von R1 an Wasserstoffbrückenbindungen mit Seitenketten der vorangehenden Turns, wie von Mchaourab et al. auf der Basis der qualitativen Linienformanalyse vorgeschlagen wurde, interpretiert werden [92]. Das sogenannte Helix

Capping wird als Charakteristikum der N-termini von Helices diskutiert [77], die zur Bildung und Stabilisierung der Sekundärstruktur bedeutend beitragen. Inwiefern die beobachteten dynamischen Veränderungen allgemein auf N-terminale Positionen angewandt werden können, müssen weitere Untersuchungen anderer Systeme zeigen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Helix C, an der sich 61R1 befindet, als lange, rigide Helix ein gutes Modellsystem darstellt. Zudem wird die Güte der Fitparameter von 61R1 durch die große Datenbasis der winkelabhängigen Spektren gegenüber Resultaten aus der Simulation von Lösungsspektren erhöht.

Die Möglichkeit, alle Spektren von 61R1, in Lösung und auf der Oberfläche, mit denselben Parametern zu reproduzieren, unterstützt die Schlussfolgerung des vorangegangenen Abschnitts, dass die Helix C bei Adsorption erhalten bleibt. Selbst das Verhältnis der beiden Komponenten bleibt erhalten, obwohl es ein freier Parameter des Fits war. Demgegenüber verändert sich dieses Verhältnis im Fit an die Spektren von adsorbiertem 4R1 zu Gunsten der mobileren Komponente, während die restlichen dynamischen Parameter erhalten bleiben. Dies zeigt eine leichte Veränderung der lokalen Umgebung im Bereich der Helix A an, in der die veränderte lokale Umgebung die mobilere Komponente energetisch bevorzugt. Die Nähe der Stelle 4 zu dem N-terminalen Histidinanker legt nahe, dass sie in einem relativ starken Kontakt mit der Oberfläche steht. Insofern erscheint eine leichte Reorganisation der lokalen Umgebung nicht verwunderlich und wird als Indiz für geringfügige oberflächeninduzierte Veränderungen der Proteinstruktur gewertet.

Die Linienformanalyse der Spektren von 4R1 ergibt eine stärkere Immobilisierung des Spinmarkers als an der Stelle 61. So ist auch die „klassische“ helicale Komponente ($\beta_D = 36^\circ$) verlangsamt. Der Vergleich mit der Kristallstruktur von T4L zeigt, dass F4 an einer Vielzahl von Wechselwirkungen mit benachbarten Seitenketten beteiligt ist, die sich aus der Einbindung der N-terminalen Helix A in die helicale C-terminale Domäne (Helix C, E) ergeben. Daher kann die Linienform von 4R1, die durch zwei Komponenten mit ähnlichen Parametern beschrieben wird, als Beispiel für spinmarkierte Reste angesehen werden, die eine Vielzahl von Wechselwirkungen eingehen. Dies steht im Gegensatz zu der tertiären Kontaktstelle 150R1, wo eine spezifische Wechselwirkung und demzufolge Konformation der spinmarkierten Seitenkette zu einer charakteristischen Bewegung führt, die sich in einer stark strukturierten Linienform niederschlägt. Aus dieser Interpretation folgt weiterhin, dass nicht alle Immobilisierungseffekte an der Stelle 4 auf die vorgeschlagene Helix Capping Wechselwirkung zurückgeführt werden können.

Die ESR-Spektren von 109R1 können ebenfalls auf der Basis zweier Komponenten simuliert werden. Vorherrschend ist hier die Komponente der typischen Helixoberflächenstelle. Die andere Komponente ist im Gegensatz zu

den übrigen N-terminalen Helixoberflächenstellen wesentlich mobiler und hat nur einen 6%igen Anteil an der Intensität. Damit zeigt diese Stelle keinerlei Gemeinsamkeiten mit den übrigen untersuchten N-termini von Helices. Die Ursachen mögen zum einen in der geringen Größe der Helix F begründet sein. So beinhaltet sie lediglich eine Windung, an deren Beginn sich T109 befindet. Dass die Struktur dieser „Helix“ in verschiedenen Untersuchungen der Kristallstruktur unterschiedlich wiedergegeben wurde – so wurde sie in einer Arbeit der Helix G zugeordnet [139] – weist darauf hin, dass diese Region strukturell relativ flexibel ist. Somit lässt sich die ESR-spektroskopisch detektierte sehr mobile Komponente mit der Annahme einer fluktuierenden Struktur interpretieren, die im zeitlichen Mittel einen geringen Anteil nicht-helical organisierter Spezies beinhaltet.

Die Bewahrung der Linienform der mobilen Stelle 109R1 und 22R1 zeigt, dass auch die untersuchten hochflexiblen und damit relativ reaktiven Teile des Proteins [89] keine Protein-Protein- bzw. Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen eingehen.

Demgegenüber reagiert die tertiäre Struktur der Helixbündels, an welcher die Helices G, H, I und J beteiligt sind, auf die Anwesenheit der Oberfläche, wie die veränderten Linienformen der Spektren von 150R1 beweisen. Dies wird mit einem Aufweichen der spezifischen tertiären Struktur des Helixbündels durch Wechselwirkung mit der Oberfläche interpretiert, das in der Besetzung einer zweiten Konformation von R1 resultiert. Die Markierung der Stelle 150 beweist eine Veränderung der relativen Orientierung von Helices, an der zumindest die Helices H, I und J beteiligt sind. Es soll jedoch betont werden, dass diese Veränderungen sehr klein sind und keine globale Verzerrung der tertiären Organisation des Proteins widerspiegeln. Die Energie, die zur Öffnung der spezifischen Wechselwirkung von R1 an der Stelle 150 über eine ungewöhnliche Wasserstoffbrückenbindung nötig ist, liegt im Bereich von wenigen kT . Somit illustriert dieses Beispiel die Sensitivität der Site-directed Spin Labeling Methode für strukturelle Details von Proteinen und zeigt, dass Sonden mit tertiärer Wechselwirkung ein vielversprechendes Instrument zur Untersuchung kleiner struktureller Umwandlung adsorbierter Proteine darstellen.

Die Analyse der Spektren der Doppelmutanten 22R1-109R1 eröffnet ebenfalls den Zugang zu Informationen über die Tertiärstruktur des adsorbierten T4L, indem die dipolare Wechselwirkung zwischen R1 an diesen Stellen ein Maß für den Abstand der beiden Domänen darstellt. Eine ESR-spektroskopische Analyse der Spin-Spin-Kopplungen verschiedener Doppelmutanten [93] sowie NMR-spektroskopische Messungen der dipolaren Kopplung [39] ergaben, dass die Substratbindungstasche des Enzyms T4L in Lösung größtenteils geöffnet ist, aber auch Spezies in der geschlossener Konfor-

mation vorliegen. Mchaourab et al. zeigten bereits durch eine qualitative Linienformanalyse, dass bei Schließen der Substrattasche der Abstand zwischen R1 an den Stellen 22 und 109 vergrößert wird [93]. Dies legt den Schluss nahe, dass die bimodale Abstandsverteilung, die in dieser Arbeit für das Protein in Lösung bestimmt wurde, den zwei Konformationen der Substratbindungstasche zugeordnet werden kann. Das relative Gewicht der zwei Moden der Abstandsverteilung lässt auf ein molares Verhältnis der geschlossenen zur offenen Konformation von 2:3 schließen. Goto et al. schätzten dieses Verhältnis auf der Basis der NMR-spektroskopisch gemessenen ^{15}N - ^1H N Kopplung auf ca. 1:1 ab [39].

Der Vergleich der Linienbreiten der Spektren von 22R1-109R1 vor und nach Adsorption von T4L ermöglicht eine Abschätzung, inwieweit die Immobilisierung des Proteins Veränderungen in der Konformation der Substratbindungstasche induziert. So kann eine Linienverbreiterung in cw-X-Band-ESR-Spektren erst ab Abständen von ca. 22 Å beobachtet werden [53]. In einer qualitativen Abschätzung wächst die zentrale Linienbreite bei einer weiteren Verringerung des Abstands zwischen den Spins mit $1/r^6$ [93]. Daher reagiert die Linienform des Spektrums von 22R1-109R1 empfindlich auf kleine Veränderung des Abstandes zwischen den Domänen [93]. Die Beobachtung einer ähnlichen Verbreiterung liefert somit einen wichtigen Hinweis auf den Erhalt der Organisation der zwei Domänen von T4L bei Adsorption auf der Lipidoberfläche.

Die qualitativ beobachtete Variation der dipolaren Verbreiterung der Spektren des adsorbierten Proteins mit dem Winkel θ des Magnetfeldes, in der die maximale und minimale Verbreiterung in bei 20° und 90° beobachtet wird, lässt sich in erster Näherung den Extrema der dipolaren Wechselwirkung zuordnen. Diese wird aufgrund der funktionalen Gestalt bei einem Winkel von 54° zwischen magnetischem Feld und Interspinvektor minimal (s. Gleichung 2.15). Damit läge der Interspinvektor der Nitroxide von R1 an den Stellen 22 und 109 im Bereich von 30° . Die Situation ist allerdings für das hier untersuchte System komplexer, weil die Proteinmoleküle azimuthal ungeordnet sind und somit viele Orientierungen des Interspinvektors mit dem Magnetfeld auftreten. Da die Spektren der Einzelmутanten für die einzelnen Richtungen des Magnetfelds zum Molekül aber nicht bekannt sind, ist eine theoretische Modellierung ausgesprochen schwierig und soll an dieser Stelle nicht weiter verfolgt werden.

5.3.2 Die Orientierung des adsorbierten T4L

Die Linienformen der ESR-Spektren aller adsorbierten Mutanten, außer diejenigen der Loopstelle 22R1, variieren mit dem Winkel zwischen magnetischem Feld und Oberflächennormale, unter welchem das jeweilige Spektrum aufgenommen wurde. Damit wird eine makroskopische Orientierung des Proteins auf der Lipidschicht angezeigt. Wie die konsistente theoretische Beschreibung der winkelabhängigen Linienformen in dem verwendeten Modell vektoriell angebundener Proteine verdeutlicht, besitzen diese eine polare Ordnung, während sie azimuthal ungeordnet sind.

Die Orientierung des Direktors des Ordnungspotenzials konnte mittels quantitativer Linienformanalyse aus den winkelabhängigen ESR-Spektren extrahiert werden. Um diese Information in die physikalisch relevanteren Aussagen über die Anordnung der Moleküle auf der Oberfläche übersetzen zu können, müssen die molekularen Eigenschaften der spinmarkierten Seitenkette mit den Parametern des Modells, insbesondere dem Direktor des Ordnungspotenzials, korreliert werden. Dazu müssen sowohl die Konformation als auch die Dynamik der Seitenkette an den untersuchten Stellen des Proteins bekannt sein. Hierfür werden zunächst Helixoberflächenstellen betrachtet, die bereits mittels quantitativer Linienformanalyse untersucht und durch den Ausschluss von Wechselwirkungen mit der Umgebung charakterisiert wurden [21]. Für diese Stellen wurde bereits gezeigt, dass die interne Dynamik von R1 als unabhängig von der spezifischen Helixoberfläche, an der sich die Seitenkette befindet, angesehen werden kann. Auf der Basis von Kristallstrukturuntersuchungen spinmarkierten T4L [66] und der quantitativen Linienformanalyse der ESR-Spektren wurde ein Bewegungsmodell von R1 entwickelt, in dem die Rotationsdynamik des Nitroxids hauptsächlich durch Einfachbindungsrotationen um die C-C_{Ring}- (X5) und die C-S_δ- (X4) Bindung bestimmt wird (vgl. Abbildung 5.11).

Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, dass die spinmarkierte Seitenkette an diesen Stellen definierte Konformationen einnimmt, in denen die übrigen Diederwinkel der Kette festgelegt sind (X1, X2). Diesen Schluss bestätigen Kristallstrukturuntersuchungen der spinmarkierten Proteine. Hier wurden nur wenige mögliche Konformationen beobachtet. In der häufigsten Konformationen betragen die Diederwinkel jeweils 300° [72]. Diese wird im Folgenden mit g⁻g⁻ abgekürzt (die Definition der Diederwinkel erfolgt wie in [76] vorgeschlagen). Zudem wurden die tg⁺ (X1 ≈ 180°, X2 ≈ 90°) Rotamere gefunden. Diese Konformationen wurden ebenfalls mittels DFT-Rechnungen als nahezu entartete Energieminima vorhergesagt, wobei die g⁻g⁻ Konformation leicht stabiler ist als das tg⁺ Rotamer [47]. Damit kann auf der Basis dieser unterschiedlichen Untersuchungen die g⁻g⁻ Konformation als die wahr-

terpretiert werden, in dem die gehinderte Rotation um die C-C_{Ring}-Bindung als Ursache für das Rückstellpotenzial angesehen wird. Die C-S_δ-Bindung hingegen wird mit dem Direktor des Ordnungspotenzials identifiziert, um die ungehinderte Rotation stattfinden kann. Zudem stimmt der Winkel zwischen der C-S_δ Bindung und dem p-Orbital des Nitroxids in der g⁻g⁻ Konformation mit dem Wert von 36° überein [21], der im Zuge der Linienformanalyse als charakteristische Kippwinkel zwischen Direktorachse und magnetischer z-Achse (der Achse des Stickstoff p-Orbitals) identifiziert wurde. Auf der Basis dieser Zuordnung können die berechneten Ausrichtungen des Direktors des Potenzials der Bewegung mit der Orientierung der C-S_δ-Bindung der Seitenkette an den untersuchten Stellen gleichgesetzt und somit in die Orientierungen der entsprechenden Helices übersetzt werden. Dies erfolgt durch einen least-square Fit der Winkel zwischen der C-S_δ-Bindung von R1 an den reinen Helixoberflächenstellen 72, 76 und 131 und der Oberflächennormale. Unter Berücksichtigung beider Konformationen (g⁻g⁻g⁻) und (tg⁺g⁺) werden so je zwei Werte pro markierter Stelle erhalten. In Tabelle 5.3 sind die Werte der Orientierung der Direktorachsen angegeben, die sich bei einem globalen Fit über alle sechs Konformationen ergeben.

Hier wird deutlich, dass die beiden Konformationen in vielen Fällen ähnliche Werte für ζ liefern. Dies ergibt sich aus der Koinkidenz der C γ -Position von R1, die für viele Helixorientierungen in ähnlichen Werten für ζ resultiert. In diesem Modell werden Abweichungen um 10-15° zwischen berechneten und beobachteten Winkeln als nicht signifikant angesehen, da z.B. idealisierte Diederwinkel verwendet werden, obwohl die Kristallstrukturen eine Streuung um die angegebenen Werte zeigen, was Fehler in dieser Größenordnung produziert. Einige der berechneten Kippwinkel weichen jedoch drastischer von den gemessenen Winkeln ab. Dies weist auf einen geringen Anteil der entspre-

Position	Ergebnis ESR [°]	Modell g ⁻ g ⁻ [°]	Modell tg ⁺ [°]
61 (Komp. 2)	60 ± 20	50	54
72	50 ± 5	58	61
76	90 ± 5	83	<i>61</i>
109 (Komp. 1)	42 ± 5	49	<i>62</i>
131	73 ± 5	<i>52</i>	60

Tabelle 5.3: Anpassung der Orientierungen der C-S_δ-Bindungen von R1 in den angegebenen Stellen von T4L, die sich aus den zwei Konformationen der spinmarkierten Seitenkette ergeben, an die Werte, die aus der Simulation der ESR-Spektren berechnet wurden. Nicht berücksichtigte Konformationen sind kursiv dargestellt.

chenden Konformation hin, so dass diese, kursiv dargestellten, Werte in Folge nicht berücksichtigt werden. Es muss dazu erwähnt werden, dass selbst unter Berücksichtigung dieser Werte nur eine um 10° abweichende Orientierung des Proteins erhalten wird. Zudem soll daran erinnert werden, dass die Analyse von 72R1 eine polare Unordnung der adsorbierten Proteine ergab. An dieser Stelle kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der spektralen Breite, die als Unordnung der Proteine interpretiert wurde, einer gleichzeitigen Besetzung der beiden Konformationen zuzuschreiben ist. Die Orientierung des Proteins kann bereits auf der Basis dieser drei Helixoberflächenstellen erfolgen, da die markierten Helices C und H nahezu senkrecht aufeinander stehen.

Die Analyse der N-terminalen helicalen Stellen ist aufgrund der Existenz zweier unterschiedlicher Komponenten der Bewegung und der abweichenden Werte für β_D der zweiten Komponente komplizierter. Hier werden die mittels des Parameters β_D von 36° als ähnlich zu Helixoberflächenstellen klassifizierten Komponenten zur Verifizierung der Proteinorientierung verwendet. Trotz des großen Fehlerbalkens des berechneten Kippwinkels ζ kann die Analyse von 61R1 als Bestätigung der Orientierung der Helix C gewertet werden, die bereits aus der Analyse von 72R1 und 76R1 gewonnen wurde.

Demgegenüber wurde der Polarwinkel ζ an der Stelle 109 mit einer wesentlich größeren Genauigkeit bestimmt. Zudem steht hier die C-S $_{\delta}$ -Bindung der Seitenkette paarweise senkrecht auf den Richtungen, die durch die bisher untersuchten Reste an 131, 76 und 72 vorgegeben wird, und erlaubt damit eine exaktere Bestimmung der Proteinkonformation auf der Oberfläche. Wie Tabelle 5.3 anzeigt, wird auch unter Einbeziehung dieser Mutante ein konsistentes Bild erhalten. Abbildung 5.12 illustriert die somit berechnete Proteinorientierung auf der Oberfläche. Sie entspricht einer nahezu symmetrischen Anordnung des ellipsoidalen Proteins auf der Oberfläche. Dabei ist die N-terminale Domäne eher in die Lösung orientiert als die C-terminale Domäne. Der Abstand zwischen Protein und Oberfläche, der in Abbildung 5.12 eingezeichnet ist, ist zufällig gewählt, da hierüber in dieser Arbeit keine Informationen erhalten wurden.

Es muss betont werden, dass die konsistente Interpretation der Kippwinkel des Ordnungspotenzials des Simulationsmodells mit der Orientierung der spinmarkierten Seitenkette an den verschiedenen Stellen des Proteins nicht trivial ist. Die dargestellte Analyse basiert hauptsächlich auf dem X4/X5 Bewegungsmodell, das in vorhergehenden Untersuchungen vorgeschlagen wurde. Daher liefert die vorliegende Arbeit nicht nur das Werkzeug zur Bestimmung der Orientierung adsorbierter Proteine, sondern stellt ein weiteres wesentliches Argument für die molekulare Interpretation des abstrakten mathematischen Bewegungsmodells im Rahmen des X4/X5 Bildes dar.

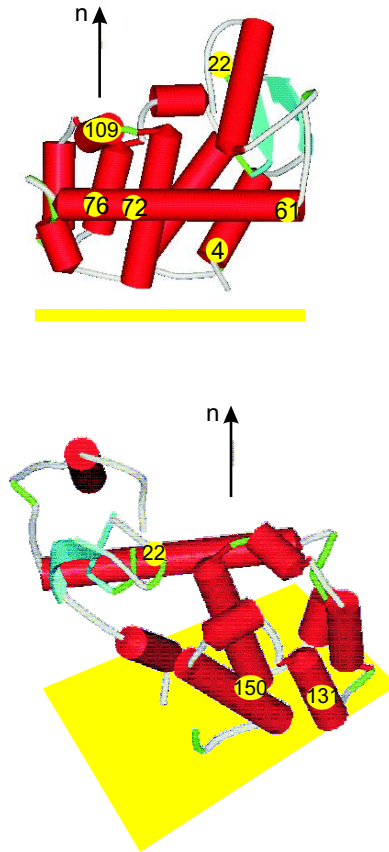


Abbildung 5.12: Orientierung von T4L auf der zwitterionischen Lipidoberfläche.

Abschließend soll der Frage nachgegangen werden, wodurch die analysierte makroskopische Orientierung der Proteine auf der Oberfläche hervorgerufen wird. Hierfür werden die Proteinorientierungen von 72R1 verglichen, die aus der Anbindung über den Nickelkomplex bzw. über das Fusionsprotein mit Annexin resultieren. Die deutliche Verbreiterung der Verteilungsfunktion der Oberflächenorientierungen nach Adsorption über das Fusionsprotein, welches eine laterale Separation der T4L Moleküle auf der Oberfläche sicherstellt, weist auf die Bedeutung des dichten Packens der adsorbierten Proteine unter lateralem Kontakt für die beobachtete Ausrichtung der vektoriell angebotenen Proteine auf der Lipidoberfläche hin. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass auch die Adsorption einer unvollständigen

Monolage auf der chelatisierenden Lipidoberfläche sich in einer vergrößerten azimuthalen Unordnung niederschlägt.

Neben der vergrößerten polaren Unordnung findet man für das Fusionsprotein aber auch einen veränderten Kippwinkel ζ von 70° , anstelle der 50° , die im Falle der komplexierenden Anbindung auftreten. Dies könnte zum einen in der veränderten Wechselwirkung mit der Unterlage begründet sein, da T4L bei Adsorption über das Fusionsprotein nicht mehr mit einer Phosphatidylcholinoberfläche sondern mit einem zweidimensionalen Gitter von Annexin in Kontakt steht. Zum anderen können Packungseffekte auch die Vorzugsrichtung der Proteine beeinflussen. Somit illustriert dieser Vergleich mit Situationen weniger dicht gepackter Proteine, dass die makroskopische Orientierung von T4L nach vektorieller Anbindung auf der Oberfläche zu einem großen Teil durch das dichte Packen der Moleküle auf der Oberfläche hervorgerufen wird.

5.4 Zusammenfassung

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit besteht in der Erarbeitung der Möglichkeiten, welche die ESR-Spektroskopie bietet, um die Struktur und Dynamik adsorbierter Proteine zu untersuchen. Hierfür wurde in einem ersten Schritt nach spezifischer vektorieller Immobilisierung von T4 Lysozym an einer planaren Oberfläche die Struktur und Orientierung des Proteins an einer wohldefinierten, biomimetischen Grenzfläche untersucht. Mittels eines Modells vektoriell angebundener Proteine wurde die quantitative Linienformanalyse der ESR-Spektren auf der Basis der stochastischen Liouvillegleichung (SLE), die in der Vergangenheit bereits zur Analyse von Proteinen in Lösung Anwendungen fand, um die Beschreibung adsorbierter Proteine erweitert. Hier zeigt sich, dass die cw-X-Band ESR-Spektroskopie im Rahmen dieser Analyse eine Empfindlichkeit aufweist, welche die Verfolgung geringfügiger Veränderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur einer Monolage adsorbierter Proteine erlaubt.

Weiterhin wurde auf der Basis der SLE-Simulationen ein Modell entwickelt, das die Bestimmung der Orientierung der adsorbierten Proteine aus den ESR-Spektren ermöglicht, die unter Variation des Winkels zwischen Magnetfeld und Oberflächennormale aufgenommen wurden. Da die Orientierung von Proteinen relativ zu Oberflächen eine entscheidende Information auch vieler physiologischer Prozesse, z.B. Membranprozesse, darstellt, diese jedoch mangels geeigneter Messmethoden nur selten bestimmt werden kann, sollte diese Weiterentwicklung der ESR-Spektroskopie den Zugang zu einer Reihe wertvoller biophysikalischer Informationen eröffnen.

Schließlich ist eine Korrelation der molekularen Bewegung der spinmarkierten Seitenkette mit dem verwendeten Simulationsmodell für die Weiterentwicklung der Methode des Site-directed Spin Labeling von entscheidender Bedeutung. Die Analyse der winkelabhängigen ESR-Spektren dieser Arbeit liefert aufgrund der konsistenten Beschreibung der großen Datenbasis winkelabhängiger Spektren ein weiteres entscheidendes Argument für das in der Literatur vorgeschlagene X4/X5 Bewegungsmodell.

Gegenstand zukünftiger Untersuchungen soll die Anwendbarkeit weiterer Methoden des SDSL auf adsorbierte Proteine sein. Im Zentrum des Interesses stehen dabei alternative Methoden zur Bestimmung der Orientierung adsorbierter Proteine. Hierbei besteht ein Weg in der Weiterentwicklung der Analyse des Interspinvektors zweifach markierter Proteine. Die Analyse der Doppelmutante 22R1-109R1 in diesem Kapitel weist darauf hin, dass hierbei möglichst rigide Stellen des Proteins verwendet werden sollten, an denen sich die spinmarkierte Seitenkette in der klassischen helicalen Konformation befindet.

Kapitel 6

Adsorption an einer Quarzoberfläche

Nachdem im Kapitel 5 die Konformation von T4 Lysozym (T4L) im Ausgangszustand der sehr schwachen Wechselwirkung mit der Oberfläche detailliert charakterisiert wurde, sollen nun die strukturellen Veränderungen des Modellproteins bei Adsorption auf einer Oberfläche untersucht werden, von der eine beträchtliche Wechselwirkung mit adsorbiertem T4L erwartet wird. Hierfür wird die polare und negativ geladene Quarzoberfläche gewählt. Im Gegensatz zu biologischen Oberflächen ist diese Oberfläche rigide, so dass auch die Ladungsträger nicht in der Grenzflächenebene beweglich sind. Die Ladungsdichte bei pH 7 beträgt $4.6 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ [30]. Dies entspricht 0.4 Ladungen pro 1 nm^2 .

Die Quarz/Wasser-Grenzfläche stellt ein geläufiges Modellsystem zum Studium der Adsorption von Proteinen an Festkörperoberflächen dar. Als zentraler Parameter dient hier zumeist die adsorbierte Masse. Strukturellen Veränderungen von T4 Lysozym im Zuge der Adsorption an Quarzoberflächen wurde bisher durch Messung des zirkularen Dichroismus von T4 Lysozym in einer Dispersion kolloidaler Quarzpartikel nachgegangen [9]. Hierbei wurde global eine Verringerung des Anteils von α -Helices um 18% bei Adsorption ermittelt. Zudem wurde eine um eine Größenordnung niedrigere enzymatische Aktivität der adsorbierten Proteine im Vergleich zu den ungestörten Proteinen gefunden [9]. Beides weist auf gravierende strukturelle Veränderungen in T4L nach Wechselwirkung mit Quarzoberflächen hin. Die Art dieser Änderung sowie die Struktur des adsorbierten Proteins bleiben jedoch weiterhin unbekannt.

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Wechselwirkung zwischen T4L und der Quarzoberfläche auf die Struktur des adsorbierten Proteins wird im Folgenden die ESR-spektroskopische Strukturanalyse um den Fall struk-

turell stark veränderter adsorbierter Proteine erweitert. Hierfür werden die acht Einzelmutanten von T4L untersucht, die bereits zur Untersuchung der Adsorption an der neutralen Lipiddoppelschicht verwendet wurden (s. Kapitel 5.2, Abbildung 5.3). Die Charakteristika der markierten Stellen wurden dort erläutert.

6.1 Das Adsorptionsverhalten von T4L auf einer Quarzoberfläche

6.1.1 Analyse der adsorbierten Proteinmenge

Im Gegensatz zu der Adsorption über die spezifische Wechselwirkung der $(\text{His})_6$ -T4L Proteine mit der chelatisierenden Lipidkopfgruppe, zeigt sich bei der Adsorption des Proteins auf der Quarzoberfläche eine Abhängigkeit der adsorbierten Masse von der angebotenen Proteinkonzentration. Die Adsorption des Proteins erfolgte in einem Puffer mit einer Ionenstärke von 500 mM (vgl. Kapitel 3). Wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, kann die Spindichte auf der Oberfläche aus der integralen Intensität der ESR-Spektren der Adsorbate nach geeigneter Eichung gewonnen werden.

Abbildung 6.1 zeigt den so ermittelten Verlauf der adsorbierten Proteinmenge in Abhängigkeit der Proteinkonzentration in Lösung. Auf der rechten Achse sind die berechneten Massendichten derart in Werte für Oberflächenbedeckungen Θ übersetzt, dass eine Monolage der vollständigen Bedeckung der neutralen Lipidoberfläche entspricht, wie sie in Kapitel 5 definiert wurde. Um diese Bedeckungswerte als absolute Skalierung verwenden zu können, muss die Adsorptionskonformation auf beiden Oberflächen identisch sein, so dass die Skalierung in Θ zunächst nur vergleichenden Wert hat.

Trotz der Streuung der Messwerte wird deutlich, dass die adsorbierte Menge zunächst bei Bedeckungen unterhalb $\Theta \approx 1$ steiler anwächst als bei höheren Bedeckungen. Es muss erwähnt werden, dass die dargestellten Adsorptionsdaten von verschiedenen Mutanten erhalten wurden, die in Abbildung 6.1 durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet sind. Dabei wird deutlich, dass die verschiedenen Cysteinmutationen sich nicht einheitlich verhalten. So fällt insbesondere eine ungewöhnlich hohe Adsorptionstendenz von 22R1 auf. Die Adsorption von T4 Lysozym an der Quarzoberfläche ist zum Teil reversibel. Dies wird in den ESR-Spektren der adsorbierten Proteine durch ein zeitlich ansteigendes scharfes Signal sichtbar, das durch Spülen mit Puffer entfernt werden kann. Es wird desorbiertem Protein zugeordnet, da T4L in Lösungen, die keine Sucrose enthalten, um die Molekülachsen des Proteins rotieren kann. Dann trägt die Rotation des Proteins neben der Bewegung der

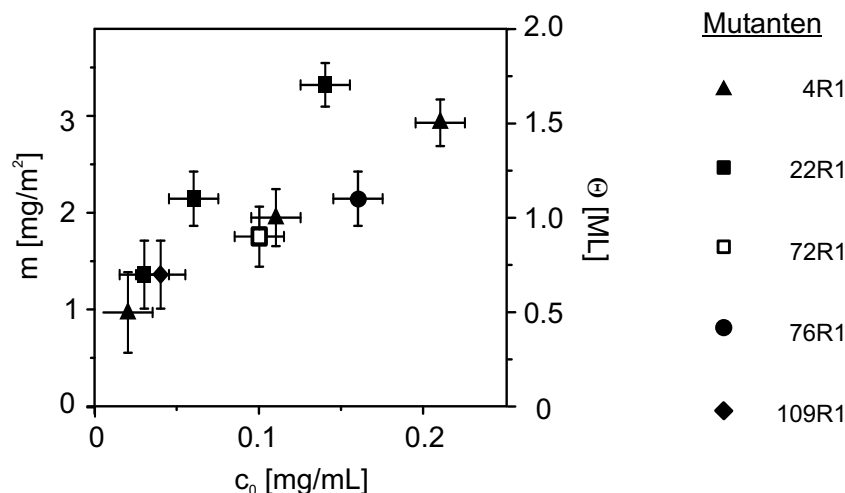


Abbildung 6.1: Konzentrationsabhängigkeit der adsorbierten Proteinmenge. Auf der rechten Achse ist die Bedeckung in Monolagen (ML) angegeben. Hier wird eine Monolage durch die Bedeckung der neutralen Lipidschicht (vgl. Kapitel 5) definiert. Datenpunkte der verschiedenen Mutanten sind durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

spinmarkierten Seitenkette zur dynamischen Mittelung des ESR-Signals bei und führt zu schärferen Linien (s. Kapitel 2). Somit lässt sich aus der zeitabhängigen Verfolgung des entstehenden scharfen Signals durch Messung der peak-to-peak-Höhe der zentralen Linie die Kinetik des Desorptionsprozesses verfolgen. Aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der Spektren adsorbierter Proteine müssen eine Vielzahl von Spektren zur Aufnahme eines ESR-Spektrums akkumuliert werden. Dies begrenzt die Zeitauflösung der Methode beträchtlich. So benötigte die Spektrenaquisition in dem in Abbildung 6.2 dargestellten Fall ca. 170 min. Die somit bestimmte Abnahme der Bedeckung mit der Zeit ist in Abbildung 6.2 für die Mutante 109R1 aufgetragen. Indem trotz der langen Messzeit eine Kinetik beobachtet werden kann, wird ersichtlich, dass die Desorption auf ähnlich großen Zeitskalen abläuft. Die in Abbildung 6.2 dargestellte Kurve stellt einen Fit unter Annahme einer Kinetik erster Ordnung gemäß

$$\Theta(t) = \Theta_{\infty} + \Theta_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (6.1)$$

dar. Obwohl mehr Wert auf die prinzipielle Gestalt der Kinetik als auf den absoluten Wert der Geschwindigkeitskonstanten gelegt werden soll, ergibt der Fit hierfür 0.0033 min^{-1} . Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das System, nachdem die überstehende Proteinlösung mit Puffer ersetzt

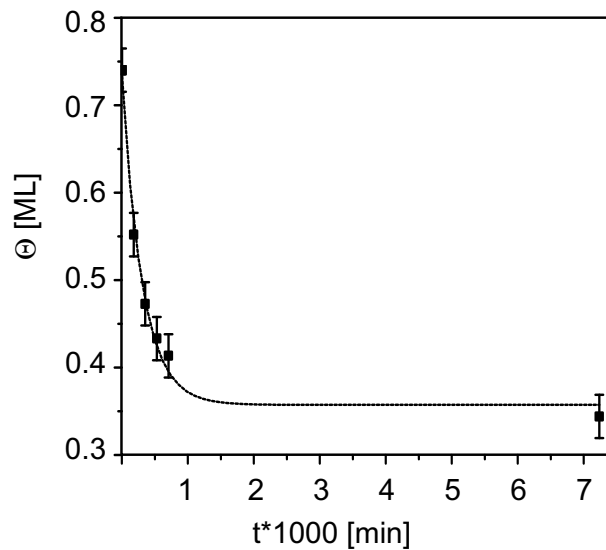


Abbildung 6.2: Desorption von 109R1 nach Adsorption auf der Quarzoberfläche. Die eingezeichnete Kurve zeigt den monomolekularen Fit.

wurde, sich nach ca. 300 min bis auf Θ_0/e der neuen Belegung angenähert hat und somit nach ca. 900 min einen neuen stationären Zustand erreicht. Dies entspricht in dem dargestellten Fall einer Verringerung der Bedeckung von 0.75 ML auf 0.35 ML.

6.1.2 Diskussion des Adsorptions- und Desorptionsverhaltens

Aus Abbildung 6.1 ergibt sich, dass die adsorbierte Proteinmasse weder nahezu unabhängig von der angebotenen Proteinkonzentration ist – wie im Fall der neutralen, chelatisierenden Lipiddoppelschicht – noch werden Hinweise auf eine Kooperativität der Adsorption gefunden. Vielmehr sinkt die Affinität der Oberfläche zu Proteinen in Lösung mit steigender Bedeckung. Dies deutet darauf hin, dass die Wechselwirkung zwischen Quarzoberfläche und T4L größer ist als diejenige zwischen adsorbiertem und gelöstem Protein. Ähnliches wurde bereits von Lee et al. bei ellipsometrischer Analyse der auf Siliziumdioxid adsorbierten Masse an T4 Lysozym bei geringen Ionenstärken (10 mM Phosphatpuffer, pH 7) beobachtet [68]. Auch dort wurde ein steilerer Anstieg der Kurve der lösungskonzentrationsabhängigen adsorbierten Masse für geringe Konzentrationen gefunden, während die Adsorption aus Lösungen höherer Konzentrationen in einen Sättigungswert von ca. 1.8 mg/m² mündet

(dies entspricht in der verwendeten Notation für die Bedeckung 1 ML). Eine Sättigung der Oberfläche wäre auch konsistent mit dem in Abbildung 6.1 dargestellten Adsorptionsverhalten, kann jedoch aufgrund der Streuung der Messwerte nicht aus den dargestellten Daten extrahiert werden. Die untere Schranke für einen derartigen Sättigungswert beträgt hier mit ca. 1.5 ML allerdings mehr als 1 ML.

Die Streuung der aufgenommenen Adsorptionsdaten muss im Zusammenhang mit der Verwendung unterschiedlicher Mutanten diskutiert werden. Einerseits kann eine unterschiedliche Ausbeute der Markierungsreaktion zu einer Streuung der Messwerte führen. Die Schwankungen ergeben für Stellen, die dem Lösungsmittel leicht zugänglich sind, einen Fehler der ESR-Intensität von ca. 10% (vgl. Kapitel 5.1). Alle für Abbildung 6.1 verwendeten Mutanten außer 4R1 befinden sich an derartigen Stellen. In letzterer steht R1 nach der Analyse in Kapitel 5.3.1 in Kontakt mit benachbarten Seitenketten. Daher könnte die Ausbeute der Markierungsreaktion von 4C gegenüber den übrigen leicht erniedrigt sein. Hierfür finden sich jedoch keine Anzeichen, da der Intensitätsverlauf von 4R1 in Abbildung 6.1 keine Abweichung nach unten zeigt. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass für elektrostatische bzw. hydrophobe Wechselwirkungen ein Austausch geladener oder hydrophober Seitenketten durch die polare, aber ungeladene Nitroxidseitenkette von Bedeutung sein kann. Im Falle der Mutanten F4R1 und V131 R1, I150R1 wurden hydrophobe, für R76R1 positive bzw. E22R1, D61R1 und D72R1 negativ geladene Seitenketten ersetzt. Im Vergleich fällt lediglich 22R1 durch eine erhöhte Adsorptionstendenz auf. Diese Mutante trägt eine um eins gegenüber dem natürlichen T4 Lysozym reduzierte Nettoladung. In ellipsometrischen Untersuchungen der Adsorption von T4L-Mutanten unterschiedlicher Nettoladung bei niedrigen Ionenstärken (10 mM Phosphatpuffer) fanden McGuire et al. keine einfache Korrelation zwischen der Affinität der Mutanten zur Oberfläche und der Nettoladung der Mutanten [89]. Die Autoren interpretieren dies in einem Modell dominierender elektrostatischer Wechselwirkung, in dem die mobilsten geladenen Seitenketten des T4L zur Interaktion mit der Oberfläche herangezogen werden. In dem Modell von McGuire et al. befindet sich 22 auf der Seite des Proteins, die mit der Quarzoberfläche in Kontakt tritt [90]. Daher sollte in dem Modell vorherrschender elektrostatischer Wechselwirkungen eine erniedrigte Adsorption von E22R1 beobachtet werden. Die Beobachtung einer erhöhten Adsorption von 22R1 in der vorliegenden Arbeit spricht gegen eine Gültigkeit des vorgeschlagenen Modells unter den hier gewählten Bedingungen hoher Ionenstärke. Diesem Modell widerspricht weiterhin, dass bei Erhöhung der Nettoladung auf der „Vorderseite“ durch Mutation der Stellen 61 und 76 keine erhöhte Adsorption erhalten wird. Somit werden im Rahmen dieser Arbeit unter hohen Ionenstärken

keine Hinweise gefunden, die im Zusammenhang mit dem Modell vorherrschender elektrostatischer Wechselwirkungen zu erklären wären. Die starke Streuung der adsorbierten Mengen verweist trotzdem auf einen Einfluss der veränderten Proteinoberfläche durch R1 auf die Adsorption von T4L, ohne dass dies einem einfachen Modell der Wechselwirkung zwischen Protein und Oberfläche zugeordnet werden kann. Es wird somit deutlich, dass eine Aufklärung der Wechselwirkungskonformation direkter struktureller Informationen über das adsorbierte Protein bedarf. Daher wird auf die Diskussion der ESR-spektroskopischen Charakterisierung der Proteinkonformation im adsorbierten Zustand im folgenden Abschnitt verwiesen.

Die Kinetik der Desorption lässt sich im Rahmen einer Langmuirschen Adsorption beschreiben. In Arbeiten zur tensidinduzierten Desorption, die bei sehr niedrigen Ionenstärken durchgeführt wurden, ergaben sich für die Elution mit Puffer bzw. mit Tensid verschiedene Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten. Hieraus wurde auf die Existenz dreier Oberflächenspezies geschlossen, die jeweils (a) labil gegenüber Puffer, (b) labil gegenüber Tensid und (c) irreversibel gebunden sind [68]. Die monomolekulare Kinetik, die in dieser Arbeit gefunden wurde, steht trotzdem nicht im Widerspruch zu der Annahme dreier Oberflächenspezies, da hier lediglich die Labilität gegenüber der Elution mit Puffer untersucht wurde. Das Ergebnis einer Langmuirschen Kinetik weist darauf hin, dass die desorptionslabilen Spezies ähnliche Adsorptionsplätze belegen und keine wesentliche Wechselwirkung untereinander eingehen. McGuire et al. haben zur Erklärung der erwähnten kinetischen Befunde einen Adsorptionsmechanismus vorgeschlagen, in dem T4L zunächst in der nativen Konformation adsorbiert. In diesem Zustand ist es desorptionslabil gegenüber Spülen mit Puffer. Strukturelle Veränderungen führen dann zur Ausbildung einer irreversibel gebundenen Schicht. Somit wird deutlich, dass das in dieser Arbeit beobachtete Desorptionsverhalten mit nativen und strukturell veränderten adsorbierten Spezies erklärt werden kann. Für ein weitergehendes molekulares Verständnis sind auch an dieser Stelle strukturelle Informationen unabdinglich.

6.2 Untersuchung der Oberflächenstruktur von T4 Lysozym

6.2.1 Die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche

Für alle untersuchten spinmarkierten Mutanten wurden ESR-Spektren unter mindestens zwei Winkeln zwischen der Oberfläche und dem externen Magnetfeld aufgenommen. Die Beobachtung einer Winkelabhängigkeit der Linienform ist jedoch durch die Desorption des Proteins nach Entfernen der überstehenden Proteinlösung erschwert, da nach Abbildung 6.2 im Verlauf der Messzeit bereits Spezies in die Lösung desorbieren und so die Linienform der ESR-Spektren verfälschen. Es wurde versucht, diesen Effekt durch Reduzierung der Messzeit unter Akkumulation von lediglich 500 Spektren auf 85 min zu minimieren. In keinem Fall ließ sich eine signifikante Veränderung der Linienform unter Variation des Winkels feststellen. Somit wird in der Folge davon ausgegangen, dass T4L auf der Quarzoberfläche keine makroskopische Ordnung zeigt.

6.2.2 Die Sekundär- und Tertiärstruktur des adsorbierten T4 Lysozyms

Die Linienformanalyse der ESR-Spektren des adsorbierten T4 Lysozyms wird qualitativ vorgenommen. Dies erfolgt, da die ESR-Spektren des adsorbierten Proteins keine Winkelabhängigkeit zeigen, durch den direkten Vergleich der auf der Quarzoberfläche erhaltenen ESR-Spektren mit den in Lösung gewonnenen.

Aus Abbildungen 6.3, 6.5 und 6.6 wird ersichtlich, dass die Linienformen der ESR-Spektren der T4L-Mutanten, in denen sich R1 in der N-terminalen Domäne befindet (4R1 und 22R1), sich deutlicher verändern als jene von Spinsonden in der C-terminalen Seite (Domäne II). Daher werden diese zwei Gruppen von Spektren gesondert analysiert.

6.2.2.1 Domäne I

Die ESR-Spektren, die nach Markierung der N-terminalen Helix A (4R1) bzw. des Loops an der Stelle 22 erhalten wurden, zeigen eine Abhängigkeit der Linienform von der Bedeckung der Oberfläche mit adsorbiertem Protein. Daher sind in Abbildung 6.3 die ESR-Spektren von adsorbiertem 22R1 und 4R1 für je drei Bedeckungen (im Submonolagen-, Monolagen- und Zweilagengebiet) dargestellt. Hier sei bereits bemerkt, dass der in unterschiedlichem

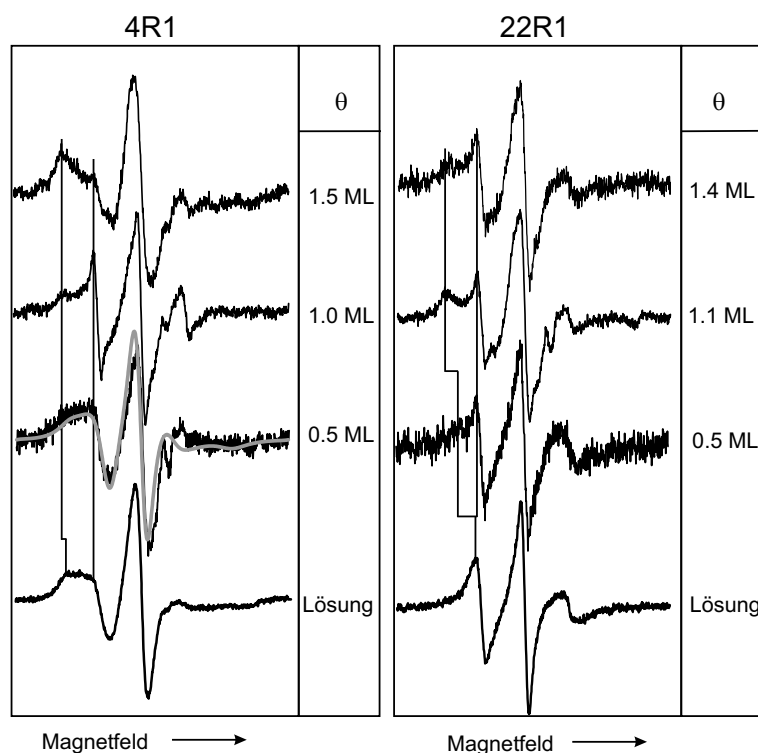


Abbildung 6.3: ESR-Spektren der Mutanten in der N-terminalen Domäne nach Adsorption auf Quarz in verschiedenen Bedeckungen im Vergleich zu den Spektren in Lösung. Die Scanbreite beträgt 100 G. Die helle Kurve zeigt einen Fit mittels des Modells nach Freed et al. unter Verwendung der dynamischen Parameter des Lösungsspektrums (s. Text).

Ausmaße auftretende scharfe Peak in der Hochfeldflanke der zentralen Linie einem Störsignal des Quarzes zugeordnet wird (vgl. Kapitel 3).

Die ESR-Spektren von 4R1 und 22R1 bei Monolagenbedeckung zeigen starke Ähnlichkeiten. Wie Abbildung 6.3 deutlich macht, sind die entsprechenden Spektren des nativen Proteins jedoch deutlich unterschiedlich. Somit weichen die Spektren der adsorbierten Proteinmonolage von 4R1 und 22R1 jeweils drastisch von denen des nativen Proteins ab. Die Spektren der adsorbierten Spezies enthalten sowohl sehr breite als auch sehr schmale Linien. Dabei ist die Linienbreite der scharfen Komponente geringer als im Spektrum des relativ mobilen nativen 22R1, wie insbesondere in der Linienbreite des Hochfeldpeaks sichtbar wird. Genauso ist die sehr breite Komponente gegenüber dem Spektrum des nativen, relativ immobilen 4R1 weiter verbreitert, wie die Hilfslinien in Abbildung 6.3 im Tieffeldpeak verdeutlichen. Diese Ver-

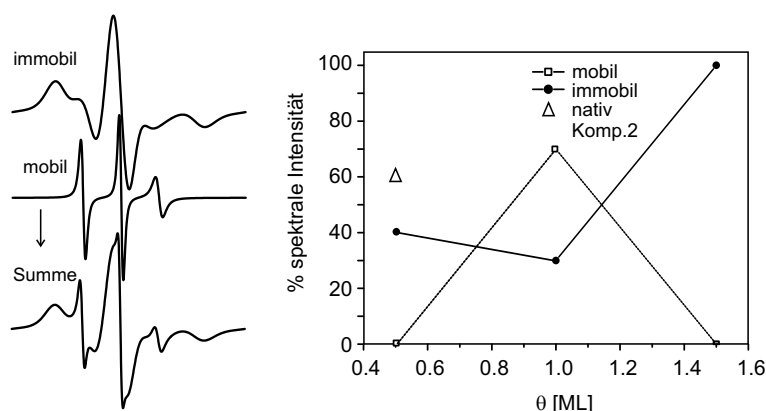


Abbildung 6.4: Links: Schematische Darstellung eines ESR-Spektrums aus einer sehr scharfen und einer breiten Komponente. Rechts: Verlauf der beiden Komponenten in den Spektren von 4R1 mit der Bedeckung.

breiterung läßt sich ebenso in einer breiten Komponente der zentralen Linie nachvollziehen. Schematisch ist eine derartige Superposition einer sehr scharfen und einer sehr breiten Komponente zu der beobachteten Linienform in Abbildung 6.4 (links) illustriert.

Die scharfe Komponente ist der Linienform des freien Spinmarkers bereits sehr ähnlich. Damit zeigt sie die Anwesenheit sehr mobiler spinmarkierter Seitenketten an, deren Beweglichkeit nahezu unbeeinflusst von einer Wechselwirkung mit einem Proteinrückgrat bleibt. Die breite Komponente kann, ohne dass hieraus quantitative Informationen gewonnen werden sollen, im Rahmen des Programms nach Freed und Mitarbeitern (s. Kapitel 5) durch Spezies mit Bewegungsfrequenzen nahe des starren Grenzfalles ($2.5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$) reproduziert werden. Damit reflektiert diese Komponente die gleichzeitige Entstehung stark immobilisierter spinmarkierter Seitenketten bei Adsorption von 4R1 und 22R1 auf der Oberfläche.

Es kann somit festgehalten werden, dass die Linienformen von 4R1 und 22R1 nach Adsorption auf der Quarzoberfläche durch die Existenz extremer, gegensätzlicher Bewegungsmoden charakterisiert werden.

Die Hilfslinien in Abbildung 6.3 illustrieren, dass die Anteile der beschriebenen Komponenten an den ESR-Linienform mit der Proteinbedeckung der Oberfläche für 4R1 und 22R1 in unterschiedlicher Weise variieren. Bei Adsorption von 0.5 ML 22R1 sind die beschriebenen Charakteristika des Spektrums bei 1.1 ML noch nicht voll ausgeprägt. Die Breite des Spektrums ist gegenüber dem nativen nur leicht erhöht. Ebenso ist die innere Komponente noch nicht so scharf wie im diskutierten Spektrum der Monolagenbedeckung.

Des Weiteren ist hier die ESR-Linienform mit einem spektralen Anteil von bis zu 60% der Linienform des nativen Protein vereinbar, während dieser Anteil im Spektrum bei 1.1 ML nur 10% beträgt. Bei weiterer Adsorption wird die Linienform nicht mehr wesentlich verändert.

Die Linienform von 4R1 variiert noch stärker mit der Bedeckung als im Falle des 22R1. Im Submonolagenbereich zeigt das ESR-Spektrum von adsorbiertem 4R1 noch weitgehende Ähnlichkeit mit dem Spektrum des nativen Proteins. In Kapitel 5.2.2 wurde die Linienform des Spektrums des nativen 4R1 im Rahmen der quantitativen Analyse mittels zweier - im Vergleich zu Helixoberflächenstellen - immobilisierter Komponenten beschrieben. Wie der Fit in Abbildung 6.3 zeigt, erlauben diese Parameter eine Beschreibung der Linienform von 4R1 nach Adsorption auf der Quarzoberfläche in Submonolagenbedeckung, wenn das Verhältnis von mobilerer zu immobilere Komponente von 20/80 auf 60/40 erhöht wird. Es sei daran erinnert, dass eine derartige Verschiebung, wenn auch in geringerem Ausmaße, bereits bei Adsorption von T4L auf der neutralen Modellmembran beobachtet wurde (vgl. 5).

Erst bei Adsorption einer Proteinmenge im Bereich einer Monolage wird ein scharfes Signal beobachtet. Der Verlauf der mobilen und immobilen Anteile in den Spektren bei steigender Bedeckung ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Hierfür wurden aus dem Spektrum bei $\Theta = 1$ die Linienformen der unterliegenden Komponenten extrahiert und zur Modellierung der Spektren bei den anderen Bedeckungen verwendet. Dabei hat die immobile Komponente große Ähnlichkeit mit derjenigen im Spektrum des nativen Proteins. Daher entspricht ihr Anteil im Submonolagenbereich dem anhand des Fits berechneten. Die mobile Komponente existiert hier nicht, sondern wächst erst bei weiterer Bedeckung an. Bei Überschreiten der Monolagenbedeckung überwiegen dann die stark immobilen Anteile.

6.2.2.2 Domäne II

In Abbildung 6.5 und 6.6 sind die ESR-Spektren von T4L, das an verschiedenen Stellen in der C-terminalen Domäne spinmarkiert wurde, nach Adsorption des Proteins auf der Quarzoberfläche im Vergleich zu denjenigen des nativen Proteins in Lösung dargestellt. Für keine der in diesem Abschnitt diskutierten Mutanten wird eine Abhängigkeit der Linienform von der Bedeckung gefunden.

Aus den Abbildungen wird ersichtlich, dass die ESR-Linienform keiner Mutante drastischen Veränderungen bei Adsorption des Proteins unterworfen wird, sondern nur kleinere Variationen der Linienform auftreten. Die Spektren von adsorbierten und nativen 76R1 bzw. 131R1 sind vollständig iden-

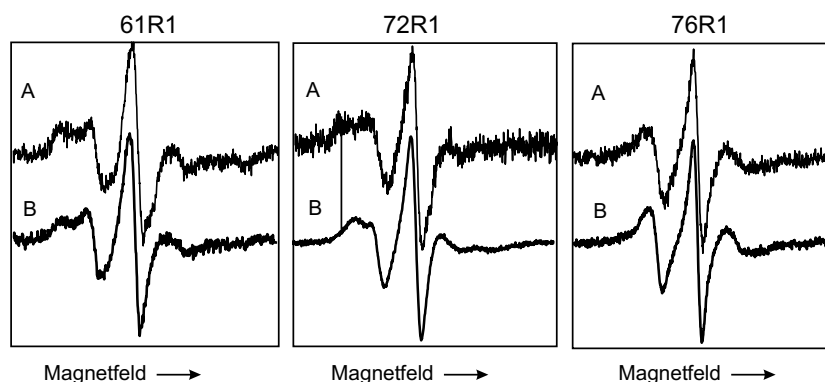


Abbildung 6.5: ESR-Spektren der Stellen in der Helix C (A) nach Adsorption auf der Quarzoberfläche im Vergleich zu den entsprechenden Spektren in Lösung (B). Die Scanbreite beträgt 100 G.

tisch. Wie die Hilfslinie im Spektrum von 109R1 in Abbildung 6.6 andeutet, wird hier der Tieffeldpeak bei Adsorption leicht verschmälert und verliert dabei seine Doppelpeakstruktur. Die Struktur der Spektren von 61R1 und 72R1, in denen die lange, domänenverbindende Helix C markiert ist, bleibt bei Adsorption erhalten, jedoch erfahren die Signale hier eine signifikante Verbreiterung.

Diese qualitative Betrachtung kann durch Verwendung des von Mchaourab et al. [92] eingeführten semi-quantitativen Parameters der Linienformanalyse, der zentralen Linienbreite, unterstützt werden. Die zentrale Linienbreite wird als Maß für die Mobilität der spinmarkierten Seitenkette verwendet. Obwohl in dieser Betrachtung die Einflüsse von Frequenz bzw. Amplitude der Bewegung auf die ESR-Linienbreite nicht getrennt werden, gelingt mit Hilfe dieses Parameters, wie Mchaourab et al. [92] bzw. Isas et al. [54] zeigen konnten, bereits eine Einordnung des vorliegenden Sekundärstrukturelements. Während die zentrale Linienbreite ein Maß für die mobilen Komponenten des Spektrums ist, wurde zur Parametrisierung der immobilen Komponenten das zweite spektrale Moment [92] bzw. die spektrale Breite als Parameter vorgeschlagen [54]. Aufgrund der Basisliniendrift sowie des limitierten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der hier gezeigten Spektren von Oberflächenspezies ist die Verwendung dieses Parameters für diese Arbeit jedoch nicht sinnvoll. In Abbildung 6.7 sind die entsprechenden peak-to-peak Breiten der zentralen Linie der Spektren der verwendeten Mutanten in der C-terminalen Domäne den entsprechenden Werten von T4L in Lösung gegenübergestellt. Dass die leicht erhöhte Mobilität von 109R1 nicht in signifikantem Maße in der Breite der zentralen Linie reflektiert wird, mag dabei

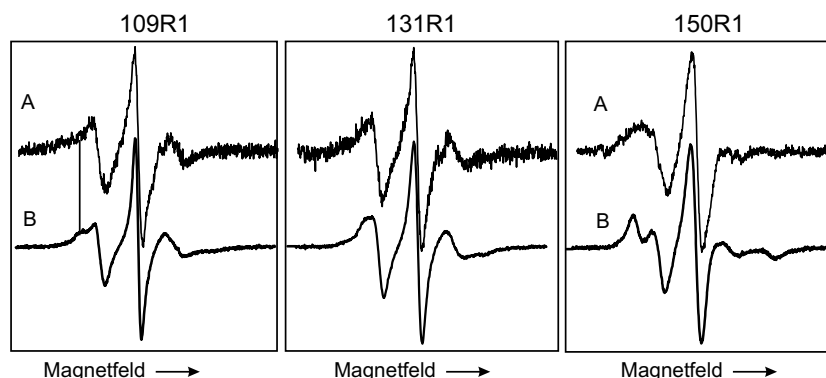


Abbildung 6.6: ESR-Spektren der Mutanten in der C-terminalen Domäne nach Adsorption auf der Quarzoberfläche (A) im Vergleich zu den entsprechenden Spektren in Lösung (B). Die Scanbreite beträgt 100 G.

experimentelle Ursachen haben. So musste eine Modulationsamplitude von 3 G gewählt werden, um ein ausreichendes ESR-Signal zu erhalten. Dies legt jedoch die minimal beobachtbare zentrale Linienbreite auf 3 G, d.h. auf genau den Wert, der für 109R1 gemessen wurde, fest.

Die Linienform des Spektrums der tertiären Kontaktstelle 150, die sich schon nach Adsorption von T4L auf der neutralen Lipiddoppelschicht von der in Lösung aufgenommenen unterscheidet, ist auf der Quarzoberfläche weiter modifiziert. Hier verschwindet die charakteristische Doppelpeak-Form des Tieffeldpeaks, die bereits auf der neutralen Lipidoberfläche verzerrt wurde. Die spektrale Breite bleibt dabei nach einer Abschätzung in einem ähnlichen Bereich wie im Spektrum von 150R1 in Lösung. Ein qualitativer, optischer Vergleich der zentralen Linienbreiten der Spektren der adsorbierten und gelösten Spezies zeigt, dass die gesamte Breite der zentralen Linie von 150R1 bei Adsorption erhöht wird (vgl. Abbildung 6.6). Dass der Parameter der peak-to-peak Breite sich jedoch in den beiden Situationen nicht unterscheidet (s. Abbildung 6.7), lässt sich durch die Existenz verschiedener Komponenten erklären, die der Linienform von 150R1 unterliegen. Dabei zeigt die absolute Verbreiterung der zentralen Linie die Anwesenheit gegenüber der Lösung immobilisierter Spezies, während die konstante peak-to-peak Breite einen Indikator für gleichzeitig vorliegende mobilere Komponenten darstellt. Hier zeigen sich die Schwierigkeiten, die sich aus der ausschließlichen Berücksichtigung des Parameters zentrale Linienbreite ergeben, da auf diese Weise die mobilen Teile des Spektrums sensitiver erfasst werden als die immobilen Anteile.

Dieses Verhalten ändert sich, wenn die Ionenstärke des Puffers bei Ad-

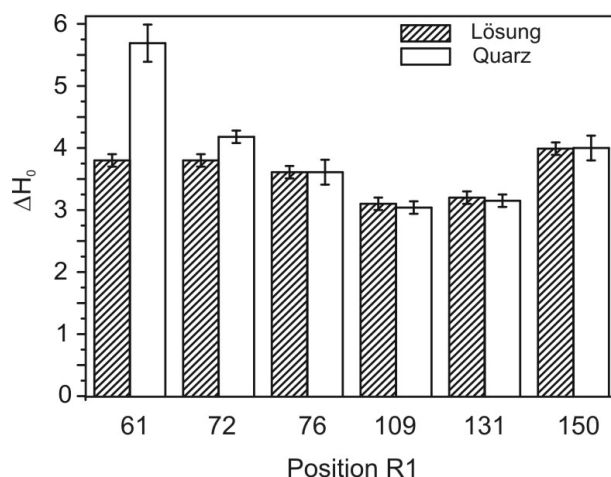


Abbildung 6.7: Vergleich der zentralen peak-to-peak Linienbreiten der Spektren der Mutanten in der C-terminalen Domäne nach Adsorption auf der Quarzoberfläche mit den Werten der Spektren in Lösung.

sorption erniedrigt wird. In einem Referenzexperiment wurde bei Markierung der Stelle 131, die sich in einem Bereich des Proteins mit einer hohen Dichte positiv geladener Seitenketten befindet, nach Adsorption bei einer Ionenstärke von 100 mM eine veränderte ESR-Linienform gefunden. Dieses Spektrum enthält, ähnlich der bei hohen Ionenstärken für 4R1 und 22R1 aufgenommenen Spektren, sowohl mobile als auch immobile Komponenten (s. Abbildung 6.8).

6.2.3 Diskussion der Proteinkonformation bei Adsorption

Die Adsorption des Modellproteins auf der Quarzoberfläche verändert die ESR-Linienformen der Mutanten in der N-terminalen Domäne, 4 und 22, entscheidend. Hierbei wird zum einen die Ausbildung eines sehr mobilen Bewegungsmodus von R1 beobachtet. Der Übergang der ESR-Spektren eines spinmarkierten Proteins in Dreilinienspektren ähnlich dem des freien Spinmarkers wurde in der Literatur bisher als ein Hinweis auf Verlust an Sekundärstruktur gewertet [105], [27]. Dies erklärt sich zum einen aus der erhöhten Mobilität der markierten Proteinsegmente, wenn sie nicht mehr als geordnete Helices oder Faltblätter, sondern in Form von random coils vorliegen. Zum anderen ist es eine Folge der fehlenden Wechselwirkung des Disulfids der spinmarkierten Seitenkette mit dem (entfaltenden) Proteinrückgrat, die im nativen Zustand die Rotation um die Diederwinkel X1 und X2 einschränkt

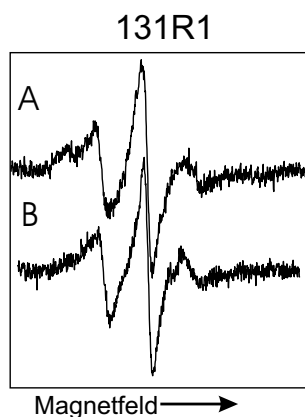


Abbildung 6.8: Vergleich der ESR-Spektren von 131R1 nach Adsorption bei verschiedenen Ionenstärken A) 100 mM, B) 500 mM

[66], vgl. Kapitel 5.3.2.

Loop-Bereiche besitzen ebenfalls keine geordnete Struktur des Proteinrückgrats. Dies spiegelt sich in schmalen ESR-Spektren wider. In den meisten Fällen, wie auch an der Stelle 22, wird die Beweglichkeit von R1 allerdings dadurch eingeschränkt, dass der Loop auf beiden Seiten in eine rigidere Sekundärstruktur mündet, so dass gegenüber dem Spektrum des freien Markers verbreiterte Spektren erhalten werden. Die weitere Zunahme der Mobilität von R1 an der Stelle 22 bei Adsorption auf der Quarzoberfläche kann daher als Indikator für den Verlust an Sekundärstruktur in der lokalen Umgebung angesehen werden. Da der Loop die Stränge β -Faltblatt verbindet, wird auf eine Zerstörung des einzigen β -Faltblattes von T4L geschlossen. Die bedeckungsabhängige Linienformveränderung von 22R1 zeigt hier, dass dies bereits bei Bedeckungen von 0.5 ML eingesetzt hat. Bei Monolagenbedeckung hat diese Umwandlung bereits vollständig in allen Proteinen stattgefunden.

Die Anteile immobilisierten R1, die sich in den Spektren von 22R1 finden, können sich aus Wechselwirkungen von R1 mit der Oberfläche oder mit Seitenketten benachbarter Proteine bzw. desselben Proteins ergeben. Die Ausbildung derartiger Wechselwirkungen wird durch die konformelle Flexibilität entfalteter Proteinsegmente begünstigt. Da diese Anteile in den Spektren von 22R1 bereits bei geringen Bedeckungen auftreten, werden sie hauptsächlich als Indikator für Wechselwirkungen mit der Oberfläche angesehen und weisen somit auf die Beteiligung des entsprechenden β -turns an der Wechselwirkung mit der Oberfläche hin. Dies ist umso wahrscheinlicher, als insbesondere sehr mobile Teile der Proteinstruktur als potentielle Wechselwirkungspartner mit Oberflächen angesehen werden [89]. Eine weitere Reduktion der adsorbier-

ten Menge hin zu isolierten Proteinmolekülen, die eine eindeutige Zuordnung der wechselwirkenden Komponenten zu Protein-Oberflächen- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglichen würden, ist aufgrund der Signalintensitäten leider nicht möglich.

Für 4R1 ist die Situation etwas komplizierter. Hier kann die Linienform des Spektrums von adsorbiertem 4R1 bei den geringsten untersuchten Bedeckungen ($\Theta = 0.5$ ML) weiterhin mit den Bewegungsmoden der spinmarkierten Seitenkette im nativen Protein vereinbart werden. Eine Variation der Linienform durch veränderte Anteile der Komponenten (allerdings in umgekehrter Richtung) wurde bereits in den Spektren von 4R1 bei Adsorption auf der neutralen Lipidoberfläche beobachtet und mit geringen Veränderungen der lokalen Umgebung interpretiert (s. 5.3.1). Damit wird deutlich, dass T4L in geringen Bedeckungen auf der Quarzoberfläche adsorbiert werden kann, ohne dass die N-terminale Helix vollständig zerstört wird. Bei Bedeckungen ab $\Theta = 1$ ML kann analog obiger Argumentation auf eine Entfaltung der Helix A sowie auf Wechselwirkungen dieses Teils mit weiteren Proteinen und der Oberfläche geschlossen werden. Im Gegensatz zu den Spektren von 22R1 tritt für 4R1 eine weitere wesentliche Linienformveränderung bei Adsorption von mehr als einer Monolage auf. Indem bei erhöhter Bedeckung die mobile Komponente zugunsten der immobilen verschwindet, wird ersichtlich, dass dieses Ansteigen der immobilen Komponente zu einem großen Teil durch Protein-Protein-Wechselwirkungen verursacht wird. Gleichzeitig zeigt das vollständige Verschwinden der mobilen Komponente bei $\Theta = 1.5$ ML, dass die Stelle 4 in allen adsorbierten Proteinen dicht mit Wechselwirkungspartnern umgeben ist, während dies an der Stelle 22 nicht vollständig geschieht. Somit stellt sich die Oberfläche von Helix A als bevorzugte Wechselwirkungsfläche zwischen adsorbierten Proteinen bei hohen Bedeckungen dar.

Demgegenüber finden sich in den ESR-Spektren keine Hinweise auf eine Entfaltung der markierten Sekundärstrukturelemente der C-terminalen Domäne. Diese decken die lange domänenverbindende Helix C mittels drei Mutationen (61, 72, 76) und die Helices F (109), G (131) und H (150) mit Markierung je einer Stelle ab. Helices G und H befinden sich in einem gemeinsamen Helixbündel. Der Verlust der charakteristischen Linienform von 150R1 impliziert das Lösen des tertiären Kontakts, den R1 im nativen Protein an der Stelle 150 mit den benachbarten Seitenketten eingeht. Dieser Kontakt reagiert jedoch sehr sensibel auf geringe Veränderungen der Tertiärstruktur, wie die Untersuchungen an der neutralen Lipidschicht gezeigt haben (vgl. Kapitel 5). Die Existenz verschiedener Bewegungsmoden von R1, die aus der Inhomogenität der Form der zentralen Linie extrahiert wurden, deutet auf eine inhomogenere Umgebung von R1 an der Stelle 150 nach Adsorption. Dies ist ebenfalls konsistent mit einer ungeordneter Struktur des Helixbündels.

Dabei charakterisiert der verwendete Linienformparameter (zentrale Linienbreite) 150 weiterhin als eine helicale Stelle, die Kontakt zu benachbarten Seitenketten hat. Somit gibt diese Linienformveränderung eine Variation der Tertiärstruktur dieser Helices an, ohne dass dies Auswirkungen auf die Sekundärstruktur der Helix H hat noch die Faltung der restlichen Proteinstruktur beeinflussen muss. Auch Helix G bleibt nach Adsorption intakt, wie der Erhalt der Linienform von 131R1 im adsorbierten Zustand beweist.

Der Erhalt der domänenverbindenden Helix C wird durch die identische ESR-Linienform von 76R1 in Lösung und auf der Oberfläche bewiesen. Auch die Abweichungen der Linienformen der Stellen 72 und 61, die sich in der Mitte und am N-terminalen Ende derselben Helix befinden, weisen nicht auf einen Zerfall der Sekundärstruktur hin, da die entsprechenden Charakteristika mobiler und immobilere Anteile fehlen. Weiterhin können die erhaltenen Spektren aus der nativen Linienform durch Verbreiterung der Linien der Spektren des nativen Proteins abgeleitet werden. Diese Verbreiterung zeigt eine Änderung der lokalen Umgebung dieser Stellen auf, die zu einer Immobilisierung spinmarkierter Seitenkette führt. Somit können die Linienformveränderungen im Rahmen einer globalen Immobilisierung der weiterhin intakten Helix C verstanden werden, die zwar die lokale Umgebung von R1 an der markierten Positionen nicht verändert, aber die Mobilität des Proteinrückgrats verringert, an welches die Bewegung von R1 gekoppelt ist (vgl. Kapitel 2, 5). Im Lichte der analysierten Entfaltung der N-terminalen Helix A und des β -Faltblatts lässt sich diese Veränderung leicht verstehen, wenn man eine Beteiligung der benachbarten Helix B an dem strukturellen Zerfall der N-terminalen Region unterstellt. Durch ihre Wechselwirkung mit der Oberfläche würde das N-terminale Ende der Helix C rigide verankert, was den Mobilitätsverlauf innerhalb Helix C erklären würde.

Die Integrität der Helix F auf der Quarzoberfläche wird durch die ähnliche Linienform von 109R1 zu derjenigen des nativen Proteins gezeigt. Wie in Kapitel 5 erarbeitet, zeichnet sich 109R1 durch eine sehr ungewöhnliche Linienform aus, welche die außerordentliche Situation einer Helix, die aus nur einer Windung besteht, widerspiegelt. Die Immobilisierung von R1, die im nativen Protein in Form der breiteren Komponente gefunden wird, kann auf der Basis des mobilen Proteinrückgrats an dieser Stelle lediglich durch intermolekulare Wechselwirkungen erklärt werden. Der Verlust der immobilere Anteile im Spektrum von 109R1 bei Adsorption auf der Quarzoberfläche weist darauf hin, dass die immobilere Komponenten im Spektrum des nativen Proteins Wechselwirkungen mit Seitenketten geschuldet sind, die bei der Adsorption in eine strukturelle Veränderung einbezogen werden. Somit wird die Veränderung der Linienform von 109R1 bei Adsorption ebenfalls veränderten tertiären Wechselwirkungen zugeschrieben. Die Stelle 109 befindet

sich an einer Seite der Substratbindungstasche, die von den beiden Domänen von T4L eingeschlossen wird. Daher kann auch diese Veränderung als eine Folge des Strukturverlusts in der N-terminalen Domäne interpretiert werden.

Somit beweist die Linienformanalyse der Mutanten in der C-terminalen Domäne, dass die Sekundärstruktur aller untersuchten Elemente dieser Domäne erhalten bleibt. Zudem existieren keine Hinweise auf einen Kontakt der untersuchten Helixoberflächenstellen mit der Quarzoberfläche. Lediglich die Tertiärstruktur wird durch die Anwesenheit der Quarzoberfläche modifiziert. Dagegen zeugt die Analyse der Stellen in der N-terminalen Domäne von einer partiellen Entfaltung von T4 Lysozym auf der Quarzoberfläche. Dies wird durch die strukturellen Modifikationen, die in denjenigen Stellen der C-terminalen Domäne beobachtet werden, welche in Kontakt mit Domäne I stehen, unterstützt. Dies ergibt ein Bild nahezu unabhängig reagierender Domänen des kleinen globulären Proteins. Während die C-terminale Domäne intakt bleibt, entfaltet sich die N-terminale Domäne durch Wechselwirkung mit der Oberfläche.

Partielle Entfaltung von Proteinen widerspricht dem klassischen Verständnis von Proteinfaltung. Dort wird von einem Zweizustandsmodell aus nativem und komplett entfaltetem Protein ausgegangen, das durch die Kooperativität hervorgerufen wird [22]. Für Proteine mit unabhängigen Domänen wird dieses Modell auf die hierarchische individuelle Faltung der einzelnen Domänen erweitert. Die Gültigkeit des reinen Zweizustandsmodells zur Beschreibung der Faltung kleiner Proteine, wie der Familie der Lysozyme, ist bereits in Frage gestellt worden. So wurden die Spektren des UV-zirkularen Dichroismus der säureinduzierten Denaturierung von T4L mit einer partiell entfalteten Proteinstruktur interpretiert, in der die N-terminale Domäne unstrukturiert, die Struktur der C-terminalen Domäne jedoch nur aufgeweicht ist [75]. Die Zirkulardichroismus-Spektren der gentechnisch isoliert dargestellten Domänen zeigen weiterhin, dass die N-terminale Domäne allein nicht stabil ist und keine Sekundärstruktur aufweist, während die C-terminale Domäne nur marginal stabil gegen Entfaltung ist ($\Delta G = 8 \text{ kJ/mol}$), aber eine Sekundärstruktur aufweist. Jüngste NMR-spektroskopische Untersuchungen des Wasserstoffaustausches sprechen von einer unterschiedlichen thermodynamischen Stabilität der beiden Domänen gegenüber der Guanidiniumchlorid-induzierten Entfaltung [74].

Es muss erwähnt werden, dass die Autoren dieser Untersuchung, Helix A aufgrund ihrer thermodynamische Stabilität zu der C-terminalen Domäne gezählt haben. In der nativen Struktur von T4L befindet sie sich, obwohl sie in der Primärstruktur den N-terminus darstellt, im Kontakt mit Helix C und ist damit eher in die C-terminale Domäne eingebettet. Diese Ambivalenz zeigt sich auch in den hier durchgeführten Untersuchungen. Während

der Bereich des β -Faltblatts bereits bei geringen Bedeckungen entfaltet, findet man selbiges Verhalten für Helix A erst in Monolagenbedeckung. Dies deutet darauf hin, dass sie bei Wechselwirkung mit der Oberfläche zunächst durch die C-terminale Domäne stabilisiert wird. Durch Wechselwirkung mit weiteren Proteinen wird sie jedoch an der Strukturumwandlung der in der Primärsequenz naheliegenderen Domäne I beteiligt.

Der Vergleich mit den thermodynamischen Untersuchungen von T4L in Lösung zeigt, dass die beobachtete partielle Entfaltung der N-terminalen Domäne mit einer geringeren thermodynamischen Stabilität dieser Domäne erklärt werden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass die Wechselwirkung von T4L mit einer Quarzoberfläche unter den gewählten Bedingungen die Möglichkeit bietet, derart intermediäre Spezies zu immobilisieren und zu charakterisieren.

Obgleich in dieser Arbeit bei wesentlich höheren Ionenstärken gearbeitet wurde, steht der relative Verlust an Helizität von 18%, der durch Zirkulardichroismusmessungen an adsorbiertem T4L gefunden wurde [9], ebenfalls im Einklang mit einer Entfaltung der N-terminalen Domäne, wie er in dieser Arbeit vorgeschlagen wird. Die Helices A und B der N-terminalen Domäne beinhalten 20% der gesamten helical organisierten Seitenketten von T4L. Des weiteren liefert die Entfaltung einer Domäne eine Erklärung für einen großen Teil der Effekte, die für das intensiver untersuchte, dem T4L verwandte Enzym HEW Lysozym bei geringeren Ionenstärken gefundenen wurden. So wurde von Ball und Jones in ATR-IR-Spektren von adsorbiertem HEW Lysozym eine Verschiebung der Amidbanden beobachtet, wie sie auch bei einer hitzeinduzierten Gelbildung durch Proteinaggregation vorkommt, und mit einer Konformationsumwandlung des Proteins auf der Quarzoberfläche interpretiert [3]. Weiterhin wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie ein Sinken der Entfaltungstemperatur von HEW Lysozym bei Adsorption auf Quarz gemessen. Diese Destabilisierung wurde mit einem Verlust an Kooperativität durch Anwesenheit der Oberfläche erklärt und eine partielle Entfaltung als mögliche Ursache genannt [25].

In der Folge verbleibt zu klären, auf welche Weise die Quarzoberfläche derartige Umwandlungen einzuleiten vermag.

6.3 Diskussion des Adsorptionsprozesses

T4 Lysozym ist unter den verwendeten Bedingungen neutraler pH-Werte neunfach positiv geladen. Davon befindet sich eine Überschussladung in der N-terminalen Domäne, während die C-terminale Domäne achtfach positiv geladen ist. Trotzdem ist nur eine Adsorption des Proteins über die N-terminale Domäne mit den ESR-Spektren vereinbar.

Das Vergleichsexperiment bei hohen Ionenstärken, bei dem eine Beteiligung der Region hoher Ladungsdichte um 131 an der Wechselwirkung mit der Oberfläche gefunden wurde, zeigt, dass bei Anbieten eines stärker negativen Oberflächenpotenzials auch Regionen in der C-terminalen Domäne mit dieser in Wechselwirkung treten können. Somit wird deutlich, dass der in dieser Arbeit beobachtete Zustand der Proteinkonformation durch eine definierte Balance der Kräfte unter den spezifischen verwendeten Parametern (pH und Ionenstärke) hervorgerufen wird, in der die elektrostatischen Wechselwirkungen keine dominierende Position einnehmen. Nach der Abschätzung der beteiligten Kräfte in Anhang A liegen bei der verwendeten Ionenstärke, die einer Debyelänge von ca. 0.4 nm entspricht, die elektrostatischen und van-der-Waals Wechselwirkungsenergien jeweils bei weniger als $1 kT$. Die Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen ist schwerer abzuschätzen; kann jedoch bei einer partiellen Entfaltung, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wird, leicht wesentlich größere Beiträge liefern (s. Anhang A).

In bisherigen Arbeiten zur Adsorption von T4L an Quarzoberflächen wird zumeist von einem Adsorptionsprozess ausgegangen, der durch elektrostatische Kräfte getrieben wird [88]. Diese Untersuchungen wurden jedoch alle bei geringen, subphysiologischen Ionenstärken durchgeführt. Für das homologe HEW Lysozym wird neben der Beteiligung elektrostatischer Wechselwirkungen an der primären Adsorptionswechselwirkung [25], [137] selbst bei geringen Ionenstärken insgesamt ein entropisch getriebener Adsorptionsprozess gefunden [24]. Czeslik et al. erklären letzteres durch vorherrschende hydrophobe Wechselwirkungen.

Den scheinbaren Widerspruch zwischen der Beteiligung hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen wurde in dem Mechanismus von Kim et al. für die Adsorption von HEW Lysozym auf Glimmeroberflächen aufgelöst [60]: Die Autoren schlagen vor, dass die Adsorption von initiiierenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche ausgeht. Auf der Oberfläche finde eine Umwandlung der Proteinkonformation statt, die hydrophobe Seitenketten aus dem Proteininneren der Proteinoberfläche aussetze. Dies führe zu Protein-Protein-Aggregation und damit zu irreversibler Adsorption.

Hydrophobe Wechselwirkungen erfahren bei Entfaltung einen bedeuten-

den Energiewinn, so dass die Beobachtung eines vollständigen Verlusts an Sekundärstruktur der weitgehend ungeladenen Domäne I auf einen starken Einfluss hydrophober Wechselwirkungen hinweist. Die hydrophobe Wechselwirkung von Proteinen mit Festkörperoberflächen ähnelt der Wechselwirkung mit Guanidiniumchlorid-Lösungen [24], [22], da in beiden Fällen der Entropiegewinn durch Zerstörung der umgebenden Hydrathülle die treibende Kraft für die Entfaltung der adsorbierten Proteine darstellt. Indem der beobachtete Entfaltungsmechanismus von T4L nach Adsorption auf der Quarzoberfläche nahezu dem Verlauf der Stabilität gegenüber Guanidiniumchlorid folgt, unterstreicht er die Annahme des vorherrschenden Einflusses hydrophober Wechselwirkungen auf die strukturellen Veränderungen des Modellproteins.

Eine Anbindung des Proteins durch hydrophobe Wechselwirkung der N-terminalen Domäne mit der Quarzoberfläche ist konsistent mit der fehlenden makroskopischen Orientierung der Proteine. Ein denaturiertes Knäuel, das sich aus der N-terminalen Domäne gebildet hat, schränkt die Orientierung der verbleibenden angebondenen Domäne nicht in ähnlicher Weise ein, wie es das dichte Packen durch den lateral mobilen vektoriellen NTA-Linker (vgl. Kapitel 5) ermöglicht. Die Situation ähnelt vielmehr der Anbindung über das Fusionsprotein, in der die große Raumauffüllung der anbindenden Spezies sterische Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Proteinen verhindert.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Adsorption von T4L verdeutlicht, dass Protein-Quarz-Wechselwirkungen stärker sind als die Wechselwirkungen zwischen adsorbierten Proteinen und Proteinen in Lösung und letztere erst bei höheren Proteinkonzentrationen an Bedeutung gewinnen. Damit wird ein Adsorptionsmechanismus favorisiert, in dem die Quarzoberfläche zunächst weitgehend mit Protein besetzt wird, bevor die Adsorption der zweiten Lage beginnt. Dies wird durch die Bedeckungsabhängigkeit der Linienform der N-terminalen Stellen 22 und 4 unterstützt, indem der qualitativ veränderte Zustand der entfalteten Domäne erst nach Adsorption einer nominellen Proteinmonolage erhalten wird. Es muss betont werden, dass die in diesem Kapitel verwendete Definition der Bedeckung nach Kapitel 5 aufgrund der unterschiedlichen Anbindung und Proteinstruktur sicherlich nicht exakt gültig ist, offensichtlich aber nützliche Richtwerte liefert. Rasterkraftmessungen zur Adsorption des homologen HEW Lysozym an der negativ geladenen Glimmeroberfläche zeigen ebenfalls ein Lagenwachstum der Proteine auf, in dem zunächst Inselwachstum lateral wechselwirkender Proteinaggregate in der ersten Lage stattfindet, dem nach vollständiger Bedeckung der Oberfläche mit stark verringerter Geschwindigkeit Multilagenadsorption folgt [60].

Die Abhängigkeit der Entfaltung der N-terminalen Domäne von der Bedeckung verweist auf den Einfluss von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf die Denaturierung. Strukturell destabilisierende Protein-Protein-Wechselwir-

kungen sind unter identischen hochionischen Bedingungen bei der dichten Adsorption auf der neutralen Lipidoberfläche (vgl. Kapitel 5) nicht beobachtet worden. Ebenso können auf der neutralen Lipidschicht keine weiteren Proteine auf der Monolage intakten Proteins adsorbiert werden, während dies nach Adsorption auf der Quarzoberfläche gelingt. Dieser Vergleich beweist, dass erst die Wechselwirkungen des Proteins mit der Oberfläche die strukturellen Veränderungen auslösen, die eine Protein-Protein-Wechselwirkung ermöglichen. Die Protein-Protein-Wechselwirkungen forcieren wiederum gravierendere Strukturumwandlungen, die mit der Anzahl der Protein-Protein-Kontakte zunehmen. Da die Konformationen der Helices der C-terminalen Domäne auch bei Multilagenadsorption nicht verändert werden, die Spektren von 22R1 und 4R1 jedoch einen Zuwachs an immobilisierter Komponente verzeichnen, ergibt sich, dass sowohl Protein-Oberflächen- als auch Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die N-terminale Domäne der Proteine aufgebracht werden. Hier unterscheiden sich jedoch die Helix A und das β -Faltblatt. Wie die Bedeckungsabhängigkeit der ESR-Spektren zeigt, ist das β -Faltblatt für die primäre Wechselwirkung des Proteins mit der Oberfläche von größerer Bedeutung als Helix A, während letztere stärker zur Anbindung einer zweiten Proteinlage herangezogen wird.

Zur Verständnis der Natur der Protein-Protein-Wechselwirkungen kann zudem die beobachtete Reversibilität der Adsorption eines Teils des immobilisierten T4L beitragen, die auf die Existenz verschiedener Oberflächenspezies hinweist. Die hohe Desorptionslabilität deutet auf einen Anteil metastabil adsorbierter Proteine, während andere in einer stabilen Oberflächenkonformation vorliegen. Letztere können durch Dimere, Trimere etc. interpretiert werden, die als Zwischenstufe zur Bildung einer Proteinmonolage von HEW Lysozym vorgeschlagen wurden [137]. Im Lichte der Ergebnisse dieser Arbeit kann ein Modell vorgeschlagen werden, in dem die Proteinaggregate aufgrund der gravierenderen strukturellen Veränderungen irreversibel gebunden werden, während Monomere desorptionslabil sind.

6.4 Zusammenfassung

Mit Hilfe einer qualitativen Linienformanalyse der ESR-Spektren konnte das Verhalten verschiedener Sekundärstrukturelemente bei Adsorption des Modellproteins T4 Lysozym differenziert werden. So ergab die ESR-spektroskopische Analyse der Struktur der adsorbierten Proteine eine Entfaltung der N-terminalen Domäne, während die C-terminale Domäne intakt bleibt und lediglich in ihrer Tertiärstruktur modifiziert wird. Dabei stellt die Entfaltung der Domäne I die zentrale Eigenschaft dar, die auf der Oberfläche in der Literatur

bereits vermuteten destabilisierten Spezies dar, die das Adsorptionsverhalten von T4L steuern. Da somit erstmals ein mikroskopisches Bild der Proteinspezies aufgestellt werden konnte, die an dem Adsorptionsprozess beteiligt sind, unterstreicht diese Analyse den Wert der Sequenzspezifität des Site-directed Spin Labeling (SDSL) für die Untersuchung der Proteinadsorption. Zudem wurde ein seltenes Beispiel für unabhängig reagierende Domänen aufgezeigt, die aber weiterhin jeweils in sich ein kooperatives Verhalten zeigen.

Auf der Basis der Analyse der bedeckungsabhängigen Strukturveränderungen konnte ein Adsorptionsmechanismus vorgeschlagen werden, in dem die primäre Adsorption des Protein durch eine Balance verschiedener Beiträge elektrostatischer, dipolarer und hydrophober Natur zu der Protein-Quarz-Wechselwirkung bestimmt wird (vgl. Abbildung 6.9). Die Wechselwirkungen mit der Quarzoberfläche destabilisieren die N-terminale Domäne von T4L derart, dass ab genügend hohen Bedeckungen attraktive Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen N-terminalen Domänen ermöglicht werden. Dabei führt das Zusammenspiel der Quarz-Protein-Wechselwirkung und der Protein-Protein-Wechselwirkungen zu einer Entfaltung der N-terminalen Domäne, die bei geringen Bedeckungen einsetzt und durch laterale Wechselwirkungen zwischen den Proteinen bei dichter Belegung der Oberfläche mit Protein vervollständigt wird. Bei hohen Proteinkonzentrationen in Lösung werden weitere Proteine auf die adsorbierte Proteinschicht über die entfalteten N-terminalen Domänen angebunden, an denen insbesondere die N-terminale Helix beteiligt ist. Die C-terminale Domäne tritt nicht in Kontakt mit der Oberfläche und bleibt von der Adsorption auf der Oberfläche weitgehend unberührt.

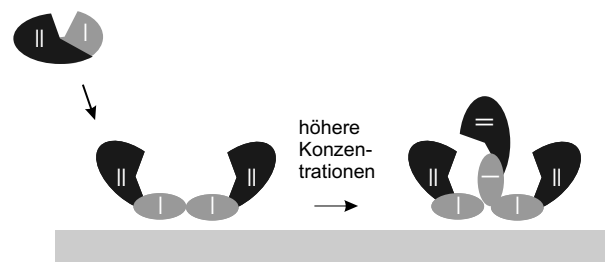


Abbildung 6.9: Skizze des vorgeschlagenen Mechanismus der Adsorption von T4L auf Quarz.

Kapitel 7

Proteinadsorption an einer geladenen Lipiddoppelschicht

Lipide mit geladenen Kopfgruppen spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivität biologischer Zellen. Phosphatidylserin (PS), das in einem Anteil von 8.5 Gew.% in menschlichen Erythrocyten vorkommt [134], trägt drei geladene Gruppen: eine Phosphat-, eine Carboxyl- und eine Aminogruppe. Dies ergibt bei neutralen pH-Werten eine negative Nettoladung in der Kopfgruppenregion, die entlang der Membransenkrechten verteilt ist. Die daraus resultierende Ladungsdichte an der Lipidoberfläche kann zur Adsorption geladener Moleküle an Membranen führen, die Phosphatidylserin enthalten, und damit eine Reihe von Membranprozessen auslösen bzw. steuern. Dies schließt auch die Adsorption peripherer Proteine ein [65, 80]. So reguliert Phosphatidylserin z.B. die Enzymaktivität von Protein Kinase C (PKC) [95].

Die Strukturaufklärung von Proteinen, die an negativ geladenen Membranen adsorbiert sind, ist aus den in Kapitel 1 einleitend angeführten grundsätzlichen Schwierigkeiten nur selten möglich. Die Komplexität des Gesamtsystems und damit der Strukturaufklärung erhöht sich zudem durch die Tatsache, dass die Oberfläche aus lateral mobilen Molekülen und somit mobilen Ladungsträgern besteht. Die Fluidität stellt ein wesentliches Charakteristikum biologischer Membranen dar. Daher wird in diesem Kapitel eine negativ geladene Lipiddoppelschicht als Modelloberfläche für eine biomimetische negativ geladene Oberfläche verwendet, deren Wechselwirkung mit dem Modellprotein im Vergleich zu der Situation einer rigiden, negativ geladenen Oberfläche im Falle des Quarzes analysiert werden soll (vgl. Kapitel 6). Im Gegensatz zu der nicht biomimetischen Quarzoberfläche kann bei Adsorption auf der geladenen Lipiddoppelschicht nicht nur das Protein sondern auch die Oberfläche signifikante strukturelle Veränderungen vollziehen bzw. an die Strukturänderungen des Proteins koppeln. Damit kann die Grenzfläche wäh-

rend des Experiments nicht mehr als rigid angesehen werden und muss in die Strukturanalyse einbezogen werden.

Um eine lateral mobile, negativ geladene Modelloberfläche darzustellen, wurde der in Kapitel 5 untersuchten neutralen Lipidschicht ein 25%iger molarer Anteil an PS-Lipiden zugegeben. Diese Oberfläche hat im Fall eines homogenen Films nach Abschätzung über die pK-Werte der geladenen Gruppen [10] maximal eine Ladungsdichte im Bereich derjenigen der Quarzoberfläche. Die tatsächliche Oberflächenladungsdichte wird durch die Verteilung der Ladung in der Membrannormalen erniedrigt. Diese Ladungsverteilung steht wiederum in einer komplizierten Abhängigkeit von Ionenstärke und pH-Wert [16], so dass im Rahmen einer Abschätzung (analog Anhang A) ein Wert von ca. 0.2 Ladungen/nm² für die Oberflächenladungsdichte angenommen werden kann. Durch Verwendung spinmarkierter Lipide und Proteine können durch Analyse der erhaltenen ESR-Spektren sowohl strukturelle Umwandlungen des adsorbierten Proteins als auch der Modellmembran im Zuge der Wechselwirkungen an der Grenzfläche untersucht und ggf. in Beziehung gesetzt werden.

7.1 Untersuchung der Adsorption

7.1.1 Das Adsorptionsverhalten des Proteins

Die negativ geladene Lipiddoppelschicht enthält, ebenso wie die neutrale Schicht (s. Kapitel 5), das chelatisierende Lipid DOGS NTA, um eine spezifische Anbindung von T4 Lysozym zu ermöglichen. Trotzdem unterscheidet sich das Adsorptionsverhalten von T4L auf der negativ geladenen Lipiddoppelschicht drastisch von dem in Kapitel 5 beschriebenen Verhalten auf der neutralen Oberfläche und zeigt eine starke Abhängigkeit von der Ionenstärke, bei der die Adsorption stattfindet.

In Abbildung 7.1 sind die Ergebnisse eines Vergleichsexperiments der Adsorption auf der neutralen und der negativ geladenen Lipidoberfläche unter jeweils identischen Protein- und Salzkonzentrationen dargestellt. Dort wird deutlich, dass bei hoher Ionenstärke (500 mM) – bei der auf der neutralen Schicht die Adsorption einer Proteinmonolage beobachtet wurde – die negativ geladene Schicht nur zu einem Drittel mit Protein belegt wird. Erst bei Verwendung sehr hoher Proteinkonzentrationen (ca. 0.4 mg/mL, d.h. einer ungefähr doppelt so hohen Konzentration, als für die Anbindung auf der neutralen Schicht verwendet) werden größere Bedeckungen erreicht, die jedoch maximal 0.5 ML betragen. Bei Verringerung der Ionenstärke (auf 30 mM) dreht sich das Bild um.

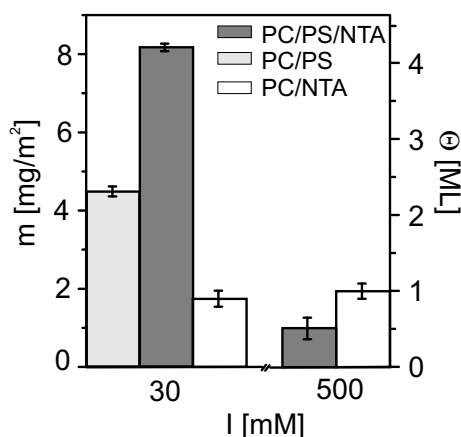


Abbildung 7.1: Vergleichsexperiment der Adsorption bei verschiedenen Ionenstärken auf der negativ geladenen, chelatisierenden (PC/PS/NTA) bzw. reinen (PC/PS) und der chelatisierenden neutralen (PC/NTA) Lipidschicht unter Verwendung jeweils identischer Reaktionsbedingungen. Die adsorbierte Menge ist in Massendichten sowie in Bedeckungseinheiten (ML) angegeben.

Hier wird die neutrale Schicht nicht vollständig bedeckt ($\simeq 0.8$ ML), während auf der negativ geladenen Lipidschicht nominell bereits die vierte Lage besetzt wird. Abbildung 7.1 zeigt ebenfalls den Vergleich zu der Proteinmenge, die auf der negativ geladenen Lipidschicht adsorbiert werden kann, wenn kein NTA vorhanden ist. Auf dieser reinen PC/PS (3:1) Lipidschicht findet bei hoher Ionenstärke keine Proteinadsorption statt. Bei niedriger Ionenstärke ist die adsorbierte Menge gegenüber der NTA-enthaltenden Oberfläche verringert.

Proteine, die auf den negativ geladenen Oberflächen adsorbiert sind, haben auch ein unterschiedliches Desorptionsverhalten, als jene auf der neutralen Lipiddoppelschicht. Während Proteine auf der neutralen Lipidschicht lediglich durch das Entfernen der Nickelionen desorbiert werden können, löst das Erhöhen der Ionenstärke auf den negativ geladenen Doppelschichten Proteindesorption aus. Im Falle des reinen PS/PC Films kann die Proteinschicht auf diese Weise vollständig entfernt werden (s. Abbildung 7.2). Im Gegensatz dazu wird auf der chelatisierenden, negativ geladenen Lipiddoppelschicht ein Teil der Proteine irreversibel adsorbiert. Dieser Anteil steigt mit sinkender Ionenstärke bei Adsorption. Um zu prüfen, ob der bei einer Ionenstärke von 500 mM verbleibende Anteil spezifisch über den Nickelkomplex gebundene Proteine wiedergibt, wird die Desorptionslabilität der verbleibenden Schicht gegenüber EDTA geprüft (vgl. 5.1). Wie Abbildung 7.2 illustriert, gelingt

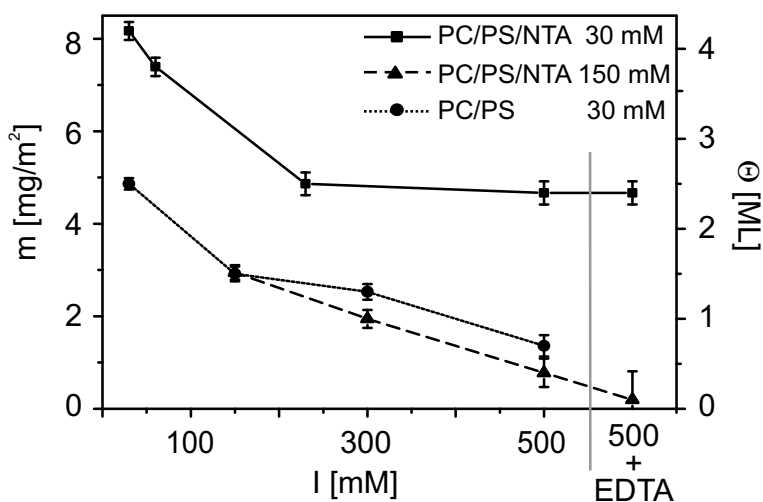


Abbildung 7.2: Abhängigkeit des Desorptionsverhaltens der Proteine durch Waschen mit Puffern sukzessiv erhöhter Ionenstärken und schließlich mit EDTA enthaltendem hochionischen Puffer von den Adsorptionsbedingungen.

diese Desorption, wenn T4L bei einer Ionenstärke von 150 mM adsorbiert wurde, jedoch nicht, wenn die Ionenstärke bei Adsorption geringer war (5 bzw. 30 mM). Demgegenüber bewirkt das direkt Anbieten von EDTA unter Adsorptionsbedingungen lediglich im Fall der hohen Ionenstärke (500 mM) die Desorption des Proteins.

Auf den negativ geladenen Lipiddoppelschichten zeigt die adsorbierte Proteinmasse zudem eine starke Abhängigkeit von der angebotenen Proteinkonzentration. Diese Konzentrationsabhängigkeit bei konstanter Ionenstärke wird für die Adsorption von T4L auf der negativ geladenen, chelatisierenden Lipiddoppelschicht bei sehr niedrigen Ionenstärken ($I=5$ mM) untersucht, da die Strukturanalyse des adsorbierten T4L im Folgenden bei diesen Bedingungen durchgeführt wird (s. Abschnitt 7.2). Abbildung 7.3 zeigt den Verlauf der adsorbierten Masse bzw. nominellen Bedeckung für den verwendeten Lösungsbereich, wobei die eingezeichnete Kurve lediglich der Veranschaulichung dienen soll. Bei allen verwendeten Konzentrationen wird mindestens eine der Monolagenbedeckung entsprechende Proteinmenge adsorbiert. Ab einer Mindestkonzentrationen von ca. 0,2 mg/mL steigt die Bedeckungskurve in einem engen Konzentrationsbereich steil an, und es wird bis zu der vierfachen Proteinmasse aufgenommen, die auf der neutralen Lipidschicht adsorbierbar ist. Auf der neutralen Lipiddoppelschicht führen die selben Proteinkonzentrationen dagegen weiterhin zur Adsorption einer Proteinmonolage. Diese Form der Adsorptionskurve ist charakteristisch für

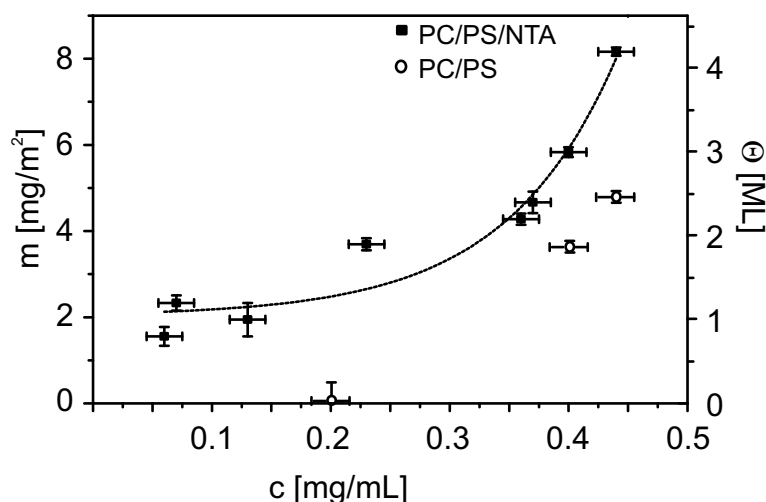


Abbildung 7.3: Konzentrationsabhängigkeit der adsorbierten Proteinmenge für die Adsorption an der chelatisierenden, negativ geladenen Lipiddoppelschicht (PC/PS/NTA) bei niedrigen Ionenstärken ($I=5$ mM), bzw. in Abwesenheit von NTA.

einen kooperativen Adsorptionsprozess [44]. Die Adsorptionsdaten für das PS/PC Referenzsystem (Kreissymbole Abbildung 7.3) illustrieren, dass in Abwesenheit des chelatisierenden Lipids erst ab höheren Anfangskonzentrationen Protein adsorbiert wird.

Somit deutet das stark veränderte Adsorptionsverhalten von T4L auf der negativ geladenen Lipiddoppelschicht auf eine ausgeprägte Wechselwirkung zwischen der Oberfläche und T4L hin. Daher wird in den folgenden Abschnitten der Einfluss dieser Wechselwirkung auf die Struktur der Lipiddoppelschicht und des adsorbierten Proteins analysiert.

7.1.2 Die Struktur der negativ geladenen Lipiddoppelschicht in Anwesenheit von T4L

Die Untersuchung der strukturellen Antwort der Lipidschicht auf die Anwesenheit adsorbierter Proteine erfolgt durch den Vergleich der ESR-Spektren der spinmarkierten Lipiddoppelschicht vor und nach der Adsorption unmarkierter Proteine. Hierbei wurde die Struktur der Oberfläche nach Adsorption bei hohen (500 mM) und sehr niedrigen ($\simeq 5$ mM) Ionenstärken analysiert. Qualitativ weichen ESR-Spektren des bedeckten kaum von denen des isolierten Films ab. Eine detaillierte Analyse zeigt jedoch – ähnlich zu Kapitel 4.2

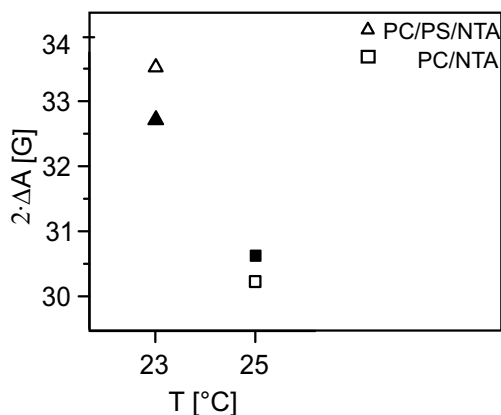


Abbildung 7.4: Veränderung der Hyperfeinaufspaltung bei $\theta = 0^\circ$ in den ESR-Spektren des 14-doxyl PSC in der neutralen Lipidschicht (Viereck) und im sauren Lipidfilm (Dreieck) bei niedriger Ionenstärke ($I=5$ mM) vor (offene Symbole) und nach Proteinadsorption (gefüllte Symbole).

– leichte Veränderungen der Hyperfeinaufspaltung. In der folgenden Analyse soll, wie dort erläutert, die maximale Aufspaltung bei $\theta = 0^\circ$, d.h. $2 \cdot A_{parallel}$ des effektiven Hamiltonoperators, als ein Maß für die Ordnung des Films verwendet werden, anhand dessen sich kleine Änderungen der Struktur verfolgen lassen. Dabei entspricht eine zunehmende Hyperfeinaufspaltung bei $\theta = 0^\circ$ einer zunehmenden Ordnung.

Aus Abbildung 7.4 wird ersichtlich, dass die gemessene Hyperfeinaufspaltung des 14-PSPC sinkt, wenn T4L bei niedrigen Ionenstärken adsorbiert wird. Gleichzeitig wird eine geringfügige Verbreiterung der Peaks nach Adsorption des Proteins beobachtet. Demgegenüber führt die Adsorption von T4L auf der neutralen Lipidschicht unter den dort verwendeten hochionischen Bedingungen zu einer geringen Vergrößerung der Hyperfeinaufspaltung. Dort liegen die gemessenen Unterschiede allerdings am Rande dessen, was im Rahmen der Messfehler auflösbar ist.

Das bei 14-doxyl PSC beobachtete Verhalten der Hyperfeinaufspaltung setzt sich in den Spektren der mit 7-doxyl PSC markierten Filme unter hochionischen Bedingungen fort. Auch hier wird eine Erniedrigung der Hyperfeinaufspaltung bei Adsorption von T4L auf der negativ geladenen Lipidschicht beobachtet, während dies auf der neutralen Lipidschicht zu einer leicht erhöhten Aufspaltung führt (s. Abbildung 7.5). Aus der in Kapitel 4.2 beschriebenen Analyse ist bereits bekannt, dass die Hyperfeinaufspaltung, die im isolierten, negativ geladenen Film gemessen wird, größer ist als die entsprechende des neutralen Films. Abbildung 7.5 macht nun deutlich, dass die

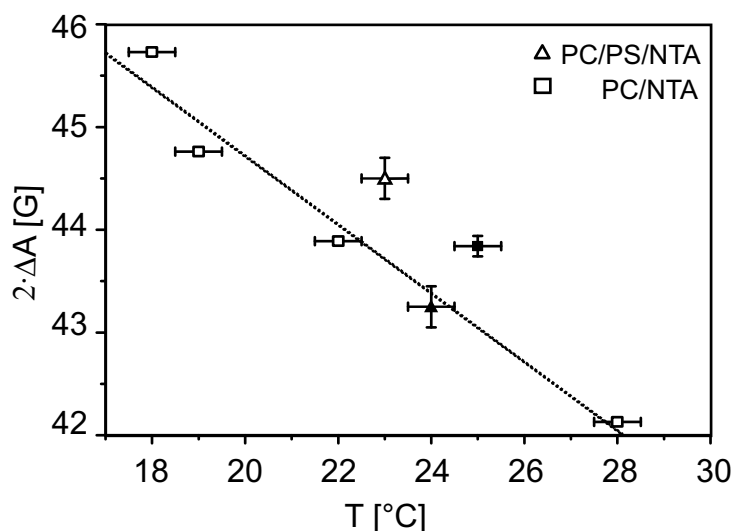


Abbildung 7.5: Hyperfeinaufspaltung der ESR-Spektren bei $\theta = 0^\circ$ des 7-doxyl PSPC in der neutralen (Viereck) bzw. negativ geladenen (Dreieck) Lipidschicht bei hoher Ionenstärke ($I=500$ mM) vor (offene Symbole) und nach Proteinadsorption (gefüllte Symbole). Zum Vergleich der absoluten Werte ist die Temperaturabhängigkeit der Aufspaltung des neutralen Films eingetragen.

Adsorption von T4L auf der negativ geladenen Lipidschicht die Hyperfeinaufspaltung wieder in den Bereich absenkt, der im neutralen Film gefunden wird. In den Spektren des 7-doxyl PSPC kann im Gegensatz zu dem Fall des 14-doxyl PSPC keine Veränderung der Linienbreite bei Adsorption festgestellt werden. Dies ist wahrscheinlich eine Folge der komplexeren Linienform der Spektren des langsamer rotierenden Isomers (vgl. Kapitel 4.1).

7.1.3 Diskussion des Adsorptionsverhaltens

7.1.3.1 Die Anbindung im hochionischen Fall

Unter hochionischen Bedingungen werden die Proteine über die spezifische Komplexierung des Histidinankers mit den chelatisierenden Lipidmolekülen an die Oberfläche gebunden, wie aus der Desorption nach Zugabe von EDTA geschlossen werden kann. Diese Anbindung ist bereits aus der Adsorption an der neutralen Lipidschicht bekannt und wurde, wie in Kapitel 5 beschrieben, eingehend analysiert.

Die drastische Verringerung der adsorbierten Masse in Anwesenheit von PS macht deutlich, dass PS der spezifischen Adsorption von T4L entgegen-

wirkt. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Systemen liegt in der negativen Nettoladung des PS-enhaltenden Lipidfilms. Da die somit eingeführten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Protein und der negativ geladenen Oberfläche jedoch in der Summe attraktiv sein müssen und eine Adsorption unterstützen sollten, liegt der Schluss nahe, dass der Unterschied in einer veränderten Struktur des negativ geladenen Films zu suchen ist. Dabei muss die Anwesenheit des PS die Lipiddoppelschicht derart verändern, dass die Anzahl effektiv zugänglicher Adsorptionsplätze verringert wird. Die Bindungsstellen werden allerdings in einem fünffachen Überschuss angeboten, um suboptimale, durch laterale Diffusion limitierte Belegungen auszuschließen. Bei quantitativer Ausbeute der Anbindungsreaktion und homogener Verteilung der Chelatorlipide würde bereits ein zweiprozentiger Anteil chelatisierender Lipide zur Adsorption einer vollständigen Monolage an Proteinen ausreichen. Zur Erklärung des experimentellen Befundes geringer Bedeckungen muss daher von einer inhomogenen Verteilung der NTA-Gruppen aufgrund einer lokalen Anreicherung der chelatisierenden Lipide ausgegangen werden. Da diese Effekte nur in Anwesenheit von PS-Lipiden beobachtet werden, kann gefolgert werden, dass sie von den negativ geladenen Lipiden initiiert werden.

Die Hypothese einer Phasenseparation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Lipiddoppelschichten, die zwar die gleichen Anteile an PS und DOGS-NTA Ni, aber zusätzlich 20% Cholesterin enthalten, deutlich höhere Bedeckungswerte unter hochionischen Bedingungen zeigen. Cholesterin wirkt der Phasenseparation von Lipiden entgegen und kann in einigen Fällen die Domänenbildung komplett inhibieren [129]. Weiterhin ergibt sich unter der Annahme, dass die Proteinmoleküle nur auf den PS/DOGS-NTA Ni-Phasen adsorbieren können, eine Oberflächenbedeckung von ungefähr 35% (unter der idealisierten Annahme, dass alle Lipide identischen Kopfgruppenflächen haben). Dies stimmt im Rahmen einer Abschätzung gut mit der beobachteten Bedeckung von 30% überein.

Das komplexe Phasenverhalten von Lipidmischungen war und ist Gegenstand intensiver Untersuchungen, z.B. [87, 98]. Dabei ist die Affinität von Phosphatidylserinen zu zweiwertigen Kationen, in physiologischer Umgebung sind dies Calciumionen, bereits seit langer Zeit bekannt, z.B. [46, 15]. Ebenso weiß man, dass diese Affinität die Phasenseparation homogener PC/PS Gemische einleiten kann und in einer komplexen Abhängigkeit von Ionenstärke, pH-Wert und Zusammensetzung des Lipidgemischs zu Phasen verschiedener Größe und Zusammensetzung führt [119]. Während die makroskopischen Phänomene dieses Phasenverhaltens mit Hilfe einer Reihe von abbildenden Methoden wie Fluoreszenzmikroskopie [11] oder Rasterkraftmikroskopie (AFM) [31] weitgehend aufgeklärt sind, wurden die molekularen

Mechanismen, die zu diesem Verhalten führen, noch nicht eindeutig geklärt.

Die mikroskopischen Eigenschaften dieser Systeme wurden bisher mit Hilfe theoretischer Untersuchungen im Rahmen von Monte-Carlo- [49] und Molekulardynamik- Simulationen [16] untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass PS/PC Mischungen nicht ideal sind [49] und diese Eigenschaft den in Kapitel 4 diskutierten intermolekularen Wechselwirkungen zugeschrieben, die PS auszubilden vermag [16]. Unstrittig ist, dass die Bildung einer PS-angereicherten Phase durch eine spezifische koordinative Wechselwirkung zwischen Serin und Calcium getrieben wird [95].

Des weiteren wurde in jüngeren Untersuchungen entdeckt, dass auch die Wechselwirkung negativ geladener Lipide mit basischen Peptiden, bzw. positiv geladenen Proteinen, eine Anreicherung negativ geladener Lipide zu initiieren vermag. Dabei konzentriert sich das Interesse auf Prozesse, die an der Signaltransduktion spielen. So wird bei Anbindung des Hauptsubstrates von Protein-Kinase C (PKC), dem MARCKS Protein, an Membranen eine lokale Anreicherung von Phosphatidylserin in der Grenzfläche von Protein und Lipid beobachtet [144]. Dieser Prozess wird durch die Maximierung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Lipidoberfläche und Protein angetrieben. Der mit der Entmischung einhergehende Entropieverlust wirkt diesem Bestreben entgegen [26]. Ebenso muss für die Ausbildung der zusätzlichen Grenzflächen Energie aufgewendet werden. In der Thermodynamik werden diese häufig über das zweidimensionale Äquivalent der Oberflächenspannung, der Linienspannung, beschrieben, die ebenfalls in die Größe der gebildeten Domänen eingeht [11]. Die Bedingungen zur Bildung und die Größe dieser Domänen sind daher nicht in trivialer Weise vorhersagbar. Auch im Zusammenhang der Adsorption des zu T4L homologen Proteins HEW Lysozym an PC/PS-Vesikeln wurden bereits derartige Effekte erwähnt. So wurde in einer fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung das beobachtete sinkende Excimer/Monomer-Verhältnis markierter PS-Lipide in Anwesenheit des Proteins mit einer sinkenden Kollisionsrate zwischen den Lipiden interpretiert. Als mögliche Ursache wurde u.a. ein Kondensierungseffekt akkumulierter geladener Lipide vorgeschlagen.

Somit unterstützen die zitierten Arbeiten die Interpretation der inhibierten Adsorption durch eine Phasentrennung des Phosphatidylserins und des Phosphatidylcholins in der negativ geladenen Lipiddoppelschicht. Sie machen jedoch deutlich, dass ein derartiges Verhalten auf der Basis des heutigen Wissensstands nicht a priori vorhersagbar ist [86]. Aufgrund der hohen Affinität von PS zu zweiwertigen Nickelionen sollte sich das DOGS NTA Ni bei dieser Separation in jedem Falle hauptsächlich in der PS-reichen Phase befinden und damit die beobachtete geringe Proteinbedeckung hervorrufen.

Schließlich stellt sich die Frage, wie diese Phasentrennung eingeleitet wird.

In dem in dieser Arbeit untersuchten System liegen sowohl zweiwertige Kationen (Nickel) als auch positiv geladene Proteine vor, die beide potentielle Initiatoren der Separation in PS-angereicherte und PS-arme Phase darstellen. Nickelionen haben eine vergleichbare Affinität zu Calcium wie Serin [46], sind jedoch ausschließlich in gebundener Form in der NTA-Kopfgruppe vorhanden.

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der Phasenseparation soll die Analyse der ESR-Spektren der Lipiddoppelschicht herangezogen werden. Die Immobilisierung von T4L über den Histidinanker auf der neutralen Lipiddoppelschicht führt zu einer geringfügig erhöhten Ordnung der neutralen Lipidschicht bei Adsorption eines Proteins, wie die Werte der Hyperfeinaufspaltung verdeutlichen. Dies lässt sich mit einer Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem Lipid erklären, die zu einer konformellen Einschränkung der Lipide führt. Eine derartige Erhöhung der Ordnung bei Proteinadsorption wird ebenfalls in einer Vielzahl ESR-spektroskopischer Untersuchungen an Vesikeln geladener Lipide gefunden, z.B. [127]. Das geringe Ausmaß der hier beobachteten Ordnungseffekte bei Adsorption des Proteins auf der neutralen Lipidschicht erklärt sich durch die geringe Stärke der Wechselwirkung, wie sie aus der Analyse der Proteinstruktur bereits herausgearbeitet wurde (s. Kapitel 5). Im Gegensatz dazu wird nach identischer Anbindung des Proteins an die PS-enthaltende Lipidschicht eine Erniedrigung der Ordnung in den ESR-Spektren beobachtet. Damit gelangt der beobachtete Ordnungsparameter, der in Abwesenheit des Proteins durch zusätzliche laterale Wechselwirkungen der Lipide gegenüber demjenigen der neutralen Lipidschicht erhöht ist (s. Kapitel 4.2), in den Bereich des Wertes der neutralen Lipidschicht.

Es muss hier daran erinnert werden, dass das verwendete spinmarkierte Lipid ein Phosphatidylcholin ist. Daher sollte es bei einer Phasenseparation in der PC-Phase akkumuliert werden und somit die Eigenschaften dieser Phase reflektieren. Unter dieser Annahme lässt sich das gegensätzliche Verhalten der neutralen und negativ geladenen Lipiddoppelschichten bei Proteinadsorption auflösen: Ist kein Protein vorhanden, so besteht die negativ geladene Lipiddoppelschicht bei hohen Ionenstärken aus einer homogenen Mischung der Lipide. Die Adsorption des Proteins induziert eine Phasentrennung dieser Mischung in PS-angereicherte Domänen in einem PC-reichen Bad. Dabei wird das chelatisierende Lipid in den PS-reichen Domänen akkumuliert. Das spinmarkierte Phosphatidylcholin befindet sich hauptsächlich in den PC-reichen Domänen, so dass ESR-spektroskopisch lediglich die Struktur und Dynamik dieser Phase beobachtet wird. Bei der Phasenseparation verschwinden die lateralen Wechselwirkungen zwischen PS und PC, so dass das Sondenlipid eine sinkende Ordnung in der PC-Schicht anzeigt. Damit deutet die Analyse der ESR-Spektren der Lipide bei Proteinadsorption auf einen Mechanismus

hin, in dem die Phasentrennung durch die Wechselwirkung des T4L mit den negativ geladenen Lipiden hervorgerufen wird.

Dass die Phasentrennung schon bei hohen Ionenstärken stattfindet, ist im Einklang mit Untersuchungen an dem MARCKS Protein. Hier wurde beobachtet, dass Pentalysin, ein geladener Ausschnitt des Proteins, nur bei sehr geringen Ionenstärken die Bildung von PS-angereicherten Lipidclustern initiiert, während das vollständige Protein noch in 100 mM Elektrolytlösung nachweisbare Domänen bildet [26]. Daher erscheint die Phasenseparation als ein kooperativer Prozess, den neben der Wechselwirkung der Ladungsträger auch die Summe anderer (schwächerer) Wechselwirkungsbeiträge (hydrophober, dipolarer Art) bestimmen.

Als Fazit der Analyse der Proteinadsorption bei hohen Ionenstärken soll festgehalten werden, dass eine Phasenseparation in PS-reiche und PS-arme Phase stattfindet, wobei DOGS-NTA in der PS-reichen Phase gelöst wird. Es wird ein Mechanismus favorisiert, in dem nicht das anwesende DOGS-NTA Ni, sondern erst die Immobilisierung des basischen Proteins ausreicht, um die Entmischung der Lipidschicht zu induzieren.

7.1.3.2 Die Anbindung bei geringen Ionenstärken

Die ESR-Spektren der spinmarkierten Lipiddoppelschichten unter Verwendung des 14-doxyl Isomers, das eine Sonde für die Struktur und Dynamik der hydrophoben Fettsäureketten darstellt, zeigen bei subphysiologischen Ionenstärken ebenfalls eine sinkende Ordnung der Lipidschicht nach Proteinadsorption an. Bei Beobachtung der Kopfgruppenregion der Lipide in Form des 7-doxyl PSPC Isomer im vorangegangenen Abschnitt könnte die erniedrigte Ordnung der Lipide auch lokale Konformationsänderungen der Kopfgruppe reflektieren, die durch den Kontakt mit dem Protein hervorgerufen werden. Es ist jedoch wesentlich unwahrscheinlicher, dass sich diese Störung bis in die Position 14 fortpflanzt. Daher bestärkt die Analogie des Verhaltens der Lipide bei niedrigen Ionenstärken die These der proteininduzierten Domänenbildung.

Die beobachtete Vergrößerung der Linienbreite lässt sich im Rahmen dieser These mit dem Verhalten einer Doppelschicht erklären: Während die obere Schicht auf adsorbierte Proteine reagiert und PS in Domänen akkumuliert, ist die untere Schicht lediglich über van-der-Waals-Wechselwirkungen an diesen Prozess gekoppelt. Wie Stottrup et al. zeigten, sind die Strukturen der beiden Schichten weitgehend unabhängig, so dass in dem hier untersuchten Fall die untere Schicht ihre ursprüngliche Struktur nur leicht ändern sollte [123]. Somit besteht das System aus zwei Teilsystemen mit leicht unterschiedlichen Eigenschaften. Die einzelnen Resonanzpositionen sind im ESR-

Spektrum nicht auflösbar und schlagen sich in Form vergrößerter Linienbreiten nieder.

Die Proteinmasse, die auf der negativ geladenen Lipiddoppelschicht adsorbiert werden kann, ist von der angebotenen Lösungskonzentration und der elektrostatischen Abschirmung der Lösung abhängig. Die exponentielle Abhängigkeit der adsorbierten Proteinmasse von der Lösungskonzentration reflektiert die starke Kooperativität der Proteinadsorption. Ebenso wie die hohe Oberflächenbedeckung, die weit über eine Monolage hinausgeht, beweist dies, dass Wechselwirkungen der Proteine untereinander an der Adsorption beteiligt sind.

Die Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Ionenstärke ist konsistent mit einer fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Adsorption des verwandten Proteins HEW Lysozym an PC/PS-Vesikeln. Dort setzt die Adsorption bei einer Ionenstärke von 100 mM ein und steigt exponentiell mit sinkender Ionenstärke [100]. Damit wird eine bedeutende Beteiligung elektrostatischer Wechselwirkungen an dem Adsorptionsmechanismus der Lysozyme nachgewiesen.

Die Desorptionsexperimente liefern weitere Hinweise über die Art der Proteinanbindung. Sie ergeben, dass bei subphysiologischen Ionenstärken, ein Teil der Proteine unter Beteiligung elektrostatischer Wechselwirkungen reversibel (gegenüber einer erhöhten Abschirmung elektrostatischer Wechselwirkungen) adsorbiert ist. Ein anderer Teil dagegen liegt als irreversibel adsorbierte Spezies vor. Da die Resistenz letzterer gegenüber EDTA zeigt, dass die spezifische Wechselwirkung nicht an der irreversiblen Adsorption beteiligt ist, müssen diese Spezies durch hydrophobe oder van-der-Waals-Wechselwirkungen stabilisiert sein. Diese können zwischen Proteinen wesentlich größere Werte annehmen als zwischen Proteinen und Lipiden (s. Kapitel 2). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die Stabilisierung der Adsorbate durch Protein-Protein-Wechselwirkungen aufgebracht wird, wie es das kooperative Adsorptionsverhalten bereits andeutet.

Dabei erscheint es zunächst widersprüchlich, dass Bedingungen starker elektrostatischer Wechselwirkungen die Bildung dieser Spezies bevorzugen. Im Allgemeinen sollten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen identischen, geladenen Proteinen einer Anziehung entgegenwirken. Dies wird auch in dem Adsorptionsverhalten von T4L auf der neutralen Lipidschicht deutlich, wo eine verringerte elektrostatische Abschirmung zu einer erniedrigten Packungsdichte der Proteinmonolage führt. Um die Rolle elektrostatischer Wechselwirkungen für die Ausbildung einer attraktiven Wechselwirkung zwischen identischen Proteinen näher aufzuklären, ist die Tatsache von Bedeutung, dass die Größe der irreversibel adsorbierten Proteinschicht von der Vorgeschichte der Anbindung abhängt. So führt eine Erhöhung der Ionen-

stärke auf 500 mM nicht zu derselben Bedeckung wie die direkte Adsorption unter dieser Ionenstärke. Damit wird deutlich, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche eine qualitative Veränderung der Oberflächenspezies bewirkt, die Protein-Protein Wechselwirkungen ermöglichen. Diese führen schließlich zu der beobachteten sehr stabilen Anbindung. Der Vergleich mit der reinen PS/PC Schicht zeigt, dass die Anwesenheit von DOGS NTA Ni den Anteil irreversibel gebundener Spezies erhöht. Bei hohen Proteinkonzentrationen werden dagegen vermehrt labilere Spezies adsorbiert.

Dies lässt sich verstehen, wenn von einem Inselwachstum der Proteine ausgegangen wird, das nach Adsorption von stabilen Proteinkeimen auf der Oberfläche hauptsächlich über Protein-Protein-Wechselwirkungen fortschreitet. Stabile Keime können einerseits durch spezifische Adsorption gebildet werden. In Abwesenheit von dem Chelatbildner werden sie erst bei hohen Konzentrationen gebildet und es sind mehr Spezies reversibel adsorbiert. Dies legt den Schluss nahe, dass auf der PC/PS Oberfläche mehr als ein Protein zur Ausbildung eines stabilen Keims notwendig ist. Protein-Protein-Wechselwirkungen führen dann zu einer irreversiblen Adsorption eines Proteinaggregats und werden durch elektrostatische Wechselwirkungen der Proteine mit der Lipidoberfläche eingeleitet. Bei niedrigen Ionenstärken existieren auch in Anwesenheit des Chelatorlipids labil gebundene Adsorbate. Daher kann davon ausgegangen werden, dass unter diesen Bedingungen auch unspezifische Wechselwirkungen des Proteins mit den PS-armen Zwischenräumen der Proteininseln an der Immobilisierung beteiligt sind.

Somit ergibt sich aus der Analyse der Adsorptionseigenschaften von T4L, dass an dem Adsorptionsprozess sowohl die Wechselwirkung der Proteine mit der entgegengesetzt geladenen Oberfläche als auch mit benachbarten Proteinen beteiligt ist. Dabei können durch Variation der elektrostatischen Bedingungen die Eigenschaften der adsorbierten Spezies verändert werden. Es liegt nahe, dass diese Veränderungen, die attraktive Protein-Protein-Wechselwirkungen einleiten, strukturelle Umwandlungen der adsorbierten Proteine darstellen. Diese Hypothese wird im folgenden Abschnitt anhand der Linienformanalyse der ESR-Spektren des spinmarkierten T4L nach Adsorption auf der negativ geladenen Oberfläche näher geprüft.

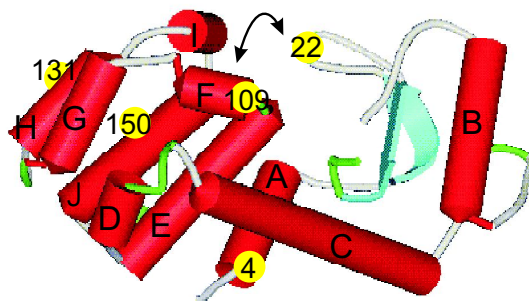


Abbildung 7.6: Die Stellen des T4L, die für die Strukturuntersuchung auf der negativ geladenen Lipidschicht spinmarkiert wurden. Der Pfeil stellt die Doppelmutante 22R1-109R1 dar, die neben den entsprechenden Einzelmутanten untersucht wird.

7.2 Untersuchung der Struktur

Zur ESR-spektroskopischen Analyse der Struktur von T4L im adsorbierten Zustand wird der Fall der subphysiologischen Ionenstärken in das Zentrum der Untersuchung gestellt, da hier die entscheidenden strukturellen Veränderungen beobachtet werden. Hierfür werden Spektren der in Abbildung 7.6 in das Modell von T4L eingetragenen spinmarkierten Mutanten diskutiert. Diese sind in erster Linie Stellen des Proteins, die in den Untersuchungen der vorhergehenden Kapiteln Auffälligkeiten gezeigt haben. So hat sich bereits in den Untersuchungen an der neutralen Lipiddoppelschicht (s. Kapitel 5) gezeigt, dass der tertiäre Kontakt an der Stelle 150 sensitiv auf geringfügige strukturelle Veränderungen von T4L reagiert. 22R1 und 4R1 markieren die Stellen in der N-terminalen Domäne, die auf der Quarzoberfläche denaturieren (s. Kapitel 6). 109 befindet sich an einer sehr flexiblen Helix der Proteinoberfläche und 131R1 markiert einen helicalen Bereich, der durch eine hohe positive Ladungsdichte gekennzeichnet ist. Zudem wurde die Doppelmutation 22R1-109R1 verwendet. Da die Stellen 22 und 109 die gegenüberliegenden Seiten Substratbindungstasche von T4L markieren (vgl. Abschnitt 5.2.5), kann durch Analyse der dipolaren Verbreiterung der ESR-Linienform die Öffnung der Substrattasche und somit der Abstand zwischen den zwei Domänen von T4L verfolgt werden.

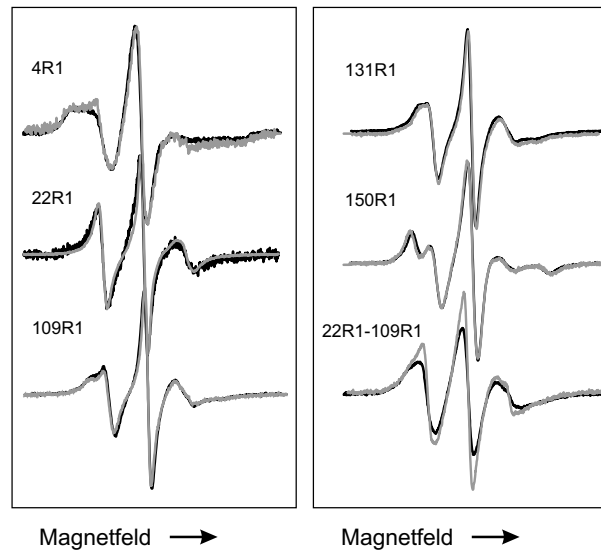


Abbildung 7.7: ESR-Spektren der verwendeten Mutanten in Lösungen (30% Sucrose) subphysiologischer Ionenstärke (hell) und hoher Ionenstärke (schwarz). Die Scanbreite beträgt 100 G.

7.2.1 Qualitative Linienformanalyse der Spektren des spinmarkierten T4 Lysozoms

7.2.1.1 Das Protein in Lösungen geringer Ionenstärke

Indem die Ionenstärke bis in den subphysiologischen Bereich erniedrigt wird, sind die Bedingungen schwach denaturierend. Daher wird zunächst die Integrität der Proteinstruktur in Lösung überprüft. In Abbildung 7.7 sind die ESR-Spektren von T4L in dem Elektrolyten sehr geringer Ionenstärke (ca. 5 mM) den Spektren des nativen Proteins in hochionischer Lösung gegenübergestellt. In dem Spektrum von 4R1 findet sich bei niedrigen Ionenstärken eine zusätzliche Spitze im Tieffeldpeak, die eine Komponente erhöhter Mobilität anzeigt. Diese Veränderung hat nur einen sehr geringen Anteil (im einstelligen Prozentbereich) an der integralen Intensität. Die Spektren aller anderen Einzelmutanten gleichen denjenigen unter hohen Ionenstärken.

Das Lösungsspektrum der Doppelmutation verändert seine Form merklich, wenn die Ionenstärke erniedrigt wird. Die Simulation der Linienform mittels der Faltung einer abstandsabhängigen Pake-Funktion mit der Summe der Spektren der Einzelmutationen gelingt auf der Basis derselben Abstandskomponenten, wie sie in Kapitel 5.2.5 zur Beschreibung des ESR-Spektrums von 22R1-109R1 in hochionischer Lösung benutzt wurden. Hierfür muss al-

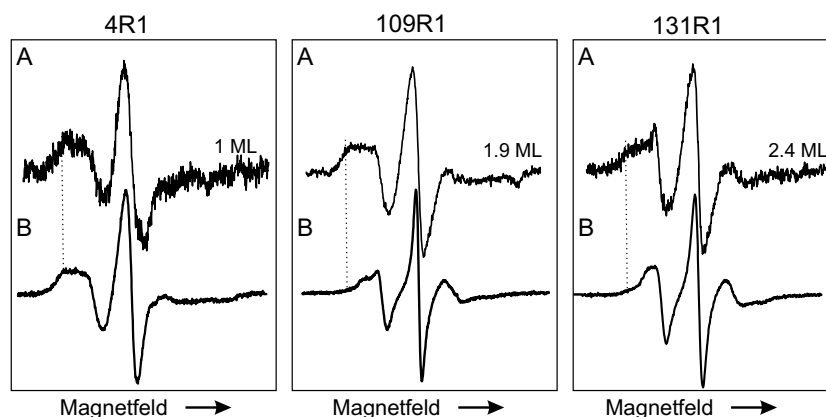


Abbildung 7.8: Vergleich der ESR-Spektren der T4L Mutanten 4R1, 109R1 und 131R1 nach Adsorption auf der negativ geladenen Lipidschicht (A) mit den Spektren des nativen Proteins in Lösung (B). Zu den Oberflächenspektren ist die Bedeckung im Verhältnis zu der Monolagenbedeckung der neutralen Lipidschicht angegeben. Die Scanbreite beträgt 100 G.

lerdings das Verhältnis der kleineren Abstände (um 16 \AA) zu den größeren Abständen (um 22 \AA) zugunsten der großen Abstände verschoben werden. Während dieses Verhältnis im nativen Protein $3 : 2$ (s. Kapitel 5.3.1) beträgt, kehrt es sich bei niedrigen Ionenstärken nahezu um und beträgt $3.5 : 6.5 (\pm 0.5)$. Es muss hierbei bemerkt werden, dass, auch wenn ein Fit nur unter der Annahme einer bimodalen Abstandsverteilung mit Komponenten um 16 bzw. 22 \AA möglich ist, die genauen einzelnen Beiträge um diese Werte in dem Fit breiter variierbar sind als im Falle des nativen Proteins.

7.2.1.2 Die Linienform im adsorbierten Zustand

Da unabhängig von der Proteinbedeckung keine der untersuchten Mutanten eine Winkelabhängigkeit der ESR-Linienform zeigt, gibt es keinen Hinweis auf eine makroskopische Orientierung der Proteine nach Adsorption auf der negativ geladenen Lipidoberfläche. In Abbildungen 7.8, 7.10 und 7.12 sind die auf der PS-Oberfläche unter niedrigen Ionenstärken (5 mM) erhaltenen ESR-Spektren jeweils im Vergleich zu den Spektren in Lösungen hoher Ionenstärke dargestellt. Letztere sind in dem Fall der Adsorption ohne makroskopische Orientierung das relevante Bezugssystem für das native Protein.

Obwohl die Linienformen aller Spektren gegenüber denen des nativen Proteins stark verzerrt werden, gleicht keines denjenigen Spektren, die auf der Quarzoberfläche von denaturierten Stellen (4R1, 22R1) erhalten wurden

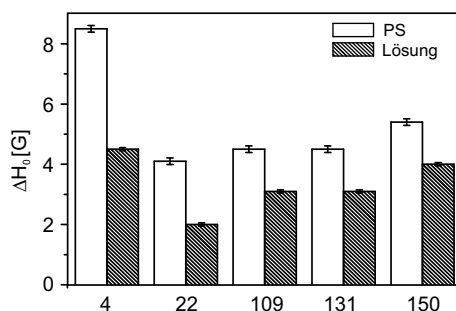


Abbildung 7.9: Veränderung des Linienformparameters ΔH_0 der Spektren der untersuchten Mutanten bei Adsorption.

(s. Kapitel 6.2) und durch stark mobile und stark immobile Komponenten charakterisiert sind. Lediglich in dem Spektrum von 131R1 finden sich Spuren sehr mobiler Spezies im einstelligen Prozentbereich, die auf einen Verlust an Sekundärstruktur hindeuten.

Wie der Verlauf des in Kapitel 6 eingeführten semi-quantitativen Linienformparameters der zentralen Linienbreite ΔH_0 verdeutlicht (s. Abbildung 7.9), sind alle Spektren nach der Adsorption durch stark verbreiterte Linien geprägt. Demnach erfährt die spinmarkierte Seitenkette an jeder untersuchten Stelle eine Einschränkung der Bewegung im Vergleich zum nativen Zustand.

Der geringste Unterschied zwischen den Spektren des nativen und auf der negativ geladenen Oberfläche adsorbierten Proteins findet sich an der Stelle 4. Hier wird bereits im nativen Zustand ein breiter Tieffeldpeak beobachtet, der durch die Wechselwirkung von R1 mit anderen Seitenketten des Proteins hervorgerufen wird (vgl. Kapitel 5.3.1) und sich in ähnlicher Form im Spektrum des adsorbierten Proteins wieder findet. Nach der Adsorption wird jedoch eine Verzerrung und Verbreiterung der zentralen Linie beobachtet. Dies macht deutlich, dass auch an dieser Stelle die Adsorption des Proteins die Bewegung von R1 beeinflusst.

Das Spektrum des 109R1 verändert sich im Zuge der Adsorption auf der negativ geladenen Oberfläche in größerem Ausmaße. Es erfährt ebenfalls eine starke Verbreiterung der Linien und zeigt aufgrund der flachen Hoch- und Tieffeldpeaks eine erstaunliche Ähnlichkeit mit demjenigen von 4R1. In diesem Zusammenhang kann auch das Spektrum von 131R1 auf der Oberfläche diskutiert werden, da dieses sich ebenfalls durch relativ flache, breite Peaks auszeichnet. Hier lehnt sich die Linienform jedoch mehr an das Spektrum des nativen Proteins an als im Falle von 109R1. Wie aus Abbildung 7.10

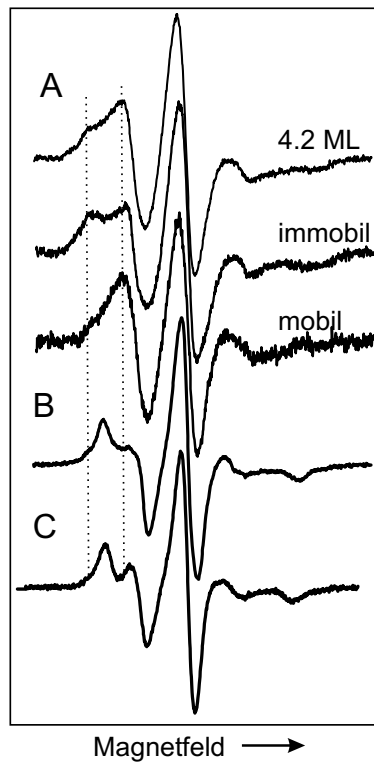


Abbildung 7.10: Vergleich der ESR-Spektren von 150R1 nach Adsorption auf der negativ geladenen (A) bzw. neutralen (B) Lipidschicht und in Lösung (C). Das Spektrum A kann in die zwei dargestellten Komponenten zerlegt werden (mobil/immobil). Die Scanbreite beträgt 100 G.

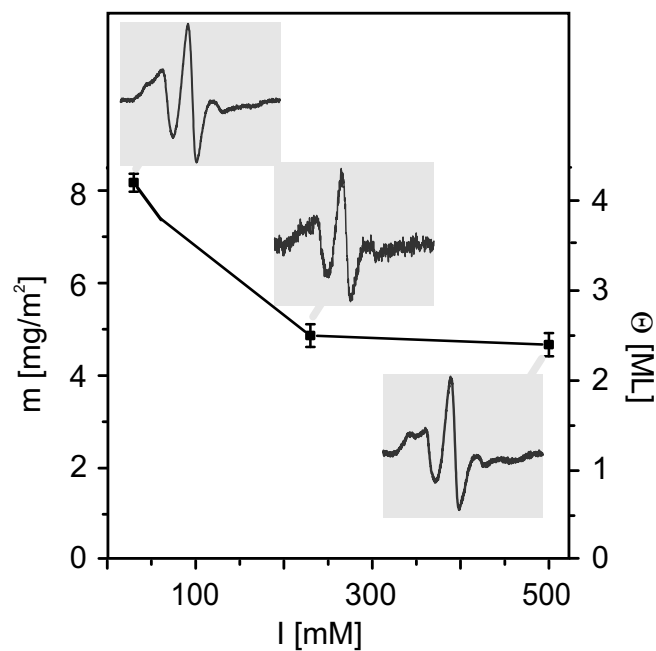


Abbildung 7.11: Veränderung der ESR-Linienform von 150R1 bei Waschen mit Puffern sukzessive erhöhter Ionenstärke.

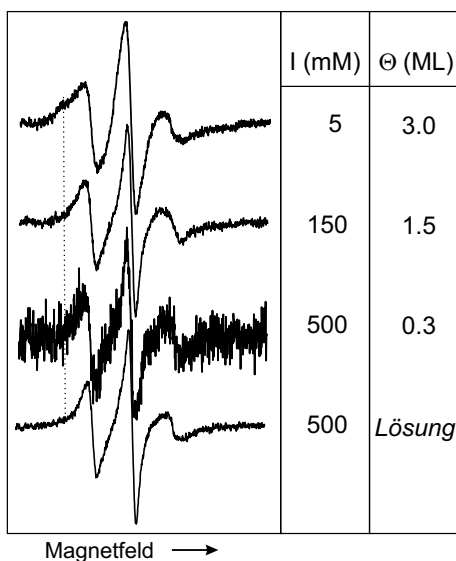


Abbildung 7.12: Abhängigkeit der ESR-Linienform von der Ionenstärke des Puffers, in dem die Adsorption stattfindet, am Beispiel von 22R1. Die Scanbreite beträgt 100 G.

ersichtlich ist, werden auch die Linien des Spektrums von 150 R1 verbreitert. Zudem enthält dieses eine schmalere Komponente, deren Linienform derjenigen von global rotierendem 150R1 (in Lösung ohne Sucrose) ähnelt. Es muss hierbei berücksichtigt werden, dass dieses Spektrum bei einer sehr hohen Oberflächenbedeckung (4.2 nominelle ML) aufgenommen wurde.

Abbildung 7.11 illustriert, dass die mobile Komponente des Spektrums verschwindet, wenn die labil gebundenen Spezies mit Puffern sukzessiv erhöhter Ionenstärke (vgl. Abschnitt 7.1) desorbiert werden. Bei einer Ionenstärke von 500 mM verbleibt lediglich die breite Komponente des ursprünglichen Spektrums. Wird dieses Experiment auf einer Oberfläche durchgeführt, die kein DOGS NTA Ni enthält, so wird eine desorptionslabilere Proteinschicht erhalten (vgl. Abbildung 7.3), deren ESR-Spektrum einen größeren Anteil der mobilen Komponente enthält. Ähnliches wird bei 22R1 beobachtet, das in einer Bedeckung von drei nominellen Monolagen adsorbiert wurde (s. Abbildung 7.12 oben). Hier weist die Linienform nach Subtraktion des Spektrums vom nativen Protein eine große Ähnlichkeit mit denjenigen von 4R1, 109R1 und 131R1 auf.

Es wird somit deutlich, dass die beschriebene Linienform sehr breiter Linien mit flachem Tieffeldpeak ein Charakteristikum aller ESR-Spektren darstellt, die auf der negativ geladenen Oberfläche aufgenommen wurden.

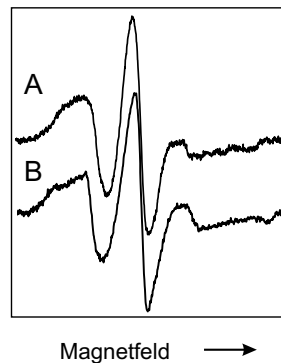


Abbildung 7.13: ESR-Spektrum von 22R1-109R1 im Vergleich zu der Summe der Spektren der Einzelmutanten (hell). Die Scanbreite beträgt 100 G.

Diese findet sich in unterschiedlichen Anteilen in den diskutierten Spektren wieder.

Die charakteristische Linienform wird jedoch ausschließlich bei Adsorption unter geringen Ionenstärken beobachtet. In Abbildung 7.12 sind die ESR-Spektren für die Adsorption von 22R1 bei verschiedenen Ionenstärken dargestellt. Die ESR-Spektren nach Adsorption bei Ionenstärken von 150 mM und 500 mM unterscheiden sich in ihrer Intensität aber (im Rahmen des erreichten Signal-zu-Rausch-Verhältnis) nicht in der Linienform. Im Vergleich zu dem Spektrum des nativen Proteins wird hier jeweils nur eine leichte Erhöhung der Linienbreite gegenüber der des nativen 22R1 beobachtet. Erst bei sehr niedrigen Ionenstärken ($I=5$ mM) wird die beschriebene stark veränderte Linienform gefunden.

Auch nach der Adsorption stimmt das ESR-Spektrum der Doppelmutante 22R1-109R1 nicht mit der Summe der Einzelspektren überein (Abbildung 7.13). Dies legt den Schluss nahe, dass weiterhin dipolare Spin-Spin Kopplungen in die Linienform eingehen und somit der Abstand der Nitroxide kleiner als ca. 23 Å ist. Die exakte Bestimmung des Abstands durch die Faltung des Summenspektrums der Einzelmutanten mit einer Pake-Funktion zur Simulation des dipolar verbreiterten ESR-Spektrums wird durch die hohe intrinsische Linienbreite der zugrunde liegenden Spektren der Einzelmutanten erschwert. Es zeigt sich, dass eine Vielzahl verschiedener Abstandsverteilungen eine Beschreibung des ESR-Spektrums der adsorbierten Doppelmutante erlauben. Dabei können jedoch keine Abstände kleiner als 14 Å verwendet werden.

7.2.2 Diskussion der Struktur von T4L

7.2.2.1 T4L in Lösungen geringer Ionenstärke

Die Ausgangsstruktur von T4L in Lösung wird unter den verwendeten Bedingungen geringer Salzkonzentration kaum gestört. Der einzige Hinweis auf eine Veränderung der Sekundärstruktur findet sich in dem Spektrum von 4R1, das mit einem geringfügigen Anteil Spezies mit entfalteter Helix A vereinbar ist. Eine Veränderung der Tertiärstruktur deutet sich bei der Analyse der dipolaren Kopplung zwischen R1 an den Stellen 22 und 109 an.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.3.1, in dem die zwei Moden der Abstandsverteilung von 22R1-109R1 der geschlossenen und geöffneten Substratbindungstasche zugeschrieben wurden, liegt es nahe, das verschobene Verhältnis der Moden einer Veränderung des molaren Anteils der zwei Spezies in Lösungen niedriger Ionenstärke zuzuordnen. Dabei zeigt sich, dass eine verringerte elektrostatische Abschirmung die geöffnete gegenüber der geschlossenen Konformation destabilisiert. Auf der Basis von Röntgenstrukturanalysen von T4L-Kristallen, die aus Mutterlösungen unterschiedlicher Ionenstärke erhalten wurden (25 mM bis 400 mM), wird bisher die Struktur von T4L als nahezu unabhängig von der Ionenstärke angesehen [7]. Allerdings muss in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, dass Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Kristalls empfindliche Gleichgewichte merklich beeinflussen können. Daher müssen Kristallstrukturen von Proteinen nicht immer mit der Struktur in Lösung identisch sein. Somit unterstreicht dieses Beispiel die außerordentliche Sensitivität der ESR-Spektroskopie – insbesondere unter Verwendung von Doppelmutanten – gegenüber strukturellen Details. Dies ist jedoch der einzige Hinweis auf eine strukturelle Veränderung des Proteins unter den Adsorptionsbedingungen.

Somit bleibt festzuhalten, dass die verwendeten Bedingungen niedriger Ionenstärke zwar generell als schwach denaturierend einzustufen sind, aber – abgesehen von der Konformation der Subtrattasche – alle bei der Adsorption auftretenden Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur oberflächeninduzierten Prozessen zugeordnet werden können.

7.2.2.2 Die Struktur von T4L nach Adsorption auf der negativ geladenen Lipiddoppelschicht

Das Fehlen einer makroskopischen Orientierung der Proteine auf der Oberfläche lässt sich mit dem in Abschnitt 7.1 entwickelten Adsorptionsmechanismus in Übereinstimmung bringen. Nach den Ergebnissen aus Kapitel 5 sollte weder die Adsorption einer Drittelage noch ein Inselwachstum von Proteinaggregaten zu einer makroskopischen Ausrichtung der adsorbierten Protein

führen.

Der Vergleich der ESR-Spektren, die nach Adsorption von T4L bei niedrigen Ionenstärken erhalten wurden, mit denjenigen von 4R1 und 22R1 nach Zerfall auf der Quarzoberfläche spricht gegen eine Entfaltung von T4L auf der negativ geladenen Lipidoberfläche. Lediglich kleine Anteile sehr mobiler Komponenten in dem Spektrum von 131R1 deuten auf die Existenz eines marginalen Anteils entfalteter Spezies in der Umgebung von 131 hin. Trotzdem wird die Umgebung der untersuchten Stellen stark verändert, wie der Vergleich mit den ESR-Spektren des nativen Proteins in Lösung zeigt.

Dabei deutet die Immobilisierung des Spinmarkers an allen untersuchten Stellen auf die Ausbildung starker Wechselwirkungen mit der Umgebung hin. Da die untersuchten Mutanten sich hauptsächlich auf der Proteinoberfläche und an verschiedenen Seiten des Proteins befinden, liegt der Schluss nahe, dass intermolekulare Wechselwirkungen an der Immobilisierung von R1 beteiligt sind. Diese werden Kontakten mit der Lipidoberfläche und mit benachbarten Proteinen zugeschrieben.

Die auffallend ähnliche Linienform der Spektren von 4R1, 109R1 und 131R1, die auch dem Spektrum von 22R1 unterliegt, weist darauf hin, dass die Proteinstruktur auf der Oberfläche zu einem spezifischen Wechselwirkungsmuster der spinmarkierten Seitenkette führt. Die Interpretation der strukturellen Daten durch eine Proteinkonformation, die durch Protein-Protein-Wechselwirkungen bestimmt ist, ist konsistent mit der in Abschnitt 7.1 herausgearbeiteten Kooperativität des Adsorptionsprozesses, die ebenfalls der Beteiligung von Protein-Protein-Adhäsion an der Adsorption zugesprochen wurde.

Das dipolar verbreiterte Spektrum von 22R1-109R1 beweist durch die Wechselwirkung der Seitenketten von 22 und 109, dass auf der Oberfläche weiterhin eine Tertiärstruktur besteht. Dabei bewegt sich der Abstand zwischen diesen Stellen in dem Bereich, der auch dem nativen Protein zugänglich ist, wie die Abschätzung der möglichen Abstände ergibt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die tertiäre Struktur auf der Oberfläche weniger gut definiert ist als im nativen Protein und somit eine breitere konformelle Variation erlaubt. Dagegen wird der tertiäre Kontakt von R1 an der Stelle 150, der Anlass zu dem charakteristischen Spektrum des nativen 150R1 gibt und bereits durch die Wechselwirkung mit der neutralen Lipidoberfläche aufgeweitet wird, auf der negativ geladenen Lipidschicht zerstört (vgl. Abbildung 7.10). Die Vergrößerung der spektralen Breite weist, ähnlich wie die oben diskutierten Spektren, auf starke intermolekulare Wechselwirkungen von R1 hin. Nach Lösen des tertiären Kontakts ist die spinmarkierte Seitenkette nicht mehr im Innern des Helixbündels eingeschlossen und kann die Oberfläche der neuen Proteinstruktur erreichen. Auf diese Weise werden

Wechselwirkungen mit benachbarten Proteinen und der Oberfläche möglich, die eine Immobilisierung der spinmarkierten Seitenkette erklären.

Trotz der Ähnlichkeit der Spektren der adsorbierten Mutanten sind sie nicht vollständig identisch. Dies zeigt, dass die untersuchten Stellen unterschiedliche lokale Umgebungen haben bzw. sich an Proteinsegmenten mit verschiedener Dynamik des Proteinrückgrats befinden. Beides ist nur im Falle einer dreidimensionalen Struktur des Proteins möglich, wie sie bereits aus dem Fehlen sehr mobiler Komponenten in den Spektren und dem Fortbestand der dipolaren Kopplung zwischen 22R1 und 109R1 geschlossen wurde.

Damit wird deutlich, dass die Proteine auf der negativ geladenen Lipidschicht zwar dreidimensional gefaltet sind aber nicht in ihrer nativen Struktur vorliegen. Bei Adsorption bilden sie starke Wechselwirkungen untereinander aus. Dies steht sowohl im Gegensatz zu der Situation auf der neutralen Lipidschicht als auch zu derjenigen auf der Quarzoberfläche. Dort wurde entweder eine Denaturierung oder eine Beibehaltung der Sekundärstrukturelemente beobachtet. In der Literatur wurde eine derartige Destabilisierung von geladenen Proteinen nach Adsorption an entgegengesetzt geladenen Lipidoberflächen z.B. für die Adsorption von Cytochrom C an Phosphatidylglycerol enthaltende Lipidvesikel beschrieben, wo eine erniedrigte Denaturierungstemperatur nach Adsorption gefunden wurde [44]. Ebenso führt die Adsorption von HEW Lysozym an funktionalisierten Alkanthiolen zu einem Verlust der nativen Struktur [118]. Anhand der Verschiebung der Amidbanden in der ATR-IR-Spektren der adsorbierten Proteine wurde hier die Bildung von inter- und intramolekularen β -Faltblättern vorgeschlagen.

In den Spektren von 22R1 und 150 R1, die bei hohen Bedeckungen (> 3 ML) aufgenommen wurden, wird zudem konsistent mit den Ergebnissen aus Abschnitt 7.1 deutlich, dass sich verschiedene Spezies auf der Oberfläche befinden. Die ESR-Linienformanalyse beweist hier, dass die stark wechselwirkenden Spezies den irreversibel gebundenen Proteinen entsprechen. Somit können die Spezies, welche die charakteristischen ESR-Spektren breiter Linien und flacher Peaks liefern, als Proteinaggregate identifiziert werden. Dabei weisen die ähnlichen ESR-Linienformen der unterschiedlichen Stellen auf eine regelmäßige Struktur der Aggregate hin. Die desorptionslabileren Spezies zeigen ESR-Spektren, die eine Ähnlichkeit mit denen der nativen Mutanten aufweisen, wenn diese global beweglich sind. Eine globale Beweglichkeit ist für adsorbierte Proteine allerdings ausgeschlossen. Daher ist entweder die Tertiärstruktur der labil gebundenen Spezies derart flexibel, dass die Elemente der Proteinstruktur sehr beweglich sind, oder die in verschiedenen Orientierungen adsorbierten Proteine sind so mobil auf der Oberfläche, dass diese Situation im ESR-Spektrum einer Rotation in Lösung ähnelt. In beiden Fällen wechselwirken diese Spezies wesentlich schwächer mit der Umge-

bung als die irreversibel gebundenen Spezies. Dies lässt sich im Einklang mit dem in Abschnitt 7.1 entwickelten Adsorptionsmechanismus verstehen, nach dem die reversibel gebundenen Spezies durch Adsorption einzelner Proteine in den Zwischenräumen der Aggregate entstehen. Die ESR-Strukturanalyse zeigt nun, dass diese Bereiche keine derartige Strukturveränderungen einleiten können, wie sie nach Adsorption eines stabilen Proteinkerns erfolgt.

Die Struktur adsorbierten T4 Lysozyms wird entscheidend von der Abschirmung der elektrostatischen Wechselwirkungen während des Adsorptionsprozesses beeinflusst. So zeigen die Adsorptionsexperimente von 22R1 bei verschiedenen Ionenstärken, dass bei mittleren Ionenstärken (150 mM) in der Umgebung von 22R1 lediglich kleine strukturelle Veränderungen vorliegen, die sich in einer vergrößerten Linienbreite niederschlagen. Die Korrelation der strukturellen Daten mit der Untersuchung des Adsorptions- und Desorptionsverhaltens macht deutlich, dass bei Erniedrigung der Ionenstärke die erhöhte adsorbierbare Masse mit einem steigenden Anteil irreversibel gebundener Proteine und zugleich mit den strukturellen Veränderungen des Proteins einhergehen. Wie die Linienformanalyse der adsorbierten Proteine zeigt, ist die Änderung der Proteinstruktur mit einer Aggregation der Proteine verbunden. Dies verdeutlicht, dass der Einfluss der Elektrostatik auf die adsorbierte Menge weniger in der verstärkten Anbindung über die Protein-Lipidwechselwirkung, sondern vielmehr in der Initiierung struktureller Umwandlungen als Wegbereiter für Protein-Protein-Wechselwirkungen liegt. Demgegenüber wird auf der ebenfalls negativ geladenen Quarzoberfläche (s. Kapitel 6) auch bei geringen Ionenstärken keine stark kooperative Adsorption von T4L gefunden [68]. Dies verdeutlicht, dass das Adsorptionsverhalten von T4L auf der PC/PS Lipidschicht nicht erschöpfend durch die Anwesenheit eines über die Ionenstärke variierten Oberflächenpotenzials erklärt werden kann.

Um das qualitativ neue Verhalten der negativ geladenen Lipiddoppelschicht zu verstehen, muss auf die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts zurückgegriffen werden (s. Abschnitt 7.1). Hier wurde eine Entmischung der Lipide der Modellmembran in Anwesenheit des Proteins ermittelt, welche zu einer Anreicherung des negativ geladenen Lipids in der Umgebung des Proteins führt. Diese Bildung von Mikrodomänen in der Lipidschicht erhöht die lokale Ladungsdichte in der Nähe des Proteins und vervielfacht somit die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Oberfläche und dem Protein. Auf diese Weise wird der Einfluss der Ionenstärke auf das Protein überhöht und stellt eine Ursache der starken Abhängigkeit der Adsorptionseigenschaften von der Abschirmung des Elektrolyten dar. Voraussetzung für einen derartigen Mechanismus ist die laterale Mobilität der Oberfläche. Durch die Einbeziehung der Lipidschicht in die kooperative Wechselwirkung werden

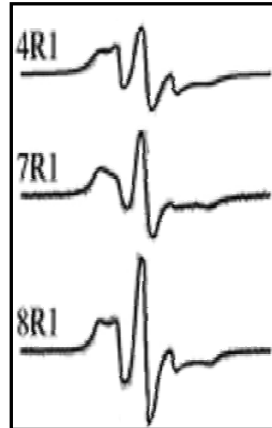


Abbildung 7.14: Reproduktion der ESR-Spektren des Alzheimer Amyloid- β -Peptid nach Markierung mit R1 an den angegebenen Positionen aus Torok et al. [131]

Konformationsumwandlungen des Proteins möglich, die einer irreversiblen Adsorption von Proteinen zu Agglomeraten den Weg bereiten. Die Kooperativität der Adsorption bis in den Multilagenbereich sowie die Einheitlichkeit der ESR-Spektren zeigen, dass hier bereits adsorbierte Proteine als Template für frisch adsorbierte Spezies fungieren. Indem letztere die Struktur der adsorbierten Proteine annehmen, wird eine kaskadenhafte Adsorption ermöglicht. Dieser Mechanismus bietet eine alternative Erklärung für die in der Literatur häufig diskutierte hohen Sättigungswerte für die Adsorption geladener Proteine auf geladenen Lipidschichten bei Erniedrigung der Ionenstärke unter nahezu gleichbleibender Anfangsbindungsenergie [11].

Einen interessanten Aspekt liefert zudem der Vergleich der Linienformen der hier erhaltenen ESR-Spektren mit denen, die Torok et al. für in vitro hergestellte β -Amyloid-Fibrillen publiziert haben [131]. Die ESR-Spektren von R1 an einer Vielzahl unterschiedlicher Positionen in der Sequenz des Peptids ähneln sich untereinander stark und weisen ebenfalls die verbreiterten Linienformen auf, die in diesem Abschnitt für das adsorbierte T4L diskutiert wurden. In Abbildung 7.14 sind exemplarisch drei dieser Spektren wiedergegeben. Fibrillen sind hochmolekulare Peptid-(bzw. Protein-) Aggregate, die durch intermolekulare Wechselwirkungen eine sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch geordnete Struktur aufbauen. Derartig missgefaltete Proteine sind an der Entwicklung von Krankheiten wie z.B. Alzheimer beteiligt.

Phosphatidylserin wird in jüngster Zeit im Zusammenhang mit der Initi-

ierung toxischer Proteinaggregate diskutiert. So wurde in neuronalen Membranen von Alzheimer-Patienten ein erhöhter Anteil an PS gefunden [141]. Zudem konnte durch Reaktion mit PS enthaltenden Vesikeln unter niedrigen Bedingungen Fibrillen von u.a. HEW Lysozym hergestellt werden [145]. Während *in vitro* stark saure und leicht hydrophobe Bedingungen zur Herstellung von Fibrillen benötigt werden, kann nach einem Vorschlag von Zhao et al. PS lokal die hohe Acidität und die Hydrophobizität liefern, die für die Bildung der hochmolekularen Aggregate benötigt werden [111].

Im Rahmen einer derartigen Konformation von T4L wären die in dieser Arbeit analysierten ESR-Spektren, die eine stark wechselwirkende Konformation der spinmarkierten Seitenkette reflektieren, nicht überraschend. Inwieweit die Aggregate, die hier bei Adsorption von T4L auf der negativ geladenen Lipiddoppelschicht beobachtet werden, die beschriebenen toxischen Strukturen darstellen, kann hier nicht geklärt werden, sondern sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

7.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel ist es gelungen, nicht nur wichtige Einblicke in die strukturellen Veränderungen zu geben, die das Modellprotein nach Adsorption auf einer negativ geladenen Lipiddoppelschicht erfährt, sondern ebenso die strukturellen Veränderungen der Modellmembran in Anwesenheit des Lipids zu charakterisieren. Dabei wurde deutlich, dass die Wechselwirkung zwischen T4 Lysozym und der negativ geladenen Modellmembran keinerlei Gemeinsamkeit mit derjenigen zwischen T4L und der ebenfalls negativ geladenen Quarzoberfläche zeigt.

Die Analyse der Modellmembran wies darauf hin, dass dieser Unterschied u.a. in der lateralen Mobilität der Modellmembran begründet ist, da somit eine strukturelle Antwort der Oberfläche auf die Proteinadsorption möglich wird. Mit Hilfe einer qualitativen Linienformanalyse der ESR-Spektren der spinmarkierten Lipiddoppelschichten konnte gezeigt werden, dass bei Adsorption des Proteins eine Phasentrennung des Lipidgemischs stattfindet. Hierbei initiiert die Adsorption des positiv geladenen T4 Lysozym eine Akkumulation der negativ geladenen Lipide. Die elektrostatische Wechselwirkung des Proteins mit der Oberfläche führt zu einer Strukturumwandlung des Proteins, die weitere Proteinadsorption über Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht. Somit findet ausgehend von einem Proteinkeim Inselwachstum irreversibel adsorbierter, strukturell veränderter Proteinaggregate statt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorherigen Kapitel befinden sich die adsorbierten Proteine weder in ihrer nativen Konformation noch sind sie denaturiert. Die qualitative Linienformanalyse der ESR-Spektren der adsorbierten Proteine ergab vielmehr, dass T4 Lysozym auf der negativ geladenen Lipidoberfläche eine intermediäre Struktur dreidimensional organisierter Proteinaggregate bildet. Dabei zeigen sich Ähnlichkeiten der ESR-Spektren mit denen fibrillarer Strukturen.

Zukünftige Untersuchungen sollten klären, ob die hier gefundenen Proteinaggregate fibrillarer Natur sind. Hier sollten Mikroskopie-Techniken, wie z.B. die Rasterkraft- oder Fluoreszenzmikroskopie, die Möglichkeit bieten, die Proteinagglomerate abzubilden. Diese Methoden können ebenfalls genutzt werden, um den Mechanismus der proteininduzierten Domänenbildung zu verifizieren. Darüber hinaus wäre die Verwendung spinmarkierter Phosphatidylserine – die allerdings nicht käuflich erhältlich sind – von Interesse [56]. Durch Analyse der dipolaren Kopplung wäre hiermit ein ESR-spektroskopischer Nachweis von Lipidanreicherungen geringer Durchmesser möglich.

Kapitel 8

Zusammenfassung

Ein grundlegendes Verständnis der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Oberflächen setzt eine detaillierte Kenntnis der Struktur des gesamten Grenzflächensystems voraus. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen den physikalischen und chemischen Eigenschaften verschiedener Oberflächen und der strukturellen Antwort des adsorbierten Modellproteins, T4 Lysozym, untersucht. Hierfür wurde die ESR-Spektroskopie unter Verwendung der Site-directed Spin Labeling (SDSL) Technik auf die Analyse des Grenzflächensystems, bestehend aus einer planaren Oberfläche und adsorbierten Proteinen, ausgeweitet.

Im Zuge der Charakterisierung der verwendeten Modellmembrane konnte gezeigt werden, dass die qualitative und quantitative Linienformanalyse der ESR-Spektren spinmarkierter quarzgestützter Lipiddoppelschichten ein detailliertes Verständnis der Struktur und Dynamik dieser Modellmembrane erlauben. Zur quantitativen Linienformanalyse wurden Simulationen im Rahmen zweier in der Literatur beschriebenen Modelle – dem mathematisch einfacheren Modell für schnelle Bewegungen der Spinmarker (auf der Zeitskala der ESR) sowie den Simulationen auf der Basis der quantenmechanischen Beschreibung langsamer Bewegungen durch die stochastische Liouville-Gleichung (SLE) – durchgeführt. Anhand dieses Vergleichs konnte die unterschiedliche Güte der Modelle diskutiert und ein konsistentes Bild der physikalischen Eigenschaften der Modellmembrane gezeichnet werden: So liegen diese als planare, orientierte Lipiddoppelschichten vor, die sich in der flüssigen Phase befinden. Weiterhin bietet der Unordnungsparameter beider Simulationsmodelle die Möglichkeit, die Anzahl der Fehlstellen zu parametrisieren und die experimentellen Bedingungen zur Darstellung maximal geordneter Modellmembrane unterschiedlicher chemischer Eigenschaften zu optimieren.

Ausgangspunkt der ESR-spektroskopischen Strukturuntersuchung adsorbierter Proteine war die Immobilisierung einer vektoriell orientierten Prote-

inmonolage durch spezifische Adsorption von T4 Lysozym an eine zwitterionische Modellmembran, die über die Komplexbildung eines Chelatorlipid und dem Histidinanker des Proteins erfolgte. Zur Aufklärung der Sekundär- und Tertiärstruktur sowie der Orientierung der Proteine auf der Oberfläche wurde die Methode der quantitativen Linienformanalyse der ESR-Spektren spinmarkierter Proteinen durch SLE-Simulationen um die Beschreibung polar geordneter Adsorbate erweitert. Basierend auf einem in der Literatur beschriebenen Bewegungsmodell der spinmarkierten Seitenkette R1 an Helixoberflächen, konnte hiermit durch Markierung verschiedener Helices und Simulation der winkelabhängigen Spektren die Orientierung des Proteins relativ zur Oberfläche ermittelt werden. Durch Vergleich der Fitparameter vor und nach der Adsorption konnte die Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur im Detail verfolgt werden. Hierbei haben sich insbesondere solche Bindungsstellen, an denen R1 im Kontakt mit weiteren Seitenketten steht (z.B. T4L 150R1), als sensitive Sonden für konformelle Änderungen des adsorbierten Proteins bewährt.

Drastischere strukturelle Veränderungen des neunfach positiv geladenen T4 Lysozyms werden durch die Wechselwirkung mit einer negativ geladenen, rigiden Quarzoberfläche eingeleitet. Die qualitative Analyse der ESR-Linienformen von R1 an verschiedenen Stellen des Proteins konnte die Entfaltung der N-terminalen Domäne des kleinen globulären T4 Lysozyms aufzeigen, während die C-terminale Domäne intakt adsorbiert und lediglich in ihrer Tertiärstruktur modifiziert wird. Da keine Hinweise auf einen Kontakt des C-terminalen Teils des Proteins mit der Oberfläche gefunden wurden, obwohl diese mehr Regionen hoher positiver Ladungsdichte beinhaltet als die N-terminale Domäne, wurde das Adsorptionsverhalten maßgeblich auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückgeführt. Diese Analyse verdeutlicht den Nutzen der ausgezeichneten örtlichen Auflösung des SDSL als Sondentechnik, die erstmals den Zugang zu einem mikroskopischen Bild der Struktur eines Lysozyms auf einer Quarzoberfläche ermöglichte.

Demgegenüber ergab die Untersuchung der Adsorption von T4 Lysozym auf einer ebenfalls negativ geladenen, aber fluiden Modellmembran, die 25% Phosphatidylserin enthält, eine vollständig andere Situation. Hier reagiert sowohl die Struktur der Lipidschicht als auch des adsorbierten Proteins auf die Grenzflächenwechselwirkung, wie mit Hilfe der Linienformanalyse der ESR-Spektren der Lipidschicht und des Proteins bei Adsorption verdeutlicht werden konnte. Dabei wurde eine starke Abhängigkeit des Grenzflächensystems von der elektrostatischen Abschirmung beobachtet. Bereits bei hohen Ionenstärken wird durch die Wechselwirkung mit dem adsorbierten Protein eine Phasenseparation der Modellmembran eingeleitet, in der sich die Lipide in eine phosphatidylserinreiche Phase – welche die Chelatorlipide enthält – und

eine phosphatidylcholinreiche Phase trennen. Die Proteine werden hier lediglich im Submonolagenbereich adsorbiert und zeigen keine strukturellen Veränderungen. Bei sehr niedrigen Ionenstärken hingegen initiieren stärkere elektrostatische Wechselwirkungen zwischen T4 Lysozym und der Oberfläche eine Strukturumwandlung des Proteins, die eine kooperative Adsorption von Proteinmultilagen ermöglicht. Mit Hilfe der qualitativen Linienformanalyse der ESR-Spektren konnten hier drastische Strukturveränderungen der Proteine nachvollzogen werden, die jedoch nicht einem vollständigen Verlust der Sekundärstruktur sondern der Bildung von Proteinaggregaten auf der Oberfläche zugeschrieben wurden. Hierbei ergaben sich Hinweise darauf, dass diese Aggregate Ähnlichkeiten mit fibrillaren Strukturen haben, die an der Ausbildung von Krankheiten wie z.B. Alzheimer beteiligt sind. Die weitere Klärung der Natur der beobachteten Proteinaggregate auf den negativ geladenen Lipiddoppelschichten ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten, für die abbildende Techniken wie z.B. Rasterkraftmikroskopie benötigt werden.

Eine Fortentwicklung der ESR-spektroskopischen Mittel zur Untersuchung adsorbierter Proteine sollte sich in erster Linie auf alternative Methoden zur Bestimmung von Proteinorientierungen ausrichten, die ohne die Annahme eines Bewegungsmodells für die spinmarkierte Seitenkette auskommen. Diese Möglichkeit böte eine geeignete Analyse der richtungsabhängigen dipolaren Kopplung zweier Spins doppelt mutierter Proteine. Darüber hinaus liegt eine Weiterentwicklung in der Verwendung bidentaler Spinmarker. Hier wird eine rigide Verankerung des Nitroxids und damit eine starre Konformation des p-Orbitals, in dem sich das freie Elektron befindet, erwartet, deren Orientierung direkt mit der Ausrichtung der markierten Helix korrelierbar sein sollte.

Literaturverzeichnis

- [1] ALTENBACH, C. ; OH, K.-J. ; TRABANINO, R. J. ; HIDEG, K. ; HUBBELL, W. L.: Estimation of inter-residue distances in spin labeled proteins at physiological temperatures: Experimental strategies and practical limitations. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 51, S. 15471–15482
- [2] ATHERTON, N. : *Principles of Electron Spin Resonance*. New York : Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 1993
- [3] BALL, A. ; JONES, R. A. L.: Conformational changes in adsorbed proteins. In: *Langmuir* 11 (1995), Nr. 9, S. 3542–3548
- [4] BARENHOLZ, Y. ; GIBBES, D. ; LITMAN, B. J. ; GOLL, J. ; THOMPSON, T. E. ; CARLSON, R. D.: A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. In: *Biochemistry* 16 (1977), Nr. 12, S. 2806–10
- [5] BECKENDORF, M. : *Simulationen und Experimente zur Elektronenspinresonanz von kondensiertem Stickstoffdioxid auf Einkristalloberflächen im Ultrahochvakuum*, Ruhr-Universität Bochum, Diss., 1994
- [6] BECKENDORF, M. ; KATTER, U. J. ; RISSE, T. ; SCHLIENZ, H. ; FREUND, H.-J. : Orientation and dynamics of NO₂ in a N₂O₄ host matrix prepared on a plane surface investigated by ESR line shape analysis. In: *J. Phys. Chem.* 100 (1996), Nr. 22, S. 9242–9246
- [7] BELL, J. A. ; WILSON, K. P. ; ZHANG, X. J. ; FABER, H. R. ; NICHOLSON, H. ; MATTHEWS, B. W.: Comparison of the crystal-structure of Bacteriophage T4-Lysozyme at low, medium, and high ionic strengths. In: *Proteins: Struct., Funct., Gen.* 10 (1991), Nr. 1, S. 10–21
- [8] BERGE, B. ; LENNE, P. F. ; RENAULT, A. : X-ray grazing incidence diffraction on monolayers at the surface of water. In: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 3 (1998), Nr. 3, S. 321–326

- [9] BILLSTEN, P. ; WAHLGREN, M. ; ARNEBRANT, T. ; MCGUIRE, J. ; ELWING, H. : Structural changes of T4 Lysozyme upon adsorption to silica nanoparticles measured by Circular-Dichroism. In: *J. Colloid Interface Sci.* 175 (1995), Nr. 1, S. 77–82
- [10] BOGGS, J. M.: Lipid intermolecular hydrogen-bonding - influence on structural organization and membrane-function. In: *Biochim. Biophys. Acta* 906 (1987), Nr. 3, S. 353–404
- [11] BRADLEY, A. J. ; MAURER-SPUREJ, E. ; BROOKS, D. E. ; DEVINE, D. V.: Unusual electrostatic effects on binding of C1q to anionic liposomes: Role of anionic phospholipid domains and their line tension. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 25, S. 8112–8123
- [12] BRISSON, A. ; MOSSER, G. ; HUBER, R. : Structure of soluble and membrane-bound human Annexin V. In: *J. Mol. Biol.* 220 (1991), Nr. 2, S. 199–204
- [13] BROWNING, J. L. ; SEELIG, J. : Bilayers of Phosphatidylserine - Deuterium and Phosphorus Nuclear Magnetic-Resonance study. In: *Biochemistry* 19 (1980), Nr. 6, S. 1262–1270
- [14] BUDIL, D. E. ; LEE, S. ; SAXENA, S. ; FREED, J. H.: Nonlinear-Least-Squares Analysis of slow-motion EPR spectra in one and two Dimensions using a Modified Levenberg-Marquardt algorithm. In: *J. Magn. Reson. Series A.* 120 (1996), Nr. 2, S. 155–189
- [15] CASAL, H. L. ; MANTSCH, H. H. ; PALTAUF, F. ; HAUSER, H. : Infrared and P-31-NMR studies of the effect of Li⁺ And Ca²⁺ on Phosphatidylserines. In: *Biochim. Biophys. Acta* 919 (1987), Nr. 3, S. 275–286
- [16] CASCALES, J. J. L. ; DELATORRE, J. G. ; MARRINK, S. J. ; BERENDSEN, H. J. C.: Molecular dynamics simulation of a charged biological membrane. In: *J. Chem. Phys.* 104 (1996), Nr. 7, S. 2713–2720
- [17] CASTNER, D. G. ; RATNER, B. D.: Biomedical Surface Sciences: Foundations to frontiers. In: *Surf. Sci.* 500 (2002), Nr. 1-3, S. 28–60
- [18] CHAPMAN, R. G. ; OSTUNI, E. ; YAN, L. ; WHITESIDES, G. M.: Preparation of mixed self-assembled monolayers (SAMs) that resist adsorption of proteins using the reaction of amines with a SAM that presents interchain carboxylic anhydride groups. In: *Langmuir* 16 (2000), Nr. 17, S. 6927–6936

- [19] COLUMBUS, L. ; HUBBELL, W. L.: A new spin on protein dynamics. In: *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002), Nr. 6, S. 288–295
- [20] COLUMBUS, L. ; HUBBELL, W. L.: Mapping backbone dynamics in solution with site-directed spin labeling: GCN4-58 bZip free and bound to DNA. In: *Biochemistry* 43 (2004), Nr. 23, S. 7273–7287
- [21] COLUMBUS, L. ; KALAI, T. ; JEKOE, J. ; HIDEG, K. ; HUBBELL, W. L.: Molecular motion of spin labeled side chains in α -helices: Analysis by variation of side chain structure. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 13, S. 3828–3846
- [22] CREIGHTON, T. : *Proteins*. New York : W.H. Freeman, 1993
- [23] CREMER, P. S. ; BOXER, S. G.: Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. In: *J. Phys. Chem. B* 103 (1999), Nr. 13, S. 2554–2559
- [24] CZESLIK, C. : Factors ruling protein adsorption. In: *Z. Phys. Chem. - International Journal of Research in Physical Chemistry and Chemical Physics* 218 (2004), Nr. 7, S. 771–801
- [25] CZESLIK, C. ; WINTER, R. : Effect of temperature on the conformation of Lysozyme adsorbed to silica particles. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001), Nr. 2, S. 235–239
- [26] DENISOV, G. ; WANASKI, S. ; LUAN, P. ; GLASER, M. ; MCLAUGHLIN, S. : Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids Phosphatidylserine and Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: An electrostatic model and experimental results. In: *Biophys. J.* 74 (1998), Nr. 2, S. 731–744. – Part 1
- [27] DER-SARKISSIAN, A. ; JAO, C. ; CHEN, J. ; LANGEN, R. : Structural organization of α -synuclein fibrils studied by site-directed spin labeling. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), Nr. 39, S. 37530–37535
- [28] DORN, I. T. ; NEUMAIER, K. R. ; TAMPE, R. : Molecular recognition of histidine-tagged molecules by metal-chelating lipids monitored by fluorescence energy transfer and correlation spectroscopy. In: *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998), Nr. 12, S. 2753–2763
- [29] DUBOIS, L. H. ; ZEGARSKI, B. R. ; NUZZO, R. G.: Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 2. Interaction of secondary adsorbates with chemically textured organic monolayers. In: *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990), Nr. 2, S. 570–579

- [30] EDMISTON, P. L. ; SAAVEDRA, S. S.: Molecular orientation distributions in protein films: III. Yeast Cytochrome C immobilized on pyridyl disulfide-capped phospholipid bilayers. In: *Biophys. J.* 74 (1998), Nr. 2, S. 999–1006. – Part 1
- [31] EING, A. ; JANSHOFF, A. ; GALLA, H. J. ; BLOCK, C. ; STEINEM, C. : Quantification of the Raf-C1 interaction with solid-supported bilayers. In: *ChemBiochem* 3 (2002), Nr. 2-3, S. 190–197
- [32] FARAHBAKHS, Z. T. ; HIDEG, K. ; HUBBELL, W. L.: Photoactivated conformational changes in Rhodopsin - a time-resolved spin-label study. In: *Science* 262 (1993), Nr. 5138, S. 1416–1419
- [33] FLEISSNER, M. ; CASCIO, D. ; HUBBELL, W. : persönliche Mitteilung.
- [34] GAFFNEY, B. J. ; MCCONNELL, H. M.: The paramagnetic resonance spectra of spin labels in phospholipid membranes. In: *J. Magn. Res.* 16 (1974), S. 1
- [35] GE, M. T. ; BUDIL, D. E. ; FREED, J. H.: An Electron-Spin-Resonance study of interactions between Phosphatidylcholine and Phosphatidylserine in oriented membranes. In: *Biophys. J.* 66 (1994), Nr. 5, S. 1515–1521
- [36] GE, M. T. ; FREED, J. H.: An Electron-Spin-Resonance study of interactions between Gramicidin-A' and Phosphatidylcholine bilayers. In: *Biophys. J.* 65 (1993), Nr. 5, S. 2106–2123
- [37] GE, M. T. ; GIDWANI, A. ; BROWN, H. A. ; HOLOWKA, D. ; BAIRD, B. ; FREED, J. H.: Ordered and disordered phases coexist in plasma membrane vesicles of RBL-2H3 mast cells. An ESR study. In: *Biophys. J.* 85 (2003), Nr. 2, S. 1278–1288
- [38] GORDY, W. : *Theory and applications of Electron Spin Resonance.* New York, 1980
- [39] GOTO, N. K. ; SKRYNNIKOV, N. R. ; DAHLQUIST, F. W. ; KAY, L. E.: What is the average conformation of bacteriophage T4 Lysozyme in solution? A domain orientation study using dipolar couplings measured by solution NMR. In: *J. Mol. Biol.* 308 (2001), Nr. 4, S. 745–764
- [40] GRANT, C. W. M. ; WU, S. H. W. ; M., M. : Lateral phase separations in binary lipid mixtures - correlation between spin label and freeze-fracture electron-microscopic studies. In: *Biochim. Biophys. Acta* 363 (1974), Nr. 2, S. 151–158

- [41] GREENLER, R. : Infrared study of adsorbed molecules on metal surfaces by reflection techniques. In: *J. Chem. Phys.* 44 (1966), Nr. 1, S. 310–315
- [42] HAMAKER, H. : In: *Physica* 4 (1937), S. 1058–1072
- [43] HARDER, P. ; GRUNZE, M. ; DAHINT, R. ; WHITESIDES, G. M. ; LAIBINIS, P. E.: Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. In: *J. Phys. Chem. B* 102 (1998), Nr. 2, S. 426–436
- [44] HEIMBURG, T. ; MARSH, D. : Protein surface-distribution and protein-protein interactions in the binding of peripheral proteins to charged lipid-membranes. In: *Biophys. J.* 68 (1995), Nr. 2, S. 536–546
- [45] HEITZ, F. ; VAN MAU, N. : Protein structural changes induced by their uptake at interfaces. In: *Biochim. Biophys. Acta -Protein Structure and Molecular Enzymology* 1597 (2002), Nr. 1, S. 1–11
- [46] HENDRICKSON, H. ; FULLINGTON, J. : Stabilities of metal complexes of phospholipids - Ca(2), Mg(2) and Ni(2) complexes of Phosphatidylserine and Triphosphoinositide. In: *Biochemistry* 4 (1965), Nr. 8, S. 1599–1605
- [47] HERBST, A. : *Theoretische Untersuchungen zur Dynamik der Seitenketten spingelabelter Proteine*, FU Berlin, Diplomarbeit, 2003
- [48] HERRWERTH, S. ; ECK, W. ; REINHARDT, S. ; GRUNZE, M. : Factors that determine the protein resistance of oligoether self-assembled monolayers - Internal hydrophilicity, terminal hydrophilicity, and lateral packing density. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), Nr. 31, S. 9359–9366
- [49] HUANG, J. Y. ; SWANSON, J. E. ; DIBBLE, A. R. G. ; HINDERLITER, A. K. ; FEIGENSON, G. W.: Nonideal mixing of Phosphatidylserine and Phosphatidylcholine in the fluid lamellar phase. In: *Biophys. J.* 64 (1993), Nr. 2, S. 413–425
- [50] HUBBELL, W. L. ; MCCONNELL, H. M.: Orientation and motion of amphiphilic spin labels in membranes. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.A.* 64 (1969), Nr. 1, S. 20–27
- [51] HUBBELL, W. L. ; CAFISO, D. S. ; ALTENBACH, C. : Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. In: *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000), Nr. 9, S. 735–739

- [52] HUBBELL, W. L. ; GROSS, A. ; LANGEN, R. ; LIETZOW, M. A.: Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 (1998), Nr. 5, S. 649–656
- [53] HUSTEDT, E. J. ; SMIRNOV, A. I. ; LAUB, C. F. ; COBB, C. E. ; BETH, A. H.: Molecular distances from dipolar coupled spin-labels: The global analysis of multifrequency continuous wave electron paramagnetic resonance data. In: *Biophys. J.* 72 (1997), Nr. 4, S. 1861–1877
- [54] ISAS, J. M. ; LANGEN, R. ; HAIGLER, H. T. ; HUBBELL, W. L.: Structure and dynamics of a helical hairpin and loop region in Annexin 12: A site-directed spin labeling study. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 5, S. 1464–1473
- [55] ISRAELACHVILI, J. : *Intermolecular and Surface Forces*. London : Academic Press, 1992
- [56] ITO, T. ; OHNISHI, S. ; ISHINAGA, M. ; KITO, M. : Synthesis of a new Phosphatidylserine spin-label and Calcium-induced lateral phase separation in Phosphatidylserine-Phosphatidylcholine membranes. In: *Biochemistry* 14 (1975), Nr. 14, S. 3064–3069
- [57] JENSEN, B. ; KLEPPE, G. ; SCHINDLER, M. ; MIRELMAN, D. : Specificity requirements of Bacteriophage-T4 Lysozyme. In: *Eur. J. Biochem.* 66 (1976), Nr. 2, S. 319–325
- [58] KALB, E. ; FREY, S. ; TAMM, L. K.: Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported Phospholipid monolayers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1103 (1992), Nr. 2, S. 307–316
- [59] KELLER, C. A. ; GLASMASTAR, K. ; ZHDANOV, V. P. ; KASEMO, B. : Formation of supported membranes from vesicles. In: *Phys. Rev. Lett.* 84 (2000), Nr. 23, S. 5443–5446
- [60] KIM, D. T. ; BLANCH, H. W. ; RADKE, C. J.: Direct imaging of Lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy. In: *Langmuir* 18 (2002), Nr. 15, S. 5841–5850
- [61] KUROKI, R. ; WEAVER, L. H. ; MATTHEWS, B. W.: A covalent enzyme-substrate intermediate with saccharide distortion in a mutant T4 Lysozyme. In: *Science* 262 (1993), Nr. 5142, S. 2030–2033
- [62] LAHIRI, J. ; ISAACS, L. ; GRZYBOWSKI, B. ; CARBECK, J. D. ; WHITESIDES, G. M.: Biospecific binding of carbonic anhydrase to mixed SAMs

- presenting benzenesulfonamide ligands: A model system for studying lateral steric effects. In: *Langmuir* 15 (1999), Nr. 21, S. 7186–7198
- [63] LAIBINIS, P. E. ; WHITESIDES, G. M. ; ALLARA, D. L. ; TAO, Y. T. ; PARIKH, A. N. ; NUZZO, R. G.: Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of normal-alkanethiols on the coinage metal-surfaces, Cu, Ag, Au. In: *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), Nr. 19, S. 7152–7167
- [64] LANGE, A. ; MARSH, D. ; WASSMER, K. H. ; MEIER, P. ; KOTHE, G. : Electron-Spin Resonance study of phospholipid-membranes employing a comprehensive line-shape model. In: *Biochemistry* 24 (1985), Nr. 16, S. 4383–4392
- [65] LANGEN, I. M. ; HUBBELL, W. ; HAIGLER, H. : A transmembrane form of Annexin XII detected by site-directed spin labeling. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998), Nr. 24, S. 14060–14065
- [66] LANGEN, R. ; OH, K. J. ; CASCIO, D. ; HUBBELL, W. L.: Crystal structures of spin labeled T4 Lysozyme mutants: Implications for the interpretation of EPR spectra in terms of structure. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 29, S. 8396–8405
- [67] LANGNER, M. ; KUBICA, K. : The electrostatics of lipid surfaces. In: *Chem. Phys. Lipids* 101 (1999), Nr. 1, S. 3–35
- [68] LEE, W. K. ; MCGUIRE, J. ; BOTHWELL, M. K.: Concentration effects on adsorption of Bacteriophage T4 lysozyme stability variants to silica. In: *J. Colloid Interface Sci.* 252 (2002), Nr. 2, S. 473–476
- [69] LEE, W. K. ; MCGUIRE, J. ; BOTHWELL, M. K.: Competitive adsorption of Bacteriophage T4 Lysozyme stability variants at hydrophilic glass surfaces. In: *J. Colloid Interface Sci.* 269 (2004), Nr. 1, S. 251–254
- [70] LEWIS, R. ; MCELHANEY, R. N.: Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior of lipid bilayer model membranes composed of a homologous series of linear saturated Phosphatidylserines. In: *Biophys. J.* 79 (2000), Nr. 4, S. 2043–2055
- [71] LIBERTINI, L. J. ; GRIFFITH, O. H.: Orientation dependence of the Electron Spin Resonance spectrum of Di-t-butyl-Nitroxide. In: *J. Chem. Phys.* 53 (1970), S. 1359

- [72] LIETZOW, M. A. ; HUBBELL, W. L.: Motion of spin label side chains in Cellular Retinol-binding Protein: Correlation with structure and nearest-neighbor interactions in an antiparallel beta-sheet. In: *Biochemistry* (2004)
- [73] LIVSHITS, V. A. ; MARSH, D. : Simulation studies of high-field EPR spectra of spin-labeled lipids in membranes. In: *J. Magn. Reson.* 147 (2000), Nr. 1, S. 59–67
- [74] LLINAS, M. ; GILLESPIE, B. ; DAHLQUIST, F. W. ; MARQUSEE, S. : The energetics of T4 Lysozyme reveal a hierarchy of conformations. In: *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999), Nr. 11, S. 1072–1078
- [75] LLINAS, M. ; MARQUSEE, S. : Subdomain interactions as a determinant in the folding and stability of T4 Lysozyme. In: *Protein Science* 7 (1998), Nr. 1, S. 96–104
- [76] LOVELL, S. C. ; WORD, J. M. ; RICHARDSON, J. S. ; RICHARDSON, D. C.: The penultimate rotamer library. In: *Proteins: Struct., Funct., Gen.* 40 (2000), Nr. 3, S. 389–408
- [77] LU, M. ; SHU, W. ; JI, H. ; SPEK, E. ; WANG, L. Y. ; KALLENBACH, N. R.: Helix capping in the GCN4 leucine zipper. In: *J. Mol. Biol.* 288 (1999), Nr. 4, S. 743–752
- [78] MACDONALD, I. D. G. ; SMITH, W. E.: Orientation of Cytochrome C adsorbed on a citrate-reduced silver colloid surface. In: *Langmuir* 12 (1996), Nr. 3, S. 706–713
- [79] MACDONALD, R. C. ; MACDONALD, R. I. ; MENCO, B. P. M. ; TAKESHITA, K. ; SUBBARAO, N. K. ; HU, L. R.: Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1061 (1991), Nr. 2, S. 297–303
- [80] MALMBERG, N. J. ; VAN BUSKIRK, D. R. ; FALKE, J. J.: Membrane-docking loops of the cPLA2 C2 domain: Detailed structural analysis of the protein-membrane interface via site-directed spin-labeling. In: *Biochemistry* 42 (2003), Nr. 45, S. 13227–13240
- [81] MARSH, D. : Experimental methods in spin-label spectral analysis. In: BERLINER, L. (Hrsg.) ; REUBEN, J. (Hrsg.): *Spin Labeling Theory and Applications*. New York : Plenum Press, 1989, S. 255–304

- [82] MARSH, D. ; HORVATH, L. I.: Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin-labelling. In: *Biochim. Biophys. Acta -Reviews on Biomembranes* 1376 (1998), Nr. 3, S. 267–296
- [83] MASON, R. P. ; FREED, J. H.: Estimating microsecond rotational correlation times from lifetime broadening of nitroxide Electron-Spin Resonance-spectra near rigid limit. In: *J. Phys. Chem.* 78 (1974), Nr. 13, S. 1321–1323
- [84] MASTE, M. C. L. ; NORDE, W. ; VISSER, A. J. W. G.: Adsorption-induced conformational changes in the Serine Proteinase Savinase: A tryptophan fluorescence and Circular Dichroism study. In: *J. Colloid Interface Sci.* 196 (1997), Nr. 2, S. 224–230
- [85] MATSUMURA, M. ; WOZNIAK, J. A. ; DAOPIN, S. ; MATTHEWS, B. W.: Structural studies of mutants of T4 Lysozyme that alter hydrophobic stabilization. In: *J. Biol. Chem.* 264 (1989), Nr. 27, S. 16059–16066
- [86] MBAMALA, E. ; BEN-SHAUL, A. ; MAY, S. : Domain formation induced by the adsorption of charged proteins on mixed lipid membranes. In: *Biophys. J.* 88 (2005), Nr. 3, S. 1702–1714
- [87] MCCONNELL, H. M. ; VRLJIC, M. : Liquid-liquid immiscibility in membranes. In: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32 (2003), S. 469–492
- [88] MCGUIRE, J. ; KRISDHASIMA, V. ; WAHLGREN, M. ; ARNEBRANT, T. : Comparative adsorption studies with synthetic, structural stability and charge mutants of Bacteriophage T4 Lysozyme. In: HORBETT, T. (Hrsg.) ; BRASH, J. (Hrsg.): *Proteins at Interfaces II* Bd. 602. Washington : ACS Symposium Series, 1995, S. 52–65
- [89] MCGUIRE, J. ; WAHLGREN, M. C. ; ARNEBRANT, T. : The influence of net charge and charge location on the adsorption and Dodecyltrimethylammonium bromide-mediated elutability of Bacteriophage-T4 Lysozyme at silica surfaces. In: *J. Colloid Interface Sci.* 170 (1995), Nr. 1, S. 193–202
- [90] MCGUIRE, J. ; WAHLGREN, M. C. ; ARNEBRANT, T. : Structural stability effects on the adsorption and Dodecyltrimethylammonium bromide-mediated elutability of Bacteriophage-T4 Lysozyme at silica surfaces. In: *J. Colloid Interface Sci.* 170 (1995), Nr. 1, S. 182–192

- [91] MCHAOURAB, H. S. ; KALAI, T. ; HIDEK, K. ; HUBBELL, W. L.: Motion of spin-labeled side chains in T4 Lysozyme: Effect of side chain structure. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 10, S. 2947–2955
- [92] MCHAOURAB, H. S. ; LIETZOW, M. A. ; HIDEK, K. ; HUBBELL, W. L.: Motion of spin-labeled side chains in T4 Lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nr. 24, S. 7692–7704
- [93] MCHAOURAB, H. S. ; OH, K. J. ; FANG, C. J. ; HUBBELL, W. L.: Conformation of T4 Lysozyme in solution. Hinge-bending motion and the substrate-induced conformational transition studied by Site-Directed Spin Labeling. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 2, S. 307–316
- [94] MERIANOS, H. J. ; CADIEUX, N. ; LIN, C. H. ; KADNER, R. J. ; CAFISO, D. S.: Substrate-induced exposure of an energy-coupling motif of a membrane transporter. In: *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000), Nr. 3, S. 205–209
- [95] MOZZI, R. ; BURATTA, S. ; GORACCI, G. : Metabolism and functions of Phosphatidylserine in mammalian brain. In: *Neurochem. Res.* 28 (2003), Nr. 2, S. 195–214
- [96] MURGIDA, D. H. ; HILDEBRANDT, P. : Electron-transfer processes of cytochrome c at interfaces. New insights by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy. In: *Acc. Chem. Res.* 37 (2004), Nr. 11, S. 854–861
- [97] NOINVILLE, S. ; BRUSTON, F. ; EL AMRI, C. ; BARON, D. ; NICOLAS, P. : Conformation, orientation, and adsorption kinetics of Dermaseptin B2 onto synthetic supports at aqueous/solid interface. In: *Biophys. J.* 85 (2003), Nr. 2, S. 1196–1206
- [98] OHVO-REKILA, H. ; RAMSTEDT, B. ; LEPPIMAKI, P. ; SLOTTE, J. P.: Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. In: *Progress in Lipid Research* 41 (2002), Nr. 1, S. 66–97
- [99] PANDIT, S. A. ; BERKOWITZ, M. L.: Molecular dynamics simulation of Dipalmitoylphosphatidylserine bilayer with Na⁺ counterions. In: *Biophys. J.* 82 (2002), Nr. 4, S. 1818–1827
- [100] PAP, E. H. W. ; HOUBIERS, M. C. ; SANTEMA, J. S. ; VANHOEK, A. ; VISSER, A. : Quantitative fluorescence analysis of the adsorption of Lysozyme to phospholipid vesicles. In: *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 24 (1996), Nr. 4, S. 223–231

- [101] PERRENOUD-RINUY, J. ; BREVET, P. F. ; GIRAULT, H. H.: Second harmonic generation study of Myoglobin and Hemoglobin and their protoporphyrin IX chromophore at the water/1,2-dichloroethane interface. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (2002), Nr. 19, S. 4774–4781
- [102] PETRACHE, H. I. ; TRISTRAM-NAGLE, S. ; GAWRISCH, K. ; HARRIES, D. ; PARSESIAN, V. A. ; NAGLE, J. F.: Structure and fluctuations of charged Phosphatidylserine bilayers in the absence of salt. In: *Biophys. J.* 86 (2004), Nr. 3, S. 1574–1586
- [103] PORTER, M. D. ; BRIGHT, T. B. ; ALLARA, D. L. ; CHIDSEY, C. E. D.: Spontaneously organized molecular assemblies.4. Structural characterization of normal-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, Infrared-Spectroscopy, and electrochemistry. In: *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987), Nr. 12, S. 3559–3568
- [104] PRIME, K. L. ; WHITESIDES, G. M.: Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. In: *Science* 252 (1991), Nr. 5010, S. 1164–7
- [105] QU, K. ; VAUGHN, J. ; SIENKIEWICZ, A. ; SCHOLE, C. ; FETROW, J. : Kinetics and motional dynamics of spin-labeled Yeast Iso-1-cytochrome c: Stopped-flow Electron Paramagnetic Resonance as a probe for protein folding/ unfolding of the C-terminal helix spin-labeled at cysteine 102. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 10, S. 2884–2897
- [106] RABENSTEIN, M. D. ; SHIN, Y.-K. : Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995), Nr. 18, S. 8239–43
- [107] RADLER, J. ; STREY, H. ; SACKMANN, E. : Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces. In: *Langmuir* 11 (1995), Nr. 11, S. 4539–4548
- [108] RISSE, T. ; HILL, T. ; BECKENDORF, M. ; KATTER, U. J. ; SCHLIENZ, H. ; HAMANN, H. ; FREUND, H. J.: Electron spin resonance spectroscopic investigation of the rotational motion of self-assembled fatty acid films on Al₂O₃/NiAl(110). In: *Langmuir* 12 (1996), Nr. 23, S. 5512–5514
- [109] RISSE, T. ; HILL, T. ; SCHMIDT, J. ; ABEND, G. ; HAMANN, H. ; FREUND, H.-J. : Investigation of the rotational motion of self-assembled fatty acid films - an Electron Paramagnetic Resonance line shape analysis. In: *J. Chem. Phys.* 108 (1998), Nr. 20, S. 8615–8625

- [110] RISSE, T. ; HUBBELL, W. L. ; ISAS, J. M. ; HAIGLER, H. T.: Structure and dynamics of Annexin 12 bound to a planar lipid bilayer. In: *Phys. Rev. Lett.* 91 (2003), Nr. 18
- [111] ROCHET, J. C. ; LANSBURY, P. T.: Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000), Nr. 1, S. 60–68
- [112] ROTH, C. M. ; LENHOFF, A. M.: Electrostatic and Van-der-Waals contributions to protein adsorption - computation of equilibrium-constants. In: *Langmuir* 9 (1993), Nr. 4, S. 962–972
- [113] ROTH, C. M. ; NEAL, B. L. ; LENHOFF, A. M.: Van-der-Waals interactions involving proteins. In: *Biophys. J.* 70 (1996), Nr. 2, S. 977–987
- [114] SALDITT, T. : Structure and fluctuations of highly oriented phospholipid membranes. In: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5 (2000), Nr. 1-2, S. 19–26
- [115] SCHLIENZ, H. ; BECKENDORF, M. ; KATTER, U. J. ; RISSE, T. ; FREUND, H.-J. : Electron Spin Resonance investigations of the molecular motion of NO₂ on Al₂O₃(111) under ultrahigh vacuum conditions. In: *Phys. Rev. Lett.* 74 (1995), Nr. 5, S. 761–764
- [116] SCHMIDT, J. : *Charakterisierung eines Ziegler-Natta-Modellkatalysators für die Polyethylen-Herstellung - Untersuchungen mit ESR und IRAS bei der Präparation und Ethylen-Polymerisierung*, Ruhr-Universität Bochum, Diss., 2001
- [117] SCHNEIDER, D. J. ; FREED, J. H.: Spin relaxation and motional dynamics. In: *Lasers Molecules Methods* Bd. 73. New York : John Wiley and Sons, 1989, S. 387–527
- [118] SETHURAMAN, A. ; BELFORT, G. : Protein structural perturbation and aggregation on homogeneous surfaces. In: *Biophys. J.* 88 (2005), Nr. 2, S. 1322–1333
- [119] SILVIUS, J. R.: Calcium-induced lipid phase separations and interactions of Phosphatidylcholine anionic phospholipid-vesicles - fluorescence studies using carbazole-labeled and brominated phospholipids. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nr. 12, S. 2930–2938
- [120] SLEYTR, U. B. ; BAYLEY, H. ; SARA, M. ; BREITWIESER, A. ; KUPCU, S. ; MADER, C. ; WEIGERT, S. ; UNGER, F. M. ; MESSNER, P. ; JAHNSCHMID, B. ; SCHUSTER, B. ; PUM, D. ; DOUGLAS, K. ; CLARK,

- N. A. ; MOORE, J. T. ; WINNINGHAM, T. A. ; LEVY, S. ; FRITHSEN, I. ; PANKOVIC, J. ; BEALE, P. ; GILLIS, H. P. ; CHOUTOV, D. A. ; MARTIN, K. P.: Applications of S-Layers. In: *FEMS Microbiology Reviews* 20 (1997), Nr. 1-2, S. 151–175
- [121] SNYDER, R. G. ; STRAUSS, H. L. ; ELLIGER, C. A.: C-H Stretching modes and the structure of normal-alkyl chains.1. Long, disordered chains. In: *J. Phys. Chem.* 86 (1982), Nr. 26, S. 5145–5150
- [122] STANLEY, J. ; MARASSI, F. : Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy. In: *Chemical Reviews* 104 (2004), Nr. 8, S. 3587 – 3606
- [123] STOICA, D. : Using molecular dynamics to simulate electronic spin resonance spectra of T4 Lysozyme. In: *J. Phys. Chem. B* 108 (2004), Nr. 5, S. 1771–1782
- [124] STONE, T. J. ; BUCKMAN, T. ; NORDIO, P. L. ; MCCONNELL, H. M.: Spin-labeled biomolecules. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54 (1965), Nr. 4, S. 1010–1017
- [125] SU, T. J. ; LU, J. R. ; THOMAS, R. K. ; CUI, Z. F. ; PENFOLD, J. : The adsorption of Lysozyme at the silica-water interface - a neutron reflection study. In: *J. Colloid Interface Sci.* 203 (1998), Nr. 2, S. 419–429
- [126] SWAMY, M. J. ; MARSH, D. : Spin-label Electron-Spin-Resonance studies on the dynamics of the different phases of N-Biotinylphosphatidylethanolamines. In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 38, S. 11656–11663
- [127] SWAMY, M. J. ; MARSH, D. : Spin-label Electron Paramagnetic Resonance studies on the interaction of avidin with dimyristoylphosphatidylglycerol membranes. In: *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1513 (2001), Nr. 2, S. 122–130
- [128] TANAKA, H. ; FREED, J. H.: Electron-Spin Resonance studies on ordering and rotational diffusion in oriented Phosphatidylcholine multilayers - evidence for a new chain-ordering transition. In: *J. Phys. Chem.* 88 (1984), Nr. 26, S. 6633–6644
- [129] TILCOCK, C. P. S. ; BALLY, M. B. ; FARREN, S. B. ; CULLIS, P. R. ; GRUNER, S. M.: Cation-dependent segregation phenomena and phase-behavior in model membrane systems containing Phosphatidylserine -

- influence of cholesterol and acyl chain composition. In: *Biochemistry* 23 (1984), Nr. 12, S. 2696–2703
- [130] TOBAR, M. E. ; HARTNETT, J. G. ; ANSTIE, J. D.: Proposal for a new Michelson-Morley experiment using a single whispering spherical mode resonator. In: *Phys. Lett. A* 300 (2002), Nr. 1, S. 33–39
- [131] TOROK, M. ; MILTON, S. ; KAYED, R. ; WU, P. ; MCINTIRE, T. ; GLABE, C. G. ; LANGEN, R. : Structural and dynamic features of Alzheimer's A β peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labeling. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), Nr. 43, S. 40810–40815
- [132] ULMAN, A. : Formation and structure of self-assembled monolayers. In: *Chem. Rev.* 96 (1996), Nr. 4, S. 1533–1554
- [133] VAN, S. P. ; BIRRELL, G. B. ; GRIFFITH, O. H.: Rapid anisotropic motion of spin labels - models for motion averaging of ESR parameters. In: *J. Magn. Reson.* 15 (1974), Nr. 3, S. 444–459
- [134] VOET, D. ; VOET, J. : *Biochemie*. Weinheim : VCH, 1992
- [135] W.A., S. ; LAI, J. ; LUO, N. ; SUN, S. ; SHIBATA, M. ; ORNSTEIN, R. ; REIN, R. : Ab initio study of the electrostatic multipole nature of torsional potentials in dimethyl disulfide, methylhydro disulfide, and hydrogen peroxide. In: *Int. J. Quantum Chem., Quantum Biology Symposium* 18 (1991), S. 61–71
- [136] WAGGONER, A. S. ; KINGZETT, T. J. ; ROTTSCHA.S ; GRIFFITH, O. H. ; KEITH, A. D.: A spin-labeled lipid for probing biological membranes. In: *Chem. Phys. Lipids* 3 (1969), Nr. 3, S. 245–253
- [137] WAHLGREN, M. ; ARNEBRANT, T. ; LUNDSTROM, I. : The adsorption of Lysozyme to hydrophilic silicon-oxide surfaces - comparison between experimental data and models for adsorption-kinetics. In: *J. Colloid Interface Sci.* 175 (1995), Nr. 2, S. 506–514
- [138] WANG, J. ; PASZTI, Z. ; EVEN, M. A. ; CHEN, Z. : Interpretation of sum frequency generation vibrational spectra of interfacial proteins by the thin film model. In: *J. Phys. Chem. B* 108 (2004), Nr. 11, S. 3625–3632
- [139] WEAVER, L. H. ; MATTHEWS, B. W.: Structure of Bacteriophage-T4 Lysozyme refined at 1.7 resolution. In: *J. Mol. Biol.* 193 (1987), Nr. 1, S. 189–199

-
- [140] WEDLER, G. : *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 4. Weinheim, 1997
- [141] WELLS, K. ; FAROOQUI, A. ; LISS, L. ; HORROCKS, L. : Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease. In: *Neurochem. Res.* 20 (1995), Nr. 11, S. 1329–33
- [142] WIEGAND, G. ; ARRIBAS-LAYTON, N. ; HILLEBRANDT, H. ; SACKMANN, E. ; WAGNER, P. : Electrical properties of supported lipid bilayer membranes. In: *J. Phys. Chem. B* 106 (2002), Nr. 16, S. 4245–4254
- [143] WOOD, L. L. ; CHENG, S. S. ; EDMISTON, P. L. ; SAAVEDRA, S. S.: Molecular orientation distributions in protein films. 2. Site-directed immobilization of Yeast Cytochrome C on thiol-capped, self-assembled monolayers. In: *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997), Nr. 3, S. 571–576
- [144] YANG, L. ; GLASER, M. : Membrane domains containing Phosphatidylserine and substrate can be important for the activation of Protein-Kinase-C. In: *Biochemistry* 34 (1995), Nr. 5, S. 1500–1506
- [145] ZHAO, H. X. ; TUOMINEN, E. K. J. ; KINNUNEN, P. K. J.: Formation of amyloid fibers triggered by Phosphatidylserine-containing membranes. In: *Biochemistry* 43 (2004), Nr. 32, S. 10302–10307

Anhang A

Abschätzung der Wechselwirkung zwischen T4L und Quarz

Während die Adsorptionseigenschaften von T4L auf Quarzoberflächen bisher im Rahmen vorherrschender Wechselwirkungen beschrieben werden, gibt es im Falle des verwandten Proteins HEW Lysozym eine Diskussion über die Anteile elektrostatischer bzw. hydrophober Wechselwirkungen an der Grenzflächenwechselwirkung. Zudem wurden bisher die meisten Untersuchungen zur Wechselwirkung von Lysozymen mit Quarzoberflächen bei wesentlich geringeren Ionenstärken als in dieser Arbeit verwendet (0.5 M). Daher soll hier eine Abschätzung durchgeführt werden, welche Beiträge die in Kapitel 2 eingeführten Kräfte unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen hoher Ionenstärke (0.5 M) zu der Wechselwirkung zwischen T4L und Quarz leisten.

A.1 Elektrostatik

Basierend auf der numerischen Integration der Poisson-Gleichung für ein System, das aus einem sphärisch angenommenen, geladenen Protein und einer planaren geladenen Oberfläche besteht, wurde eine Methode entwickelt, die die Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungsenergien in Abhängigkeit der Ladungsdichte des Substrates und der experimentellen Bedingungen erlaubt [112]. Die Wechselwirkungsenergie zwischen HEW Lysozym ($30 \cdot 30 \cdot 45 \text{ \AA}^3$) und einer Oberfläche mit einer Ladungsdichte von $4.6 \cdot 10^{-2} \text{ C/m}^2$ wurde mit Hilfe der genannten Methode für einen Abstand von 8 \AA , eine Ionenstärke von 0.1 M und pH 7 auf $3.5 kT$ berechnet [112]. Diese Ladungsdichte entspricht genau der von Quarz [30]. Die Ladungsdichte von

HEW (Nettoladung +7 [3]) und T4 Lysozym sind bei pH 7 vergleichbar. Lediglich die Approximation einer Kugelform trifft für T4 Lysozym weniger zu, da es wesentlich prolatförmiger ist; die Maße sind ca. $30 \cdot 30 \cdot 55 \text{ \AA}^3$ [88]. Trotz dieser Einschränkung sollte dieser Wert im Rahmen einer Abschätzung für T4 Lysozym übernommen werden können.

Um den Effekt der hohen Ionenstärke abzuschätzen, liefert die Debye Länge (s. Kapitel 2) einen ersten Hinweis. Beim Übergang von einem 0.1 M zu einem 0.5 M Elektrolyten erniedrigt sich die Debye-Länge von 1 nm auf 0.4 nm, d.h. elektrostatische Wechselwirkungen werden wesentlich effektiver abgeschirmt. Im Rahmen der Debye-Hückel-Theorie kann man für kleine Oberflächenpotenziale (kleiner als ca. 25 mV, was für die Quarzoberfläche erfüllt ist) eine analytische Beziehung für die Wechselwirkungsenergie zweier Oberflächen identischer Ladungsdichte und Geometrie herleiten [55]. Unter Annahme einer homogenen Ladungsverteilung auf der sphärischen Proteinoberfläche (Radius $\simeq 18 \text{ \AA}$) ergibt sich eine Oberflächenladungsdichte von $4 \cdot 10^{-2} \text{ C/m}^2$. Diese stimmt in guter Näherung mit der Oberflächenladungsdichte von Quarz überein. Die Annahme, dass die Proteinoberfläche aufgrund des großen Radius als planare Oberfläche behandelt werden kann, stellt allerdings eine wesentlich stärkere Näherung dar. Die elektrostatische Wechselwirkungsenergie W zwischen zwei planaren Oberflächen ergibt sich aus:

$$W \simeq \frac{2 \cdot \sigma^2 \cdot r_D}{\varepsilon} \cdot \exp\left(-\frac{D}{r_D}\right) \quad (\text{pro Einheitsfläche}) \quad (\text{A.1})$$

wobei σ die Oberflächenladungsdichte, r_D die Debye-Länge, ε die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums und D den Abstand zwischen den Oberflächen angibt.

Hiermit ist das Verhältnis der Wechselwirkungsenergien bei verschiedenen Ionenstärken gegeben durch:

$$\frac{W_1}{W_2} \simeq \frac{r_{D,1}}{r_{D,2}} \exp\left[-D \cdot \left(\frac{1}{r_{D,1}} - \frac{1}{r_{D,2}}\right)\right] \quad (\text{A.2})$$

Das Verhältnis der Wechselwirkungsenergien in Elektrolyten der Ionenstärken 100 mM und 500 mM berechnet sich hieraus zu ca. 8. Obiger Literaturwert verringert sich somit auf ca. $0.4 kT$.

A.2 Van-der Waals Wechselwirkungen

Die Hamaker Konstante für die Wechselwirkung von Proteinen mit Quarz liegt im Bereich von $1.0\text{-}2.2 \cdot 10^{-20}$ J [112]. Mit den oben benützten Werten für den Radius der Kugel, die das Protein repräsentiert, und den Abstand der Oberflächen ergibt sich aus Gleichung A.2 eine Wechselwirkungsenergie von ca. $0.6 kT$. Inwiefern Abschirmung durch den Elektrolyten auch bei Van-der Waals Wechselwirkungen eine Rolle spielen, ist bisher umstritten [113]. Sicher ist jedoch, dass die Effekte wenn überhaupt zu klein sind, um bei einer Abschätzung Berücksichtigung zu finden.

Dagegen spielen Van der Waals Wechselwirkungen bei der Wechselwirkung von Proteinen untereinander eine wichtige Rolle, insbesondere wenn die Proteine sich – durch die Immobilisierung auf der Oberfläche – nahe kommen. Die Hamaker Konstante beträgt nach numerischen Berechnungen ungefähr das Doppelte derjenigen der Protein Quarz Wechselwirkung [113]. So ergibt sich eine Wechselwirkungsenergie von $1.28 kT$ in einem Abstand von 8 \AA , die bei Verringerung des Abstandes steil ansteigt. Unter einem Abstand von 3 \AA beträgt sie bereits $5 kT$.

A.3 Hydrophobe Wechselwirkungen

Die primäre hydrophobe Wechselwirkung des intakten Proteins mit der Oberfläche lässt sich nach der in Kapitel 2 angegebenen Abschätzungsregel erfassen. T4 Lysozym enthält 59 hydrophobe Aminosäuren, 19 davon in der N-terminalen Domäne. Für die primäre Wechselwirkung ist jedoch die Anzahl hydrophober Seitenketten an der Proteinoberfläche von Interesse. Diese beträgt ungefähr 14, sechs davon befinden sich in der Domäne I. Unter Annahme einer mittleren Oberfläche der Seitenketten von 10 \AA^2 und Transferenergien von ca. $100 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{ \AA}^{-2}$ [24] ergibt sich eine maximale Wechselwirkungsenergie von $5.6 kT$, falls alle Aminosäuren mit der Oberfläche wechselwirken können. Dies ist sicher nicht der Fall, da nur eine Seite des intakten Proteins in Kontakt mit der Oberfläche treten kann. Die Oberfläche leistet jedoch nochmals einen ähnlichen Betrag, so dass sich die gesamte Wechselwirkungsenergie auf eine Größenordnung von mehreren kT abgeschätzt werden kann. Dieser Betrag ist weder vom betrachteten Abstand noch von der Ionenstärke des Elektrolyten abhängig.

Eine strukturelle Veränderung bis hin zur Entfaltung setzt diesen Betrag jedoch beträchtlich hoch, da nun prinzipiell alle hydrophoben Seitenketten mit der Unterlage in Kontakt treten können. Eine Entfaltung der N-terminalen Domäne setzt z.B. weitere 13 hydrophobe Seitenketten frei.

Zugleich sind die Seitenketten bei Entfaltung strukturell nicht mehr eingeschränkt, so dass prinzipiell alle hydrophoben Reste an der Wechselwirkung beteiligt werden können. Dies ergäbe einen zusätzlichen Energiebeitrag von weiteren ca. 10-15 kT .

Anhang B

Abkürzungsverzeichnis

AB-NTA	N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure
C	Cystein
D	Asparginsäure
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DOGS NTA Ni	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-[N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure]succinyl
DOPS	Dioleoylphosphatidylserin
DOXYL	4,4'-Dimethyloxazolidin-N-oxyl
DTT	Dithiothreol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
F	Phenylalanin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEW Lysozym	Hühnereiweiß Lysozym
I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MTSSL	1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrolin-3-methyl-methanthiosulfonat
NMR	Magnetische Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKC	Protein Kinase C

PSPC	1-Palmitoyl-2-stearoyl(n-doxy)-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
R1	spinmarkierte Seitenkette
SDSL	Ortsgerichtete Spinmarkierung (Site-directed Spin labeling)
SLE	Stochastische Liouville Gleichung (Stochastic Liouville Equation)
T	Threonin
T4L	T4 Lysozym
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Valin

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. - J. Freund danke ich für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, diese Arbeit unter hervorragenden Bedingungen am Fritz-Haber-Institut eigenständig bearbeiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Risse für die ausdauernde Unterstützung inhaltlicher, experimenteller als auch moralischer Art. Die Vehemenz „die Kuh vom Eis zu holen“ wird mir weiterhin Ansporn bleiben.

Prof. W. L. Hubbell, PhD, danke ich für die fruchtbare Kooperation und die Gastfreundschaft, die mir nicht nur das Erlernen und die Durchführung der molekularbiologischen Techniken zur Herstellung der Mutanten ermöglichte, sondern einen eindrucksvollen und angenehmen Aufenthalt bescherte. Neben allen Mitgliedern des „Hubbell Lab“ sei hier insbesondere Shirley Oga für ihre unvergessliche Hilfe und die Überlassung des Fusionsproteins Annexin12 - T4 Lysozym gedankt.

Herrn Prof. Dr. K.-P. Hofmann danke ich für die Möglichkeit, molekularbiologische Arbeiten in den Laboren der Arbeitsgruppe an der Charite durchzuführen. Hierbei möchte ich zudem besonders Herrn Dr. O. Ernst und Frau H. Seibel für die freundliche Aufnahme und tatkräftige Unterstützung danken.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts von dem anderen Standpunkte danke ich Regina Dürig. Meinen Eltern, meinem Bruder und Jens gilt ebenso mein Dank für die Korrektur des Manuskripts. Bei meiner Familie möchte ich mich allerdings noch vielmehr für die Unterstützung bedanken, die mich bis zu diesem Punkt gebracht hat.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung danke ich für das angenehme Arbeitsklima. Besonders erwähnt seien hier Herr M. Schönberg und Herr K. -P. Vogelgesang für die Lösung vieler technischer Probleme sowie die Mittagsrunde für die routinierte Ablenkung.

Nicht zuletzt möchte ich der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Unterstützung dieser Arbeit danken. Dabei möchte ich insbesondere meinem Vertrauensdozent Herrn Prof. Dr. J. Manz für sein Engagement danken.

Lebenslauf

Name: Kerstin Jacobsen
Geburtsdatum: 27. Mai 1977
Geburtsort: Leverkusen
Eltern: Wolfgang Jacobsen und Edith Jacobsen
geb. Benninghaus

1983 – 1987 Gemeinschaftsgrundschule Köln-Dellbrück
1987 – 1995 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium Köln-Buchheim
1993 Vorversetzung von der 10. in die 11. Klasse
1995 Abitur
WS/1995 – SS 1997 Chemiestudium an der Universität zu Köln
Oktober 1997 Vordiplom
WS 1997 – WS 2000 Chemiestudium mit mathematisch-physikalischem
Schwerpunkt an der Universität Karlsruhe (TH)
SS 1999 Studium an UMIST, University of Manchester
Institute for Science and Technology
Vertiefungsarbeit unter der Anleitung von
Herrn Prof. J. Vickerman, PhD.
07/2000-01/2001 Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie II
der Universität Karlsruhe unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. M. M. Kappes
01/2001 Diplom in Chemie
02/2001-03/2001 Werkstudentin bei Bayer Monheim, Crop Science
seit 07/2001 Forschungstätigkeit am Fritz-Haber Institut,
Abteilung Chemische Physik, unter der Anleitung von
Herrn Prof. Dr. H.-J. Freund
01/2002 – 06/2004 Promotionsstipendium der Studienstiftung
des Deutschen Volkes

Berlin, im April 2005

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfaßt und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. April 2005

Kerstin Jacobsen