
DEPARTMENT CHEMIE

**Domänenstrukturen in Phospholipidmembranen und die Toxizität von
 α -Synuclein**

Dissertation

von

Tim Bartels

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Technische Universität München
Fakultät für Chemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

Domänenstrukturen in Phospholipidmembranen und die Toxizität von
 α -Synuclein

Tim Bartels

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

2. apl. Prof. Dr. K. Beyer,

Ludwig Maximilians Universität München

Die Dissertation wurde am 16.6.08 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 7.7.08 angenommen.

Zusammenfassung

Die laterale Organisation biologischer Membranen, die Ausbildung spezifisch zusammengesetzter Domänen, sowie die Interaktion von Lipiden und Proteinen stellen wichtige Themen der biophysikalischen Forschung dar. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage nach der Wechselwirkung des in den synaptosomalen Endigungen humaner Neuronen vorkommenden Proteins α -Synuclein mit strukturellen Domänen in Lipidmembranen. α -Synuclein, ein Protein von 140 Aminosäuren Länge, liegt in den Synapsen ungefaltet vor und bildet bei der Bindung an Lipidvesikel mit negativen Oberflächen zwei N-terminale α -Helices aus. Seine physiologische Funktion ist unbekannt, es scheint jedoch in den pathogenen Mechanismus des Morbus Parkinson und der damit verbundenen Neurodegeneration in der Pars compacta der Substantia nigra der Patienten involviert zu sein. So findet man in *post mortem* Gehirnschnitten von Parkinson-Patienten in der Substantia nigra auffällige intrazelluläre Proteinaggregate, bestehend aus aggregierten α -Synuclein-Molekülen mit einer β -Faltblattstruktur.

Der erste Teil der Arbeit widmet sich der strukturellen Untersuchung von Sphingomyelin- und Cholesterinhaltigen Modellmembranen mittels Festkörper- ^2H -NMR-Spektroskopie. Sphingomyelin und Cholesterin sind konstitutive Bestandteile synaptischer Membranen. Es wird vermutet, dass diese beiden Lipide bei physiologischen Temperaturen für die Bildung von lateralen Inhomogenitäten, sogenannten „Lipid-Rafts“, verantwortlich sind. Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit der Unterschied des Effektes von Cholesterin auf die strukturelle Parameter von Sphingomyelin im Vergleich zu Phosphatidylcholin ausgearbeitet. Im weiteren konnten die Phasenregionen verschiedener Mischungen der drei Lipide über weite Temperaturbereiche bestimmt werden, wobei eine präferentielle Assoziation von Cholesterin mit Sphingomyelin beobachtet wurde. Es gelang dabei Domänenbildungen zu detektieren und deren strukturelle und mikromechanischen Eigenschaften zu bestimmen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wechselwirkung ausgewählter Aminosäuresequenzen von α -Synuclein mit Lipidvesikeln untersucht, um der möglichen physiologischen Funktion des Proteins näher zu kommen. Die Wechselwirkung mit kleinen

unilamellaren Vesikeln, die vielfach als Modellsysteme für synaptische Vesikel dienen, wurde sowohl in Abhängigkeit von der Lage der einzelnen Peptidfragmente im Vollängenprotein wie auch von der Lipidzusammensetzung der Membranen untersucht. Um den Effekt des Proteins, bzw. seiner Fragmente auf die Vesikelmembranen zu bestimmen wurde ESR-Spektroskopie benutzt. Die α -helikale Faltung, in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung, wurde mittels Kalorimetrie und CD-Spektroskopie untersucht. Mit Hilfe von Mutagenese stellte sich heraus, dass die ersten fünf Aminosäuren der Primärsequenz von α S für die korrekte Ausbildung von α -helikaler Faltung notwendig sind. Es wurden ausserdem drei Parameter gefunden, welche massgeblich über die Bindung von α S an Vesikel und Stabilisierung von dessen Faltung entscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass Krümmung der Membranfläche, negative Ladung der Kopfgruppen der Lipide, sowie Phasenübergänge und Domänenbildung innerhalb der Membran in additiver Weise Helixbildung stabilisieren können. Mittels Lichtstreuung und verschiedener Fluoreszenz-Techniken konnte festgestellt werden, dass die Ausbildung der α -Helices und Bindung des Proteins wiederum zu einer Stabilisierung der Vesikel führt, und zwar graduell abhängig von der Faltung des Proteins.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Abhängigkeit der Bindung von α S an planare Membranen von dessen Aggregationsstatus bestimmt. Um zunächst die einzelnen Aggregatformen sowie deren Bildungskinetiken näher zu bestimmen wurden Transmissions-Elektronen-Mikroskopie sowie Fluoreszenztechniken eingesetzt. Es konnten dabei die Aminosäuredomänen bestimmt werden, welche für die Ausbildung der strukturell verschiedenen, β -Faltblatt-reichen Aggregate von α S verantwortlich sind. Mittels Plasmon-Waveguide-Spektroskopie konnte die besondere Befähigung einer dieser Aggregatformen zur Membranbindung nachgewiesen werden. Diese Bindung wurde ihrerseits durch einen hohen Gehalt an Sphingomyelin und Cholesterin in der Membran gefördert. Die Ergebnisse haben direkte Implikationen für den pathogenen Mechanismus des Morbus Parkinson.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Lipidmembranen	1
1.1.1 Zelluläre Membranen	1
1.1.2 Phasenverhalten von Lipiden	5
1.2 ²H-NMR-Spektroskopie	8
1.2.1 Theoretische Aspekte der ² H-NMR-Spektroskopie	9
1.3 α-Synuclein und seine Rolle in dem Morbus Parkinson	14
1.3.1 Neurodegenerative Erkrankungen	14
1.3.2 Das Protein α -Synuclein	18
Material und Methoden	23
2.1 Chemikalien	23
2.2 Probenpräparation	25
2.2.1 Proteinpräparation	25
2.2.2 Präparation der Lipidvesikel	30
2.2.3 Präparation der Lipidmembranen für NMR-Messungen	31
2.3 Methoden und Messparameter	33
2.3.1 ² H-NMR-Spektroskopie	33
2.3.2 CD-, ESR- und Fluoreszenzspektroskopie	39
2.3.3 Lichtstreuung	40
2.3.4 Kalorimetrie	41
2.3.5 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	42
2.3.6 Plasmon-Waveguide-Resonance (PWR) Spektroskopie	42

Ergebnisse und Diskussion	45
3.1 Phasenseparation in Lipidmembranen	45
3.1.1 ^2H -NMR von PSM- d_{31} in Mischungen mit Cholesterin	46
3.1.2 ^2H -NMR von POPC- d_{31} in Mischung mit Cholesterin	52
3.1.3 ^2H -NMR von ternären SM/POPC/Cholesterin-Membranen	56
3.1.4 Analyse der ^2H -NMR-Daten mit Hilfe des First-Order-Mean-Torque Modells.....	68
3.1.5 Relaxationszeitmessungen in ternären Membranen.....	79
3.1.6 Diskussion der Ergebnisse	84
3.2 Wechselwirkung von α-Synuclein mit Lipidvesikeln	93
3.2.1 Die Interaktion von α -Synuclein-Fragmenten mit Detergenzmizellen und Lipidvesikeln	93
3.2.2 Stabilisierung der Vesikelmembran durch α -Synucleinfragmente	107
3.2.3 Der Einfluss des N-Terminus von α -Synuclein auf Faltung und Lipid-Interaktion	113
3.2.4 Diskussion der Ergebnisse	118
3.3 Wechselwirkung von α-Synuclein mit planaren Membranen	124
3.3.1 Aggregationsstudien von α -Synuclein und dessen Fragmenten ..	125
3.3.2 Bindungsstudien von α -Synuclein-Aggregaten an planaren Membranen mittels PWR-Spektroskopie	131
3.3.3 Diskussion der Ergebnisse	138
Literaturverzeichnis	145

Abbildungsverzeichnis

1-1	Schematischer Aufbau einer biologischen Plasmamembran	2
1-2	Strukturformeln verschiedener Membranlipide	3
1-3	Strukturformeln von Cholesterin und Lanosterin	5
1-4	Selbstanordnungen von Lipiden in einer wässrigen Phase	6
1-5	Schematische Darstellung der Acylkettenordnung von Lipiden.....	6
1-6	Ausschnitt einer Molekulardynamiksimulation Lipiddoppelschicht	7
1-7	Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus in ^2H -NMR-Spektroskopie	10
1-8	Darstellung einer Lipiddoppelschicht und deren Winkel mit B_0	13
1-9	Generelles Schema zum Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen....	15
1-10	Hochauflösungs-NMR-Struktur von α -Synuclein.....	20
2-1	Strukturformeln der verwendeten Lipide.....	24
2-2	Reaktionsmechanismus der Peptidspaltung mit Bromcyan.....	26
2-3	Typisches Säulenchromatogramm einer Reinigung von α -Synuclein	29
2-4	Schematische Zeichnung des Probenhalters für ^2H -NMR-Messungen.....	32
3-1	^2H -NMR Spektren von PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0$ und 0.15	47
3-2	^2H -NMR Spektren von PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.2$ und 0.25	49
3-3	^2H -NMR Spektren von PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.33$ und POPC- d_{31} 0.33.....	51
3-4	^2H -NMR Spektren von POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0$ und 0.2.....	53
3-5	Ordnungsparameterprofile von binären Lipid/Cholesterin Mischungen.....	55
3-6	^2H -NMR Spektren von SM/POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0$	57
3-7	^2H -NMR Spektren von SM/POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.2$	59
3-8	^2H -NMR Spektren PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.2$ orientiert/De-Paked	60
3-9	^2H -NMR Spektren von SM/POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.33$	62
3-10	^2H -NMR Spektren von SM/POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.5$	64
3-11	Ordnungsparameterprofile von ternären Lipid/Cholesterin Mischungen	66

3-12	Ersten Spektralmomente von SM/POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.2$ und $X_{\text{Chol}} = 0.33$...	67
3-13	Kettenprojektionen von PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0, 0.2, 0.33$	69
3-14	Projektionen der Kohlenstoffsegmente für POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0, 0.2, 0.33$...	71
3-15	Halblogarithmische Auftragung von $\langle A \rangle$ und D_C für binäre Mischungen	73
3-16	Kettenprojektionen von SM/POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0, 0.2, 0.33, 0.5$	74
3-17	Halblogarithmische Auftragung von $\langle A \rangle$ und D_C für ternäre Mischungen	78
3-18	Beispielspektren einer ^2H -NMR-Relaxationsmessreihe.....	79
3-19	Auftragung der Spin-Gitter-Relaxationsraten von ternären Mischungen.....	80
3-20	Square-Law-Plot von ternären Mischungen	82
3-21	Ball&Stick-Modell von POPC und Cholesterin in einer Membran	85
3-22	D_C in Abhängigkeit von X_{Chol} und T für binäre und ternäre Mischungen.....	87
3-23	D_C gegen X_{Chol} für EYSM/POPC- d_{31} und PSM- d_{31} /POPC	88
3-24	Aminosäuresequenz von α -Synuclein.....	93
3-25	Beispielspektren der CD-Spektroskopie von Proteinen	95
3-26	MRE der Peptidfragmente 1-25, 31-55, 41-65, 61-85 und 9-36 mit SDS.....	95
3-27	Sekundärstrukturanteil gegen T für 1-25 bei Zugabe von 8 mM SDS.....	96
3-28	Sekundärstrukturanteil gegen T für 31-55 bei Zugabe von 8 mM SDS.....	97
3-29	Sekundärstrukturanteil gegen T für 41-65 bei Zugabe von 8 mM SDS.....	97
3-30	MRE gegen T von α -Synuclein mit verschiedenen Lipid-SUV	98
3-31	MRE gegen T von α -Synuclein mit Lipid-Raft-SUV	99
3-32	MRE gegen T von 1-25 mit verschiedenen Lipid-SUV	101
3-33	MRE gegen T von 31-55 mit verschiedenen Lipid-SUV	102
3-34	MRE gegen T von 31-55 mit DPPC-SUV bei verschiedenen pH-Werten ...	103
3-35	MRE gegen T von 41-65 mit verschiedenen Lipid-SUV	104
3-36	MRE gegen T von 61-85 mit verschiedenen Lipid-SUV	105
3-37	ESR-Spektren von 1-25, 31-55 mit DPPC-SUV bei 43 °C	107
3-38	ESR-Spektren von 1-25, 31-55 mit DPPC-SUV bei 13 °C	108
3-39	Kinetik der DPPC-SUV-Fusion mit/ohne Zugabe α -Synuclein und 1-25	110
3-40	Kinetik der DSPC/DLPC-SUV-Fusion mit/ohne Zugabe α -Synuclein	111
3-41	Vergleich der Kinetiken unter Zugabe α -Synuclein und $\Delta 24$	112
3-42	Vergleich der MRE-Werte für α -Synuclein, 1-25 und 9-36.....	113
3-43	Vergleich der MRE-Werte für α -Synuclein und 6-116.....	114

3-44	ITC-Plot von 6-116 unter Zugabe von DPPC-SUV.....	116
3-45	Vergleich der MRE-Werte für α -Synuclein, 3-140, 4-140, 5-140 und 6-116	117
3-46	Schema der 3 möglichen Bindungsmodi von α -Synuclein	120
3-47	Schema der Modelle zur Fusionshemmung durch α -Synuclein	122
3-48	Aggregationskinetik von α -Synuclein	125
3-49	CD-Spektren von α -Synuclein während der Aggregationskinetik.....	126
3-50	TEM-Bild von α -Synuclein-Fibrillen	127
3-51	TEM-Bild von α -Synuclein-Oligomeren	128
3-52	Aggregationskinetiken von 31-55, 61-85	129
3-53	TEM-Bild von 61-85-Fibrillen	127
3-54	Schema des Messaufbaus eines PWR-Spektrometers.....	132
3-55	Beispielspektren der PWR-Spektroskopie.....	133
3-56	PWR-Spektren von α -Synuclein-Oligomeren an einer EYPC-Membran	134
3-57	Vergleich der Bindung von α -Synuclein-Aggregaten an Membranen	135
3-58	Bindungsisotherme der α -Synuclein Oligomerbindung	137
3-59	Zeitabhängigkeit der Fibrillenauflösung	138
3-60	Modell zur Auflösung der α -Synuclein-Fibrillen	142

Tabellenverzeichnis

2-1	Fettsäureverteilung von EYSM und EYPC	23
2-2	Verwendete Reaktionsmischung der PCR	27
2-3	Programm der PCR.....	27
2-4	Reaktionsansatz für Restriktionsverdau mittels NdeI.....	28
2-5	Reaktionsansatz für Dephosphorylierung mittels SAP	28
3-1	Spektrale Zuordnungen der Signale für PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0$	46
3-2	Spektrale Zuordnungen der Signale für PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.15$	48
3-3	Spektrale Zuordnungen der Signale für PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.2$	48
3-4	Spektrale Zuordnungen der Signale für PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.25$	50
3-5	Spektrale Zuordnungen der Signale für PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.33$	50
3-6	Spektrale Zuordnungen der Signale für POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0$	52
3-7	Spektrale Zuordnungen der Signale für POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.2$	54
3-8	Spektrale Zuordnungen der Signale für POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.33$	54
3-9	Spektrale Zuordnungen der Signale für PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0$	58
3-10	Spektrale Zuordnungen der Signale für EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0$	59
3-11	Spektrale Zuordnungen der Signale für PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.33$	62
3-12	Spektrale Zuordnungen der Signale für EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.33$.	63
3-13	Spektrale Zuordnungen der Signale für PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.5$	64
3-14	Spektrale Zuordnungen der Signale für EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.5$...	65
3-15	Strukturparameter für PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0, 0.15, 0.2, 0.25, 0.33$	70
3-16	Strukturparameter für POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0, 0.2, 0.33$	72
3-17	Strukturparameter für PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0, 0.2, 0.33, 0.5$	75
3-18	Strukturparameter für EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0, 0.2, 0.33, 0.5$	76
3-19	Lokalisation und Anzahl Repeats der Modellpeptide	94
3-20	Zusammenfassung Lipid-Interaktion der einzelnen Peptidfragmente	106

Verwendete Abkürzungen

$\langle A \rangle$	mittleren Fläche einer Acylkette parallel zur Membranfläche
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Kraftmikroskopie)
$\alpha_{ }$	isobarer thermaler Ausdehnungskoeffizienten parallel zur Membranflächennormalen
α_S	α -Synuclein
α_{\perp}	isobarer thermaler Ausdehnungskoeffizienten senkrecht zur Membranflächennormalen
\vec{B}	magnetischer Feldvektor
B_0	magnetisches Feld
CD	Circular-Dichroismus
χ	statische quadrupolare Kopplungskonstante
CMC	<i>Critical Micelle Concentration</i> (kritische Mizellenkonzentration)
CSA	<i>Chemical Shift Anisotropy</i> (anisotrope chemische Verschiebung)
D_C	hydrophobe Dicke
$\Delta\nu_Q$	quadrupolare Aufspaltung
DLPC	Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (dynamische Lichtstreuung)
DMPC	Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPC	Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG	Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerin)]
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (dynamische Differenzkalorimetrie)
DSPC	Disteroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFG	<i>Electric Field Gradient</i> (elektrischer Feldgradient)

$\epsilon_{278 \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient bei 278 nm
eQ	elektrisches Quadrupolmoment eines Kerns
ESR	Elektronenspin-Resonanz
η	Asymmetrieparameter
EYPC	<i>Egg Yolk Phosphatidylcholine</i> (Ei-Phosphatidylcholin)
EYSM	<i>Egg Yolk Sphingomyelin</i> (Ei-Sphingomyelin)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (schnelle Proteinchromatographie)
γ	gyromagnetische Kernkonstante
h	Plancksches Wirkungsquantum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
\hat{H}_Q	quadrupolarer Hamiltonoperator
\hat{H}_{Zeeman}	Zeeman-Hamiltonoperator
I	magnetische Spin-Quantenzahl
i	Index des Kohlenstoffsegments
i	reverser Index des Kohlenstoffsegments
ITC	<i>Isothermic Titration Calorimetry</i> (isotherme Titrationskalorimetrie)
K_a	thermodynamische Bindungskonstante
K_D	thermodynamische Dissoziationskonstante
LB	<i>Lysogeny Broth</i> (lysogene Brühe)
$\langle L_C \rangle$	mittlere projizierte Kettenlänge von C2-C16
$\langle L_C^* \rangle$	mittlere projizierte Kettenlänge von C3-C15
l_d	<i>liquid-disordered</i> (flüssig-ungeordnet)
l_o	<i>liquid-ordered</i> (flüssig-geordnet)
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i> (grosse unilamellare Vesikel)
M_1	erstes Spektralmoment
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Induced Ionisation - Time Of Flight</i> (spezielle Ionisations- und Detektionsmethode der Massenspektrometrie)
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
$-\vec{\mu}_n$	magnetischer Kernmoment
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (magnetische Kernresonanz)

Verwendete Abkürzungen

NBD-PE	N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
Nde	<i>Neisseria denitrificans</i> Endonuclease
ω_0	Lamor-Frequenz
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPC- d_{31}	1-Perdeuteropalmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerin)]
PSM	N-Palmitoyl-sphingomyelin
PSM- d_{31}	N-Perdeuteropalmitoyl-sphingomyelin
Pwo	<i>Pyrococcus woessii</i>
PWR	Plasmon-Waveguide-Resonance
q	Flächenfaktor des Mean-Torque-Modells
R_{1Z}	Spin-Gitter Relaxationsrate
Rh-PE	Rhodamin-B-1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
RQC	<i>Residual Quadrupolar Couplings</i> (remanente quadrupolare Kopplungen)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
S_{CD}	Ordnungsparameter
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natrium-dodecylsulfat)
s_0	<i>solid-ordered</i> (fest-geordnet)
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i> (kleine unilamellare Vesikel)
T_{1Z}	Spin-Gitter Relaxationszeiten
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
θ_{222}	Mean Residue Ellipticity bei 222 nm
ThT	Thioflavin T
T_m	Kettenschmelztemperatur
wt	wild-Typ
X_{Chol}	Molenbruch von Cholesterin

1

Einleitung

1.1 Lipidmembranen

Die Interaktion von Proteinen mit Lipidmembranen in lebendigen Organismen stellt ein zentrales Problem der aktuellen Forschung dar. Nach anhaltender Katalogisierung der Lipidstrukturen ist bekannt, dass eukaryontische Zellen ca. 5% ihres Genoms für die Synthese von vermutlich tausenden unterschiedlichen Membranlipide verwenden [1]. Daraus ergibt sich die Frage nach den Gründen dieser Vielfalt und deren Einfluss auf die laterale Organisation der zellulären Membran. Dazu kommt, dass über ein Drittel des eukaryontischen Genoms für Membranproteine kodiert [2] und zwei Drittel der auf dem Markt oder in Entwicklung befindlichen Medikamente Membranproteine direkt oder indirekt als therapeutisches Ziel aufweisen [3][4]. Dadurch wird zusätzlich die Bedeutung der Membranbestandteile für Regulation und Modulierung der membranassoziierten Proteine deutlich. Da sich herkömmliche biochemische Techniken meist als ungeeignet erweisen, um die schnellen dynamischen Gleichgewichte der Lipidinteraktion zu erfassen, welche die Membranorganisation bestimmen, hat sich dieses Gebiet zu einem zentralen Thema der Biophysik entwickelt.

Allgemeine Bemerkungen

1.1.1 Zelluläre Membranen

Jede Zelle besitzt eine Plasmamembran, welche die Ausmaße einer Zelle bestimmt und als Barriere zwischen der Aussenwelt und dem Zellinneren fungiert. Die Plasmamembran ist ein hochselektiver Filter, der über eingelagerte Kanäle und Transportproteine das Ionenungleichgewicht zwischen Extra- und Intrazellulärraum aufrechterhält, sowie den Austausch von Nähr- und Schadstoffen mit dem umgebenden Medium reguliert. Darüber hinaus erlaubt die Trennung durch diese Lipiddoppelschicht über katalytisch aktive, in die Membran eingebettete Rezeptoren verschiedener Signaltransduktionssysteme eine starke Amplifizierung empfangener Stimuli.

Allgemeiner Aufbau zellulärer Membranen

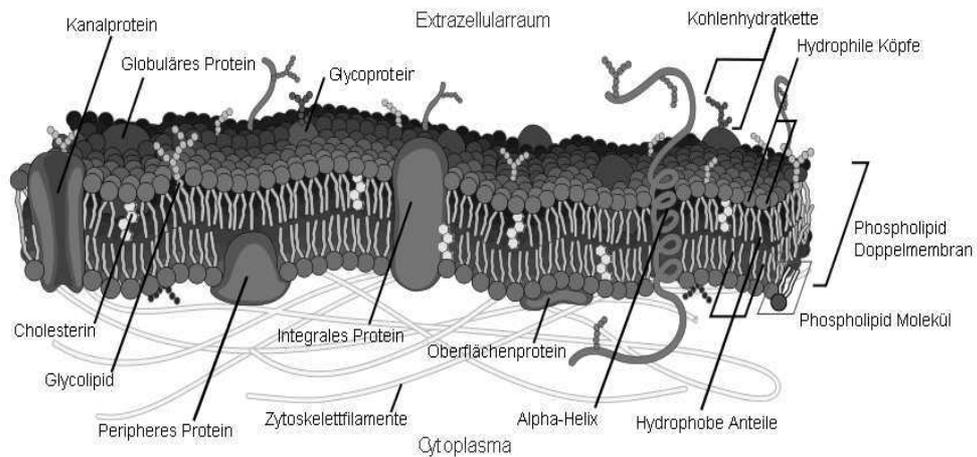


Abb. 1-1 Schematischer Aufbau einer biologischen Plasmamembran. Zu sehen ist die Asymmetrie der Membran mit den glykosylierten Proteinteilen an der Aussenseite und angedeutet das unterstützende Zytoskelett an der Innenseite

Die zellulären Membranen bestehen dabei aus Lipiddoppelschichten in die bis zu ca. 50% funktionelle Proteine [5][6] eingelagert sind (Abb. 1-1). Hierdurch spielen die Membranen eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Zellen, die über eine bloße Barrierefunktion hinausgeht. Zelluläre Membranen bestehen hauptsächlich aus drei Klassen von amphiphilen Lipiden: Glycerolipide (mit einem GlycerinGrundgerüst), Sphingolipide (mit einem SphingosinGrundgerüst) und Sterine, wobei die ersten beiden Spezies über eine breite Variation an Kopfgruppen und Acylketten verfügen können (Abb. 1-2), da nichtspezifische Acyltransferasen die Verknüpfung mit verschiedenen Fettsäuren katalysieren können. Hierbei gibt es allerdings eine Präferenz für ungesättigte Fettsäuren an der *sn*-2 Position. Die verbreitetsten Fettsäuren sind hierbei Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2), Linolensäure (18:3), Arachidonsäure (20:4) und Docosahexaensäure (22:6). Die Hauptlipidkomponenten sind in einer durchschnittlichen eukaryontischen Membran Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Sphingolipide, Cholesterin und in geringeren Mengen Phosphatidylinositol [5]. Die Verhältnisse dieser Lipide variieren jedoch stark zwischen den einzelnen Zell- und Membrantypen. So können z.B. synaptische Membranen höhere Anteile an Sphingomyelin und bis zu 50% Cholesterin enthalten [7].

Die Lipide in biologischen Membranen sind in der Lipiddoppelschicht asymmetrisch verteilt, katalysiert durch Phospholipidflippasen und Aminophospholipid-Translokasen [8]. Dabei befinden sich die glycosylierten Sphingolipide an der luminalen Seite

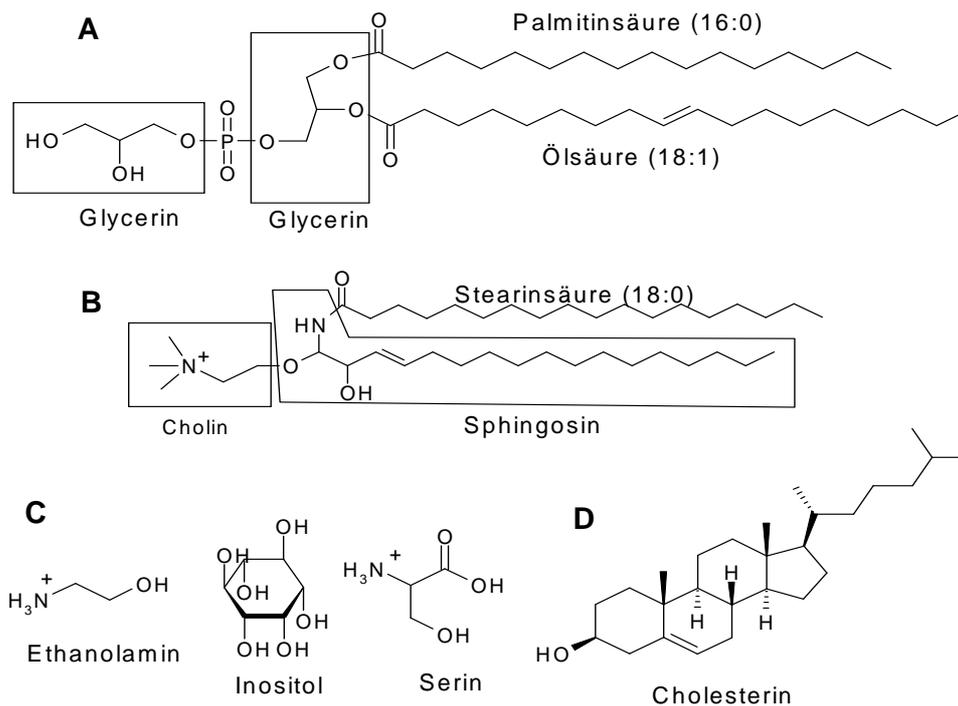


Abb. 1-2 Strukturformeln verschiedener Membranlipide. A: Phosphatidylglycerin mit Ölsäure an der *sn*-2 und Palmitinsäure an der *sn*-1 Position; B: Sphingomyelin; C: Weitere häufige Kopfgruppen; D: Das in höheren Eukaryonten häufigste Sterin Cholesterin

und Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylethanolamin an der zytosolischen Seite jeder Membran, wodurch an der zytosolischen Seite eine leicht negative Überschussladung generiert wird. Diese negative Überschussladung ist wiederum wichtig für die Bindung membranassoziierter Proteine [9], während die Aufhebung dieser Asymmetrie und die damit verbundene extrazelluläre Präsenz des Phosphatidylserins die Spätphase der Apoptose einleitet, sowie einen der ersten Schritte in der Blutgerinnungskaskade darstellt [10]. Zweifach phosphoryliertes Phosphatidylinositol spielt ausserdem die Rolle eines wichtigen Signalmoleküls im Stoffwechsel der Zelle [11]. Die Asymmetrie der verschiedenen Glycerophospholipide trägt weiterhin zur Stabilisierung der Membrankrümmung bei, die sowohl für die Gesamtstabilität der Membranen, wie auch bei der Ausbildung der für bestimmte Zellorganellen funktionell wichtigen Membranausstülpungen wesentlich ist [12][13][14] und eine Rolle im vesikulären Transport der Zelle spielt [15][16].

Das originäre Konzept der biologischen Membran als zweidimensionale Flüssigkeit mit darin zufällig verteilten Proteinen [17] musste neu bewertet werden als beob-

achtet wurde, dass Membranen funktionelle, laterale Inhomogenitäten, sogenannte „Lipid-Rafts“ [18][19][20], aufweisen. Das Vorhandensein dieser Lipiddomänen ist typischerweise mit zellulären Vorgängen wie Vesikelfusion, Signalübertragung, Lipidtransport, Transzytose, Proteinzielsteuerung und dem Eindringen von Viren assoziiert worden [21][22][23][24][25]. Diese Membrandomänen stellen daher ein wichtigen Gegenstand der pharmazeutischen, zellbiologischen, sowie biophysikalischen Forschung dar.

Nach heutigem Stand sind diese Domänen arm an Lipiden mit ungesättigten Acylketten, allerdings angereichert mit Sphingolipiden, Cholesterin sowie bestimmten Glycosyl-Phosphatidylinositol-verankerten Proteinen [27][28]. Sphingomyelin ist ein Lipid, welches in grösseren Mengen in den Nervensystemen von Mammalia auftritt und dessen Anteil in synaptischen Plasmamembranen im Laufe des Alterns kontinuierlich steigt [29][30][31]. Dieses Lipid scheint ausserdem eine Rolle im Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen zu spielen [32][33]. Eine direkte Wechselwirkung des Cholesterins mit Sphingolipiden scheint von deren hauptsächlich ungesättigten Acylketten, sowie einer möglichen Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 3-Hydroxygruppe des Sterins und der OH-Gruppe des Sphingosins auszugehen [34]. Interessant ist dabei auch, dass die Modulation des zellulären Sphingomyelingehalts direkte Auswirkung auf die Biosynthese von Cholesterin hat und *vice versa* [35][36]. Die Beobachtung, dass die Verringerung des Cholesterinanteils von biologischen Membranen bedeutende Veränderungen in der Verteilung und Funktionalität verschiedener Lipid-Raft-assoziiierter Proteine induziert [37][38][39][40][41] impliziert, dass Cholesterin eine essentielle Komponente dieser Lipid-Raft-Domänen darstellt.

Die besondere Bedeutung von Cholesterin

Cholesterin ist in grösseren Mengen (20-40 mol%) in jeder Plasmamembranen höherer Eukaryonten vorhanden, wohingegen es in den Membranen von Prokaryonten nicht vorkommt [42]. Dazu kommt, dass die internen Membranen höherer eukaryontischer Zellen im Allgemeinen sehr geringe Konzentrationen an Cholesterin enthalten. So gibt es einen ausgeprägten Gradienten der Cholesterinkonzentration von den Mitochondrien (3 wt%) über das Endoplasmatische Retikulum (6 wt%) bis zu dem Golgi-Apparat (8 wt%) [43]. Die Tatsache, dass gerade Mitochondrien so gut wie kein Cholesterin enthalten, ist in Einklang mit der Endosymbionten-Theorie von Lynn Margulis [44], die besagt, dass Mitochondrien frühe Prokaryonten darstellen, die von Eukaryonten im Rahmen einer Symbiose internalisiert wurden. Die Synthese von Cholesterin stellt eine relativ neue Entwicklung in der Evolution des Lebens dar. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der späten Verfügbarkeit grösserer Mengen molekularen Sauerstoffs für biosynthetische Zwecke. So konnte gezeigt werden,

dass es im biochemischen Syntheseweg von der Vorgängerstufe Squalen zu Cholesterin keinen plausiblen Weg für die Zyklisierung von Squalen zu Lanosterol, ohne das Vorhandensein von Sauerstoff zu geben scheint [45]. Im weiteren scheint die Weiterverarbeitung von Lanosterol zu Cholesterin, was eine Entfernung von drei Methylgruppen mit sich bringt (Abb. 1-3), noch stärker von der Verfügbarkeit von Sauerstoff abhängig zu sein. Der evolutionäre Nutzen der Entfernung der Methylgruppen besteht wahrscheinlich in einer „glatteren“ α -Seite des Sterin-Grundgerüsts was vermutlich für die Assoziation des Cholesterins mit gesättigten Lipiden von Vorteil ist [46][47]. Diese Assoziation scheint zur Ausbildung geordneter Lipidphasen, wie den oben besprochenen „Lipid-Rafts“, notwendig zu sein, was durch die Unfähigkeit des Lanosterins - im Gegensatz zu Cholesterin - zur Bildung einer flüssig-geordneten Phase (siehe unten) [48] demonstriert wird. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Stabilisierung dieser geordneten Phasen für eukaryontische Zellen wichtige biologische Funktionen hat.

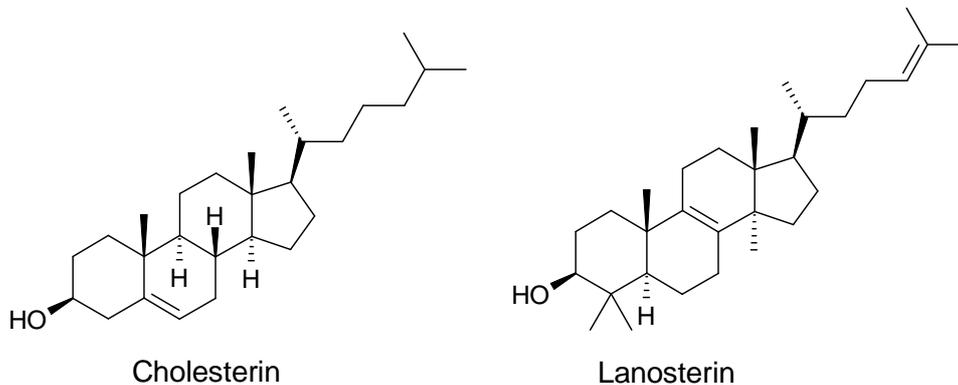


Abb. 1-3 Strukturformeln von Cholesterin und seinem biosynthetischen Vorgänger Lanosterin.

1.1.2 Phasenverhalten von Lipiden

Gibt man Lipidkomponenten in wässrigen Phasen, arrangieren sie sich, durch hydrophobe Effekte getrieben, spontan zu Membranen oder Mizellen, wobei der hydrophobe Teil des Lipids sich zum inneren Teil der Lipiddoppelschicht anordnet, während die hydrophile Kopfgruppe Kontakt mit der wässrigen Grenzfläche hat (Abb. 1-4). Lipidmembranen zeigen dabei unter physiologischen Bedingungen die Charakteristiken eines Flüssigkristalls. Unter einem Flüssigkristall versteht man eine Substanz die auf Grund der Molekülgestalt anisotrope Eigenschaften aufweist. So zeigt sie in einer Raumrichtung die Charakteristiken, speziell die hohe Diffusionsgeschwindigkeit, einer flüssigen Phase, in einer anderen Raumrichtung jedoch die hohe

Lipidphasen in wässriger Lösung

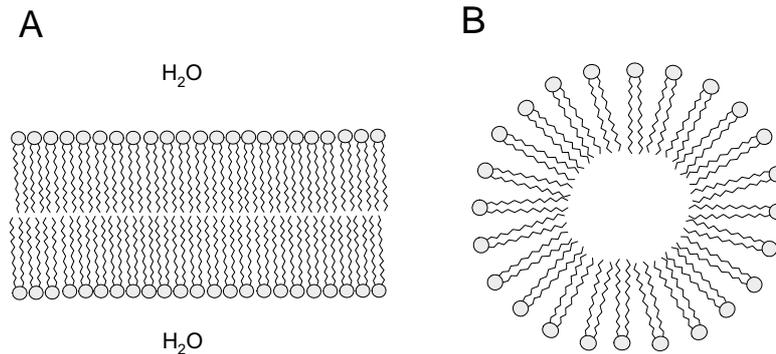


Abb. 1-4 Selbstanordnungen von Lipiden in einer wässrigen Phase. A: Lipiddoppelschicht; B: Mizelle

Ordnung eines Kristalls. Die Eigenschaften der flüssigen Kristalle stellen also einen Zustand zwischen Festkörper und Flüssigkeit dar; daher werden sie auch als Mesophasen bezeichnet. Treten diese Mesophasen bei bestimmten Temperaturen auf, spricht man von einer thermotropen Phase, ist die Ausbildung konzentrationsabhängig, von einer lyotropen Phase. Diese Phasen sind wieder in einzelne Klassen eingeteilt. So gehören die Mizellen, die von einkettigen amphiphilen Detergenzmolekülen gebildet werden, zu den kubischen lyotropen Phasen. In den sogenannten smektischen thermotropen Phasen, zu denen auch die Lipiddoppelschichten der Membranen gehören, sind die meist langkettigen, amphiphilen Moleküle in zweidimensionalen, periodischen Strukturen angeordnet. Diese flüssig-kristalline Phase in

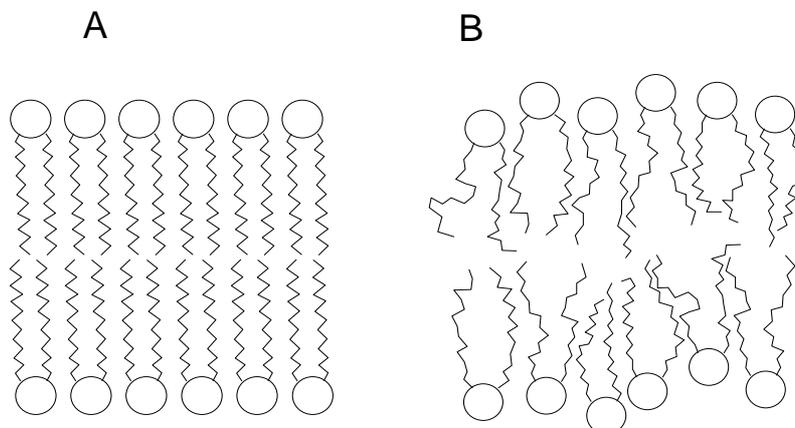


Abb. 1-5 Schematische Darstellung der Acylkettenordnung von Lipiden in einer l_b oder s_o Phase (A) oder einer l_d Phase (B).

Lipiddoppelschichten ist gekennzeichnet durch eine hohe laterale Diffusion und hohe konformationelle Beweglichkeit der Acylketten und wird daher auch als flüssig-ungeordnete (liquid-disordered, l_d) Phase bezeichnet. Die feste, gelartige Phase die sich unterhalb des thermotropen Phasenübergangs bildet, wird auf Grund ihrer geringen lateralen Diffusion sowie ihrer hohen Acylkettenordnung als fest-geordnete (solid-ordered, s_o) Phase bezeichnet (Abb. 1-5).

Zusätzlich zu der bereits besprochenen s_o und l_d Phasen wurde in Lipidsystemen die Cholesterin enthalten, durch NMR- und DSC-Messungen eine zusätzliche Lipidphase gefunden [49][50], die flüssig-geordnete (liquid-ordered, l_o) Phase. Diese zusätzliche Phase stellt eine Mischung der beiden oben besprochenen Phasencharakteristiken dar, mit einer hohen transversalen Beweglichkeit und einer hohen konformationellen Ordnung der Acylketten [49][43][51][52]. Cholesterin fügt sich in dieser Phase vermutlich mit der hydrophilen Hydroxygruppe zu der Wasser-Grenzfläche ausgerichtet, wie in Abb. 1-6 dargestellt, in die Lipidmembran ein. Dadurch wird die translationale Ordnung der Gelphase unterhalb des thermotropen Phasenübergangs zerstört, sowie oberhalb des Phasenübergangs die Acylketten in eine hohe konformationelle Ordnung gezwungen. Dies führt zu einer Stabilisierung der l_o Phase über weite Temperaturbereiche und komplette Unterdrückung des s_o zu l_d

Die „liquid-ordered“ Phase

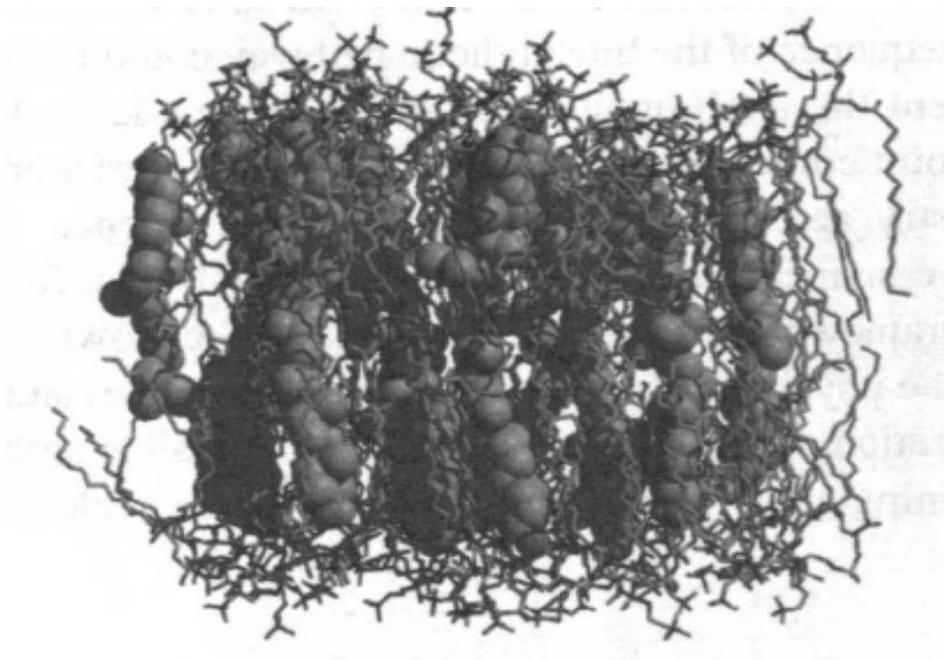


Abb. 1-6 Ausschnitt einer Molekulardynamiksimulation von einer 1,2-Palmitoyl-3-Phosphocholin (DPPC) Lipiddoppelschicht mit einem Zusatz von 20 mol% Cholesterin. Die DPPC-Moleküle sind als dünne Stäbchen gezeichnet, für die Cholesterinmoleküle wurde eine raumgreifende Darstellung gewählt.

Phasenübergangs. Da diese Phase nur unter Zugabe von Cholesterin oder anderer höherer Sterole gebildet wird, sowie durch ungesättigte und Sphingolipide stabilisiert wird, liegt die Verbindung zu den oben besprochenen Lipid-Rafts nahe. Da ausserdem eine gründliche Untersuchung der in Plasmamembranen vorkommenden Lipid-Rafts auf Grund der komplexen Lipidzusammensetzung biologischer Membranen nicht möglich ist, hat es sich als nützlich erwiesen, zunächst die physikalischen Eigenschaften der beteiligten Lipide in simplen, Lipid-Raft-ähnlichen Modellsystemen zu untersuchen. Diese werden meist durch Systeme simuliert, die über koexistierende l_d und l_o -Phasen verfügen [24][25][26]. Erreicht wird dies durch Mischung eines hochfluiden Lipids mit niedrigem thermotropen Phasenübergang mit Cholesterin und einem gesättigten Lipid mit hohem Phasenübergang, wie den Sphingolipiden. Es sollte allerdings erwähnt werden, dass es bis vor kurzem [53] keinerlei direkte Beobachtung der l_o Phase als Basis für laterale Inhomogenitäten in biologischen Membranen gab. Trotz allem haben gerade l_o -Phasen direkte biologische Implikationen, da eine Erhöhung der Acylkettenordnung in einer l_o -Phase zu einer Veränderung des lateralen Druckprofils führt [54], was für die physiologische Funktion von mechanosensitiven Ionenkanälen wichtig sein könnte, sowie zu einer Verdickung der Membran führt. Letzteres wurde oft als Faktor für die physiologische Funktionalität und Regulation von Membranproteinen diskutiert, deren hydrophobe Transmembrandomänen an die exakte hydrophobe Dicke der Membran, bzw. des spezifischen Membrankompartiments angepasst zu sein scheinen [55][56].

1.2 Deuterium-NMR-Spektroskopie

Allgemeine Bemerkungen

Experimente mittels Fluoreszenz-Spektroskopie haben zu bemerkenswerten Fortschritten im Verständnis von Phasenverhalten und Phasengrenzen in ternären Lipidmischungen geführt, da es durch diese Techniken möglich wurde binäre wie ternäre Phasendiagramme für verschiedene interessante Lipidsysteme zu messen [57][58]. Trotzdem sind diese Phasendiagramme oftmals lückenhaft und haben einen erheblichen Nachteil: Die Notwendigkeit des Einbaus einer fluoreszenzmarkierten Sonde in die Mischungen innerhalb einer Lipidmembran. Die Frage nach dem Einfluss dieses Einbaus hat vor kurzem zu vergleichenden Studien zwischen Fluoreszenztechniken und ^2H -NMR-Spektroskopie geführt und dabei bedeutende Störungen der empfindlichen Gleichgewichte schon durch geringe Mengen Fluoreszenzfarbstoff aufzeigen können [59].

Festkörper ^2H -NMR-Spektroskopie hat den Vorteil ohne spezielle Sonden

auskommen zu können, es ist nur ein meist wenig invasiver Austausch von Wasserstoff gegen sein schwereres Isotop Deuterium vonnöten. Festkörper ^2H -NMR-Spektroskopie ist ausserdem eine sehr vielseitige Technik welche die direkte Beobachtung der Ordnung und Beweglichkeit der Acylketten oder polaren Kopfgruppen in Lipidmembranen erlaubt [60][61][62]. Die partiell gemittelten quadrupolaren Kopplungen (Residual Quadrupolar Couplings, RQC) der Kettendeuteronen innerhalb der Lipiddoppelschicht können weiter im Sinne von Ordnungsparametern der verschiedenen Kohlenstoffsegmente bzw. deren Verteilungen prozessiert werden, was wiederum Aufschluss über die lokale Umgebung des Lipids und damit die Verteilung des Lipids in verschiedenen Membrandomänen erlaubt. Eine tiefergehende Analyse erlaubt im weiteren die Berechnung struktureller Parameter, wie der durchschnittliche Membrandicke oder der eingenommenen Fläche pro Lipid (siehe Abschnitt 2.3.1 auf Seite 33)

Zusammen mit Relaxationszeitmessungen, die eine Aussage über die mikroelastischen Eigenschaften der jeweilig betrachteten Membrankomponente erlauben, kann durch Festkörper ^2H -NMR-Spektroskopie Information über die laterale Organisation, und damit über das Phasenverhalten der Lipide innerhalb komplexer Mischungen gesammelt werden. Gerade die für die ^2H -NMR-Spektroskopie benötigten perdeuterierten Sphingomyelinderivate stellen jedoch immer noch ein nicht zu unterschätzendes Syntheseproblem dar. Der normale semisynthetische Weg, durch Entfernung der über ein Amid gebundenen Fettsäure gefolgt von einer Reacylierung mit einem perdeuterierten Derivat, ist durch die teilweise Epimerisierung der Hydroxygruppe am C3 Kohlenstoff des Sphingosingerüsts [63] behindert, was die Verfügbarkeit von reinem perdeuteriertem Sphingomyelin stark beschränkt, bzw. verteuert. Dies führt dazu, dass es bisher wenig NMR-Daten zu phasenseparierenden Sphingomyelinmischungen gibt.

1.2.1 Theoretische Aspekte der ^2H -NMR-Spektroskopie

Die Lipidmembranstruktur und die daraus resultierende Anisotropie der Molekularbewegung begrenzt die Anwendung vieler physikalischer Techniken auf diese Systeme. So kann z.B. Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie auf Grund der eingeschränkten Mittelung der Bewegungsbeiträge innerhalb der lamellaren Membran nicht angewendet werden. Jede Spektroskopie hat hierbei das Problem der nicht ausgemittelten orientierungsabhängigen Tensorinteraktionen, die im Falle von NMR aus den magnetischen Dipol-Dipol-, der anisotropen chemischen Verschiebung

Vorteile der ^2H -NMR-Spektroskopie

(Chemical Shift Anisotropy, CSA), sowie für Kerne mit einem Spin $I > \frac{1}{2}$ den elektrischen Quadrupolwechselwirkungen resultieren. Dieses Problem kann jedoch im Fall der ^2H -NMR-Spektroskopie in einen Vorteil umgewandelt werden. So ist die Größenordnung der elektrischen Quadrupolwechselwirkung für einen Kern mit $I = 1$, wie dem von Deuterium ^2H , in C- ^2H -Bindungen relativ zu den Dipol-Dipol- und CSA-Interaktionen so gross, dass letztere vernachlässigt werden können, was eine einfache Messung und Interpretation der in der Quadrupolwechselwirkung enthaltenen Orientierungsinformation der chemischen Bindungen erlaubt.

Quadrupolaufspaltung der Resonanzen eines Deuterons

Wie bereits eingangs erwähnt, gibt es neben der Zeeman-Wechselwirkung des Kernspins mit dem externen Magnetfeld zusätzliche magnetische Interaktionen (dipolare, CSA) und die Wechselwirkung des Kernquadrupols mit dem elektrischen Feldgradienten der C- ^2H -Bindung. Letztere ist so gross, dass die dipolare und CSA-Wechselwirkungen vernachlässigt werden können. Der ^2H -Kern hat einen Spin von $I = 1$, was nach der Auswahlregel $2I + 1$ zu drei Zeeman-Energieniveaus mit den Eigenzuständen $|m = |0, \pm 1\rangle$ des Hamiltonoperators \hat{H}_Z führt (Abb. 1-7). Laut Quantenmechanik

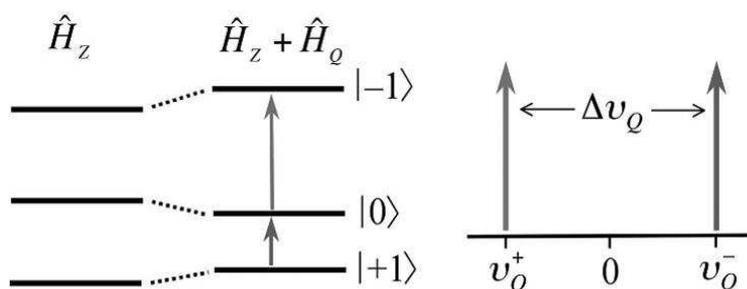


Abb. 1-7 Zeeman-Aufspaltungsschema der Energieniveaus in ^2H -NMR-Spektroskopie. Der Zeeman Hamiltonoperator \hat{H}_Z wird durch den quadrupolaren Hamiltonoperator \hat{H}_Q gestört, wodurch es zu einer Aufhebung der Entartung der Kernspinenergieniveaus im Deuteriumkern kommt. Dies führt zu einer Aufspaltung $\Delta\nu_Q$ der detektierbaren Resonanzen, welche die Differenz der Frequenzen der Einzelquantenübergänge $\nu_{\pm Q}$ wiedergibt. Die Differenz $\Delta\nu_Q$ ist ein Maß für die winkelabhängige Interaktion des ^2H Kernquadrupolmoments mit dem elektrischen Feldgradienten der C- ^2H -Bindung.

sind nur die Übergänge zwischen den benachbarten Spinzuständen erlaubt, was zu zwei Einzelquantenübergängen führt. In der ^2H -NMR-Spektroskopie ist die Entartung dieser beiden Übergänge durch die Kopplung des ^2H -Kerns mit dem elektrischen Feldgradienten (Electric Field Gradient, EFG) der C- ^2H -Bindung aufgehoben,

wie durch den zusätzlichen Term des quadrupolaren Hamiltonoperator \hat{H}_Q angegeben wird.

Der Zeeman-Hamiltonoperator \hat{H}_{Zeeman} beschreibt dabei die Wechselwirkung des magnetischen Kernmoments $-\vec{\mu}_n$ mit dem magnetischen Feld \vec{B} nach:

$$\hat{H}_{Zeeman} = -\gamma \frac{\hbar}{2\pi} \vec{I} \cdot \vec{B} \quad \text{Glg. 1.1}$$

Mit γ als gyromagnetischen Kernkonstante, dem Planckschen Wirkungsquantum $\hbar = 6,6262 \cdot 10^{-32} \text{ Js}$ und dem Kernspinoperator \vec{I} , für dessen Betrag $|\vec{I}|$ und dessen Spinkomponente I_z entlang einer Bezugsachse (angenommen das Feld B_0 sei entlang der z-Achse) gilt:

$$|\vec{I}| = \sqrt{I(I+1)} \frac{\hbar}{2\pi} \quad \text{Glg. 1.2}$$

$$I_z = m_I \frac{\hbar}{2\pi} \quad \text{Glg. 1.3}$$

mit der magnetischen Quantenzahl $m_I = I, I-1, \dots, -I$ (nach der Auswahlregel $2I+1$ für einen Spin \vec{I}). Für den Zeeman-Hamiltonoperator ergibt sich damit:

$$\hat{H}_{Zeeman} = -\gamma \frac{\hbar}{2\pi} I_z \cdot B_0 \quad \text{Glg. 1.4}$$

Wobei γB_0 der Larmor-Frequenz ω_0 entspricht.

Der quadrupolare Hamiltonoperator \hat{H}_Q lautet für ^2H in Abwesenheit von Bewegung [64]:

$$\hat{H}_Q = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} ([3m_I^2 - I(I+1)]) \frac{1}{2} [(3 \cos^2 \beta - 1) + \eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha] \quad \text{Glg. 1.5}$$

Wobei die Wechselwirkung mit dem EFG-Tensor durch den Feldgradienten-Term $e q = V_{zz}$ mit q als der Ladung und eQ dem elektrischen Quadrupolmoments eines Kerns, sowie dem Asymmetrieparameter $\eta = (V_{xx} - V_{yy})/V_{zz}$ wiedergegeben wird. Die Terme $V_{x,x_i}, V_{y,y_i}, V_{z,z}$ stehen dabei für die zweiten Ableitungen $\delta^2 V / \delta x_i^2 \dots$ der jeweiligen Potentiale. Für das System der C^{-2}H -Bindung ist der Asymmetrieparameter in den meisten Fällen jedoch $\eta < 0,05$ [65][66][67][68] und

damit vernachlässigbar [60]. Die Transformation des EFG-Tensors in das Laborkoordinatensystem, in dem die z-Achse in Richtung des Feldes B_0 liegt, liefert die Winkelfunktionen in Glg 1.5 mit den Euler-Winkeln α und β . Diese Winkel geben die Orientierung des EFG-Tensors relativ zu zum B_0 -Feld an. Da die z-Achse des Hauptachsensystems der C-²H-Bindung immer eine Symmetrieachse darstellt, treten nur 2 Euler-Winkel auf. Für die Zustandsenergien des ²H-Kerns ergibt sich damit:

$$E_{m_I} = -\gamma \frac{h}{2\pi} B_0 m_I + \frac{e^2 q Q}{8} (3m_I^2 - 2) [(3 \cos^2 \beta - 1) + \eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha]$$

Glg. 1.6

Im Allgemeinen sind die gemessenen Moleküle dynamisch und diese Dynamik beeinflusst die Aufspaltung der Energieniveaus. ²H-NMR-Spektroskopie ist dadurch eine sehr gute Technik um anisotrope Molekülbewegungen zu verfolgen. ²H-NMR-Spektren für schnelle isotrope Bewegungen bestehen nur aus einer einzelnen Linie, während die anisotrope Bewegung jedes Deuterons auf Grund der quadrupolaren Wechselwirkung ein Duplett ergibt [60]. Die Größe der Aufspaltung des Dupletts hängt dabei von dem Grad an Anisotropie ab. Nach Glg 1.6 ergibt sich für die quadrupolare Aufspaltung $\Delta\nu_Q$ [60]:

$$\Delta\nu_Q(\alpha, \beta) = \frac{3e^2 q Q}{8} \frac{1}{h} (3 \cos^2 \beta - 1 + \eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha) \quad \text{Glg. 1.7}$$

Wobei für die Winkel α und β nur ein zeitliches Mittel beobachtet werden kann, wenn die betreffenden Bewegungen schnell auf der NMR-Zeitskala sind, d.h. deren Korrelationszeiten τ_c der Ungleichung $2\pi\Delta\nu_Q\tau_c \ll 1$ genügen. Da die üblichen Deuterium-Aufspaltungen bei ca. 10^5 Hz liegen und die mittlere Verweildauer einer Konformation einer Acylkette ca. 10^{-10} s ist, ist dies für die meisten ²H-NMR-Spektren erfüllt.

Der Ordnungsparameter

Als Maß für den Grad der Fluktuationen findet üblicherweise das Konzept der Ordnungsparameter Anwendung. Ist der EFG-Tensor symmetrisch zur intramolekularen Bindungsachse ($\eta < 0,05$), reduziert sich die Beschreibung der Fluktuationen auf den Ordnungsparameter der C-²H-Bindung. Dieser definiert sich wie folgt:

$$S_{CD} = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \quad \text{Glg. 1.8}$$

wobei β der Winkel zwischen C-²H-Bindungsachse und der Membranflächennor-

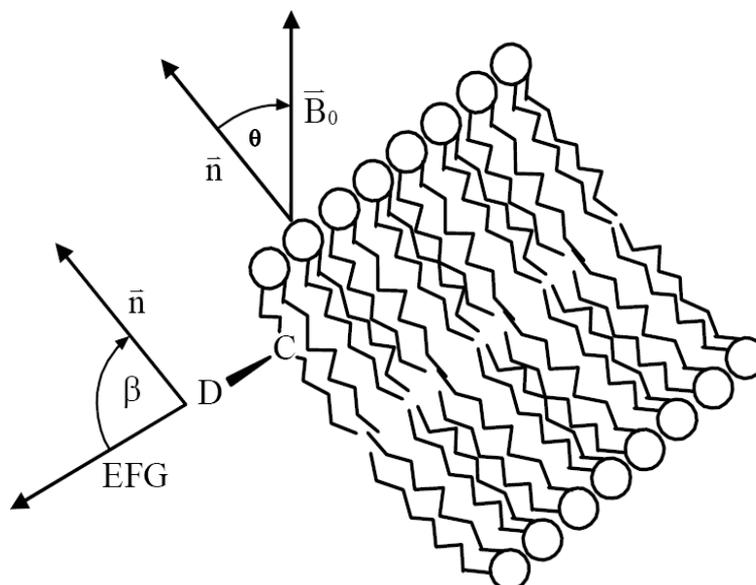


Abb. 1-8 Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht und deren Winkel mit dem magnetischen Feld B_0 . Der EFG-Tensor schliesst mit der Flächennormalen \bar{n} den Winkel β ein. Die makroskopische Membranorientierung bzgl. B_0 ist durch θ gegeben.

malen und θ der Winkel zwischen dem magnetischen Feld und der Membranflächennormalen ist (Abb. 1-8). Unter Vernachlässigung des Asymmetrieparameters η , kann Glg 1.7 dann umgeschrieben werden zu [60]:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} S_{CD} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad \text{Glg. 1.9}$$

Für den Fall, dass die Membran senkrecht zum magnetischen Feld steht ($\theta = 0^\circ$) vereinfacht sich Gleichung Glg 1.9 zu:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \chi S_{CD} \quad \text{Glg. 1.10}$$

mit der statischen quadrupolaren Kopplungskonstante $\chi = \frac{e^2 q Q}{h} = 167 \text{ kHz}$ für eine C-²H-Bindung. So kann aus der detektierten quadrupolaren Aufspaltung leicht der Ordnungsparameter, sowie aus diesem mit Hilfe des First-Order-Mean-Torque Modells (siehe Kapitel 2.3) weitere physikalische Parameter berechnet werden. Man muss dabei beachten, dass aus den Spektren das Vorzeichen von S_{CD} nicht ersichtlich ist. Es lässt sich jedoch für Lipidmembranen aus geometrischen Überlegungen folgern, dass S_{CD} negativ ist [60]. Für die Berechnungen wurde daher der Betrag $|S_{CD}|$ verwendet. Für den isotropen Fall beträgt S_{CD} dabei 0, der Maximalwert für

S_{CD} für Kohlenstoffketten in einer Lipidmembran ist -0.5, was einer *all-trans*-Konformation der Acylkette entspricht.

1.3 alpha–Synuclein und seine Rolle im Morbus Parkinson

1.3.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Allgemeine pathologische Merkmale

Unter dem Begriff neurodegenerative Erkrankungen wird eine Gruppe von Krankheiten zusammengefasst, die vorwiegend in späten Lebensjahren einsetzen und deren Symptome stark variieren [68][69]. So ist leiden z.B. Patienten des Morbus Alzheimer unter Demenz, Betroffene des Chorea Huntington unter unkontrollierten Bewegungen, während sich der Morbus Parkinson zunächst durch die typisch klinische Triade Akinese, Tremor und Rigidität auszeichnet. Obwohl die Symptome der Krankheiten sehr divers erscheinen, werden bei der Autopsie der betroffenen Personen sehr ähnliche abnormale, fibrilläre Proteineinschlüsse gefunden, deren anatomische Verteilung stark mit den der für jede Krankheit typischen Arealen der stärksten Neurodegeneration überlappt. Historisch gesehen haben diese Proteineinschlüsse auf Grund ihrer einfachen Bestimmbarkeit unter dem Lichtmikroskop und ihrer Fähigkeit Farbstoffe zu binden, eine sehr starke Rolle in der diagnostische Zuordnung dieser Krankheiten gespielt.

Dies trifft insbesondere im Fall von dem Morbus Alzheimer zu, wo eine Korrelation zwischen den kortikalen neuritischen Plaques mit der Demenz zu der ursprünglichen Beschreibung der Krankheit durch Alzheimer gehörte. Diese Dominanz der Assoziation der Proteinaggregation mit dem Fortschreiten der Krankheit wurde noch verstärkt, als aus genetischen Studien die Hypothese geformt wurde, dass jede pathogene Mutation bei Morbus Alzheimer zu einer verstärkten Aggregation des beteiligten Proteinfragments A β führt [70], was später tatsächlich grösstenteils bestätigt werden konnte [71]. Bei Chorea Huntington hingegen, wurde das Vorhandensein von Proteineinschlüssen und die *in vitro* Aggregation von dem betreffenden Protein, Huntingtin, erst vor kurzem entdeckt und als zentrales Ereignis im Krankheitsverlauf akzeptiert [72][73]. Im Fall vom Morbus Parkinson ist das pathologische Merkmal der intrazellulären Aggregate in der Pars compacta der Substantia nigra, den sogenannten „Lewy-bodies“, schon seit fast einem Jahrhundert bekannt [74] Deren zentrale Rolle im pathogenen Mechanismus wurde jedoch erst anerkannt, als Muta-

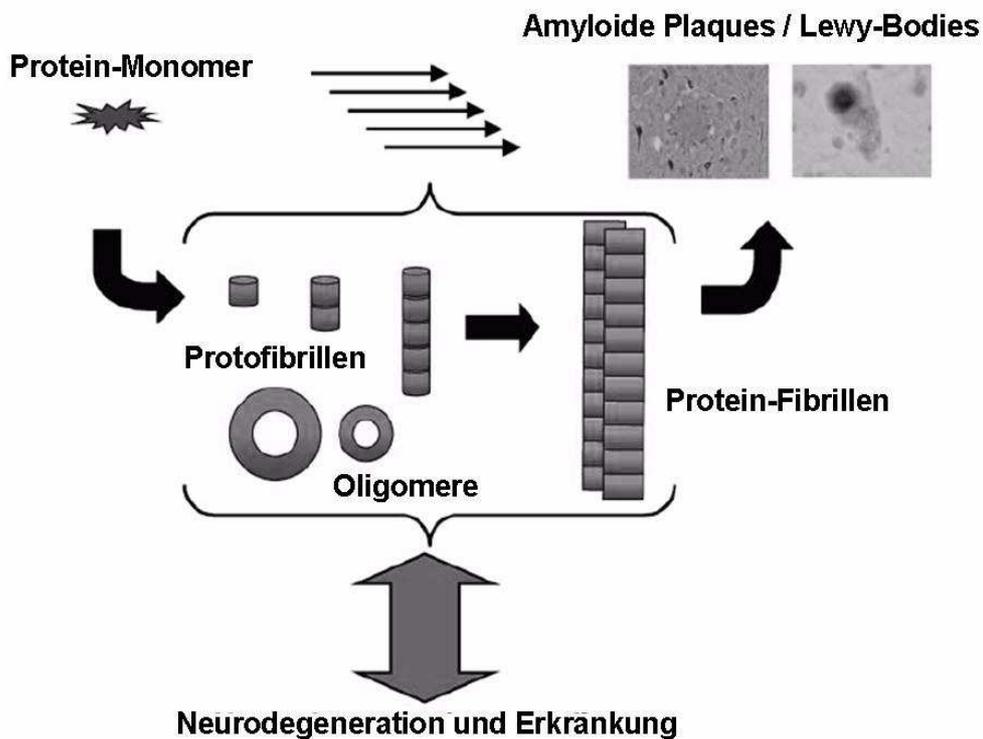


Abb. 1-9 Generelles Schema zum Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen mit Proteineinschlüssen als pathologischem Merkmal nach Caughey und Lansbury [76]. Die Fehlfaltung der beteiligten Proteine, wie α -Synuclein bei Morbus Parkinson oder $A\beta$ bei Morbus Alzheimer, führt über bestimmte Proteinaggregate, den vermutlich neurotoxischen Protofibrillen und Oligomeren, zu den mit der Krankheit assoziierten Proteineinschlüssen (amyloide Plaques, linkes Bild; Lewy-bodies, rechtes Bild). Der genaue zellschädigende Mechanismus ist dabei allerdings noch nicht bekannt.

tionen des Gens für α -Synuclein, dem hauptsächlichen Proteinbestandteil der Lewy-Bodies [75], gefunden wurden [77]. Ablagerungen von α -Synuclein sind im weiteren noch in einer Reihe anderer neurodegenerativen Erkrankungen involviert so z.B. auch bei Morbus Alzheimer, Morbus Pick, multipler Systematrophie und Lewy-Body Demenz [78].

Die Hypothese, dass Proteinaggregation die Ursache und nicht die Folge der Neurodegeneration ist, wird durch mehrere experimentelle Befunde unterstützt, wie der Kolo-kalisation von Zelltod und Proteinaggregaten, der genetischen Verbindung von pathogenen Mutationen zu den aggregierenden Proteinen, sowie die Steigerung der

in vitro Aggregationskinetiken dieser Proteinvarianten [79][80]. Dazu kommen Befunde in Tiermodellen, bei denen Überexpression der beteiligten Proteine zu krankheitsähnlichen Phänotypen führt [81] und ein direkter Zusammenhang zwischen der Aggregationstendenz einer Aminosäuresequenz und deren Toxizität hergestellt werden konnte [82]. Zudem zeigt sich bei manchen Krankheiten ein Verlauf, der mit der Kinetik eines Nukleationsprozesses übereinstimmt [83][84].

Über die exakte Natur der neurotoxischen Aggregationspezies herrscht jedoch ein andauernder Disput. Zunehmend konnte in Studien gezeigt werden, dass nicht das Endstadium der Proteinaggregation, die Proteinfibrillen aus denen amyloide Plaques oder Lewy-Bodies bestehen (Abb. 1-9), sondern Aggregationsintermediate, sogenannte Oligomere, vermutlich das neurotoxische Agens darstellen [85][86][87]. Diese Oligomere treten entweder als Vorstufe zu den Aggregationskeimen, den Protofibrillen, oder direkt im Aggregationweg des monomeren Proteins zu den Fibrillen auf. Ein mögliches Ziel der hydrophoben Proteinaggregate könnte die zelluläre Membran sein, wie durch die Befähigung einiger dieser Proteinspezies zur Erhöhung der Permeabilität der Membran, vermutlich über Ausbildung stabiler Membranporen [76][88], demonstriert werden konnte. Der genaue Wirkungsmechanismus, durch den diese Proteinoligomere Zellschädigung auslösen, ist immer noch Gegenstand intensiver Forschung, jedoch scheinen gerade Neuronen besonders empfindlich gegenüber dieser Art der Proteinmissfaltung zu sein. Eine mögliche Erklärung für diese Empfindlichkeit, unter Berücksichtigung einer möglichen Membranschädigung als pathogenen Mechanismus, könnte die besondere Zusammensetzung der neuronalen Membranen liefern, deren Cholesterin- und Sphingomyelingehalt die Bindung der Aggregate begünstigen könnte [89][90], und in einer Reihe von Studien mit Morbus Alzheimer assoziiert werden konnte [33][91][92].

Morbus Parkinson Morbus Parkinson ist die häufigste motorische Funktionsstörung und nach Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung [78]. Es betrifft ca. 1-2% der Bevölkerung über 65 und wurde von James Parkinson im Jahre 1817 das erste Mal beschrieben [93]. Die Krankheit ist klinisch durch drei Symptome geprägt: Muskelsteifheit, Bradykinese (stark verlangsamte Bewegungen des Betroffenen) und Ruhetremor. Kognitive Beeinträchtigungen treten zwar erst in fortgeschrittenen Stadien der Krankheit auf, dann allerdings bei einem signifikanten Teil der Patienten. Das herausragendste neuropathologische Merkmal dieser Erkrankung sind eosinophile zytoplasmatische Einschlüsse in Form der sogenannten Lewy-Bodies und Lewy-Neuriten [74], welche besonders zahlreich in der Pars compacta der Substantia nigra zu finden sind [94], was mit der Lokalisation des grössten Neuronenverlusts übereinstimmt [95]. Obwohl die Substantia Nigra das hauptsächlichste

Gebiet des neuronalen Zellverlusts darstellt und obwohl der damit einhergehende Dopaminmangel für die meisten motorischen Störungen bei den Patienten verantwortlich ist, ist das Erscheinen von Lewy-Bodies nicht auf diesen Bereich beschränkt. Vereinzelt können Lewy-Bodies auch im motorischen Kern des Vagus-Nervs, dem Hypothalamus, dem Meynert-Basalkern, dem Locus coeruleus, dem zerebralen Kortex, dem Bulbus olfactorius und dem autonomen Nervensystem vorkommen [96]. Von diesen Regionen konnte in manchen Patienten Nervenzellverlust im Locus coeruleus, dem Meynert-Basalkern und dem Nucleus dorsalis des Vagus-Nervs beobachtet werden. Lewy-Bodies werden dabei normalerweise nur in Nervenzellen beobachtet, in seltenen Fällen in denen Glia betroffen waren.

Die meisten Fälle von Morbus Parkinson sind idiopathisch, ohne erkennbaren familiären Hintergrund. Es konnten jedoch einige Umwelttoxine mit dem Ausbruch von Morbus Parkinson in Verbindung gebracht werden [97]. So zeigten Fallstudien, dass Pestizide Morbus Parkinson und Parkinson-ähnliche Erkrankungen auslösen können [98]. Dies konnte durch Tierversuche, bei denen Ratten den Pestiziden Rotenon und Paraquat ausgesetzt waren, experimentell bestätigt werden [99][100]. Ein weiterer Hinweis auf die Rolle von exogenen Toxinen lieferte die Beobachtung, dass 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP), eine Chemikalie die als Verunreinigung bei der Herstellung von Heroin entsteht, bei Drogenabhängigen ein Parkinson-ähnliches Syndrom auslöst [101]. MPTP wird im Körper zu dem 1-Methyl-4-Phenylpyridiniumion (MPP⁺) umgewandelt [102][103], von dopaminergen Neuronen aufgenommen [104] und verursacht dort einen Defekt in dem mitochondrialen Komplex I [105], was im weiteren zu einem Absinken des Spiegels der Antioxidanz Glutathion und einer Erhöhung des oxidativen Stress führt [106]. Sämtlichen dieser Toxine fehlt jedoch das pathologische Merkmal der Lewy-Bodies. Interessant ist dabei, dass oxidativer Stress in anderen Studien mit der Inhibierung der α -Synuclein-Fibrillenbildung und Stabilisation der Oligomere über ein Dopamin-Addukt in Verbindung gebracht werden konnte [69]. Dies könnte nicht nur den beschleunigten Zelltod durch Erhöhung der Konzentration an Oligomeren erklären, sondern ausserdem die Abwesenheit der Lewy-Bodies durch Inhibierung der Fibrillenbildung.

Während Umweltfaktoren als Ursachen für Morbus Parkinson schwierig zu bestimmen sind, gibt es inzwischen 13 identifizierte Genloci, die entweder mit einer Prädisposition für diese Krankheit assoziiert werden, oder direkt zu einem frühen Ausbruch in den betroffenen Individuen führen [107]. Neben Mutationen der Proteine Parkin (PARK2 [108]), UCH-L1 (PARK3 [109]), PINK1 (PARK6 [110]), DJ-1 (PARK7 [111]) und der in Patienten häufigsten Variante LRRK2 (PARK8 [112]), deren genauer Einfluss bis dato nicht bekannt ist, wurden drei Punktmutationen des α -Synuclein-Gens (PARK1: A53T [77], A30P [113], E46K [114]) mit autosomal domi-

nant vererbten, früh ausbrechenden Varianten der Krankheit assoziiert. Die momentan favorisierte Hypothese besagt, dass der Aminosäureaustausch in α -Synuclein zu einer beschleunigten Aggregation des Proteins führt. Dies wird unterstützt von der Tatsache, dass auch in Individuen mit Duplikation bzw. Triplikation des α -Synuclein-Gens, was zu einem höheren Expressionslevel und damit zu beschleunigter Aggregation führt, ein sehr früher Krankheitsausbruch beobachtet werden kann (PARK4 [115]). Der genaue Einfluss der Punktmutationen wird allerdings noch intensiv debattiert. Im Falle der Mutante A53T wurde eine schnellere Aggregation zu Fibrillen im Vergleich zu wt-Protein gefunden [80][116], während die A30P-Variante schneller Oligomere aber nicht Fibrillen bildet [117]. Für die dritte Mutante E46K wurden sogar verlangsamte Aggregationskinetiken *in vitro* gefunden [118]. Im weiteren wurde ausserdem eine im Vergleich zum Wildtyp-typischen [119] verminderte Bindung der Mutante an Lipidvesikel *in vitro* gefunden [120]. Dies könnte auf einen, nicht direkt mit Aggregation assoziierten Einfluss der Punktmutanten hinweisen. Ein weiterer Hinweis auf beschleunigte Aggregation von α -Synuclein als Ursache für pathogene Neurodegeneration liefern die erhöhten mRNA-Level die sowohl in Fällen von sporadischen [121] wie auch familiären [122] Fällen von Morbus Parkinson gefunden wurden.

1.3.2 Das Protein α -Synuclein

Die physiologische Funktion von α -Synuclein

α -Synuclein ist ein über mehrere Spezies stark konserviertes, zytosolisches Protein von 140 Aminosäuren Länge, welches zuerst in *Torpedo californica* beschrieben wurde. Es wird in dem Synapsenendköpfchen im dopaminergen Systems expremiert und macht dort ca. 0.5–1.0% des gesamten zytosolischen Proteininhalts aus [123][124]. α -Synuclein gehört zu der Synuclein-Familie, die auch noch β -Synuclein und γ -Synuclein umfaßt. Die verschiedenen Synucleine teilen eine sehr ähnliche, von Wiederholungen durchsetzte N-terminale Sequenz, während sie sich am stärksten am C-terminalen Ende unterscheiden [125]. Rekombinantes α -Synuclein hat in wässriger Lösung keinerlei beständige Sekundärstruktur, es wird daher als nativ ungefaltete bezeichnet [126]. Die Aminosäuresequenz und die zelluläre Lokalisation des Proteins implizieren eine mögliche Interaktion mit Lipidmembranen. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Region mit negativ geladenen Phospholipiden wechselwirkt, was mit einem Zuwachs an α -helikaler Faltung von ca. 3% zu ca. 60% verbunden ist [119]. α -Synuclein besitzt eine Reihe von potentiell phosphorylierbaren Aminosäureresten. In transfizierten Zellen wird α -Synuclein konstitutiv an den Serin-Resten in Position 87 und 129 phosphoryliert, mit Bevorzugung der letztgenannten

Position [127]. Position 129 liegt dabei in einer Konsensus-Sequenz für Casein-Kinase-1, die auch in β -Synuclein und γ -Synuclein vorhanden ist. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren in der Lage sind α -Synuclein zu phosphorylieren, was wiederum dessen Fähigkeit zur Interaktion mit Phospholipidmembranen verminderte [128].

Die Rolle von α -Synuclein in membran-assoziierten Prozessen im präsynaptischen Endköpfchen wird durch weitere Beobachtungen unterstützt. So zeigen α -Synuclein Knockout-Mäuse eine erhöhte Dopamin-Freisetzung in den nigrostriatalen Endköpfchen nach Stimulierung durch elektrische Pulse, was auf eine Rolle des Proteins als negativen Regulator der Dopamin-abhängigen Neurotransmission hinweist [129]. Ausserdem führt die Entfernung von α -Synuclein aus primären Neuronen des Hippocampus mit Hilfe von Antisense-Nukleotiden zu einer Verringerung des distalen präsynaptischen Vesikel-Pools [130]. Zu guter Letzt wird α -Synuclein spezifisch in einer bestimmten Subpopulation von präsynaptischen Endköpfchen von Singvögeln während deren Gesang-Lernphase hochreguliert, was auf eine Rolle des Proteins in Modulierung der synaptischer Plastizität hinweist [131]. Interessanterweise schützt die Überexpression von α -Synuclein gegen Neurodegeneration ausgelöst durch die Entfernung des Cysteinestring-Proteins, welches für das korrekte Anordnen des in der Vesikelfusion involvierten SNARE-Komplexes nötig ist [132]. Offensichtlich spielt α -Synuclein eine Rolle in der Stabilisierung des SNARE-Komplexes, bzw. im korrekten Ablauf der Fusion der synaptischen Vesikel im Allgemeinen. Zusammengekommen implizieren sämtliche Beobachtungen dass die physiologische Funktion von α -Synuclein in der Regulation des synaptischen Vesikel-Pools liegt. Es sollte allerdings angemerkt werden, dass eine abschliessende Bewertung der Rolle von α -Synuclein in dem Ablauf der Neurotransmission noch aussteht.

Die Primärstruktur von α -Synuclein ist charakterisiert durch sieben unvollkommene 11-mer Wiederholungssequenzen, die ein KTKEGV Motiv enthalten. Diese liegen in den ersten 90 Aminosäuren, der membranbindenden Domäne, an den sich ein azider C-Terminus anschliesst. Die 11-mer Wiederholungssequenz von α -Synuclein weist Ähnlichkeiten zu Aminosäuremotiven des Apolipoproteins A-I auf, die dort wahrscheinlich eine bedeutende Rolle in der Ausbildung von helikalen Lipid-Bindungsdomänen spielen [133]. Diese Hypothese stimmt mit der Beobachtung überein, dass nativ ungefaltetes α -Synuclein eine Konformationsänderung von Random-Coil zu α -Helix vollzieht, wenn das Protein in Kontakt mit negativ geladenen Membranen gebracht wird [119]. Durch Hochauflösungs-NMR von α -Synuclein, gebunden an negativ geladenen Detergenz-Mizellen, konnte die genauere Struktur der α -helikalen Faltung bestimmt werden [134]. Diese zeigt zwei gekrümmte 3/11 Helices, mit einem

Die Struktur von α -Synuclein

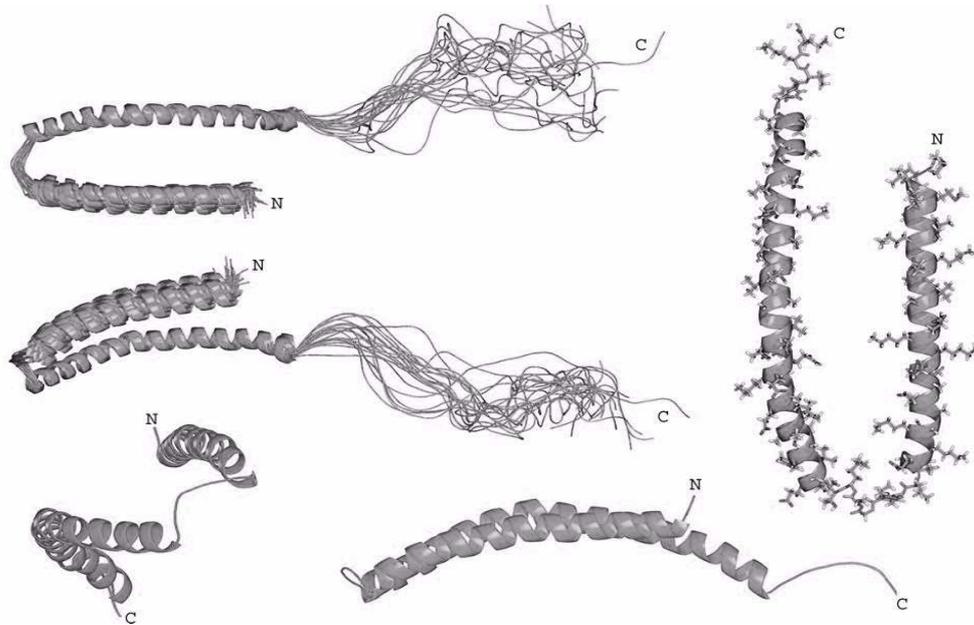


Abb. 1-10 Hochauflösungs-NMR-Struktur von α -Synuclein, gebunden an SDS-Mizellen nach [134]. Zu sehen sind die beiden N-Terminalen Helices, die eine leichte Krümmung auf Grund der Bindung an die Mizelle aufweisen, sowie der ungefaltete C-Terminus.

ungefalteten C-terminalen Ende (Abb. 1-10). Die erste N-terminale Helix besteht dabei aus den Aminosäuren 3-37, gefolgt von einer kurzen Verbindungsregion. Die zweite Helix schliesst die Aminosäuren 45-92 ein, wobei die restlichen Positionen 93-140 unstrukturiert sind. In den NMR-Studien wurde eine leichte Krümmung der beiden Helices festgestellt, die interessanterweise nicht mit den ca. 9 nm Durchmesser der während der Experimente assoziierten Mizellen übereinstimmt, sondern eher an einen Vesikel mit 50 nm Durchmesser angepasst zu sein scheint, was ca. den Durchmesser eines synaptischen Vesikels darstellt [135].

In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass nicht nur negative Ladung die Bildung von α -Helices und Bindung an Lipide zu stimulieren scheint, sondern auch starke Krümmung der betreffenden Membran wie sie z.B. durch kleine unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicles, SUV) gestellt wird, solange die beteiligten Lipide thermotrope Phasenübergänge unterlaufen [136][137]. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein in diesem System eine hohe Affinität zu Packungsdefekten in den gekrümmten Membranen zeigt und diese grösstenteils neutralisiert, was zu einer Stabilisierung des Vesikels führt. Es konnte ausserdem eine Bindung und Faltung des Proteins an Vesikel bestehend aus Sphingomyelin und Cholesterin mit koexistierenden l_d und l_o Phasen gefunden werden. Beachtet man, dass Sphingomyelin und Cholesterin in Lewy-Bodies gefunden wurden [138], kann vermutet werden, dass

Lipid-Rafts eine Plattform für die Lipidbindung von α -Synuclein an stark gekrümmte Membranen bildet, wie dies in Cholesterin-reichen synaptische Vesikeln der Fall ist [135]. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass die Expression von α -Synuclein in Hefe den vesikulären Transport stark beeinflusst [139][140] und in Tiermodellen einen starken Einfluss auf die Plastizität des synaptischen Vesikel-Pools hat [130][141].

Die Rolle des ungefalteten C-Terminus ist unklar. Die Entfernung des C-Terminus führt allerdings zu beschleunigter Aggregation des Proteins [142]. Die Flexibilität des C-Terminus könnte also zu einer Stabilisierung von sich schnell ineinander umwandelnder Strukturen in Lösung führen, und dadurch die Aggregation inhibieren [143]. Partielle Proteolyse, wie z.B. durch das 20S Proteasom, könnte dabei zu einem selbst-propagierenden Zyklus aus Nukleation und Aggregation führen [144]. Die Beobachtung, dass die C-terminal verkürzte Variante ca. 15% des vorhandenen Proteins in Lewy-Bodies ausmacht [145][146], zeigt dabei die Relevanz dieser Sequenz für die Aggregation *in vivo*. Im weiteren wurde der C-Terminus mit während des Alterns gesteigerter Calcium-induzierter Membraninteraktion und darüber hinaus mit beschleunigter Aggregation assoziiert [147].

Eine weitere interessante Domäne des Proteins, die mit der Aggregation des Proteins in Verbindung gebracht wurde, betrifft die Aminosäuren 61-95. Diese Domäne, reich an hydrophoben Aminosäuren, wurde ursprünglich als Bestandteil der amyloiden Plaques in Patienten mit Morbus Alzheimer gefunden [148], was zu der Bezeichnung NAC-Domäne (Non Amyloid Component), führte. Ein weiterer Hinweis auf die Assoziation dieser Domäne mit der Aggregationstendenz des Proteins ist die Tatsache, dass den beiden homologen Synucleinen, β -Synuclein und γ -Synuclein, die eine stark verminderte Fähigkeit zur Fibrillenbildung zeigen [149], diese hydrophobe Sequenz fehlt. Diese Neigung zur Aggregation der NAC-Domäne spiegelt sich auch in theoretischen Vorhersagen der Aggregationstendenzen der Aminosäuresequenz wider [150]. Der wirkliche Nukleationskern, der notwendig für Fibrillenformation zu sein scheint, wird dabei den Aminosäuren 71-82 zugeschrieben [151]. In den Fibrillen ist die Sequenz der Aminosäuren 36-98 interessanterweise weder in der ungeordneten Konformation des gelösten Proteins, noch in der α -helicalen Faltung der Membran-assoziierten Form, sondern nimmt eine parallele Faltblattstruktur an [152].

2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Synthetisches 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC), Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC), Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerin)] (DPPG), Ei-Sphingomyelin (EYSM), Ei-Phosphatidylcholin (EYPC), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerin)] (POPG), Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC) und Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC) und 1-Perdeuteropalmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC- d_{31}) wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) erworben. Das aus Ei gewonnene Sphingomyelin und Phosphatidylcholin hatten folgende Zusammensetzung:

Gekaufte Lipide

Acylkette	EYSM	EYPC
16:0	84	34
16:1	0	2
18:0	6	11
18:1	0	32
18:2	0	18
20:0	2	0
20:4	0	3
22:0	4	0
24:0	4	0
Molmasse	703.03	

Tab. 2-1 Fettsäureverteilung (in %) und molare Masse (in g/mol) von EYSM und EYPC laut Herstellerangaben (Avanti Polar Lipids, AL, USA)

Die Struktur der verwendeten Lipide und die zugehörigen Phasenübergangstemperaturen sind in Abb. 2.1 dargestellt.

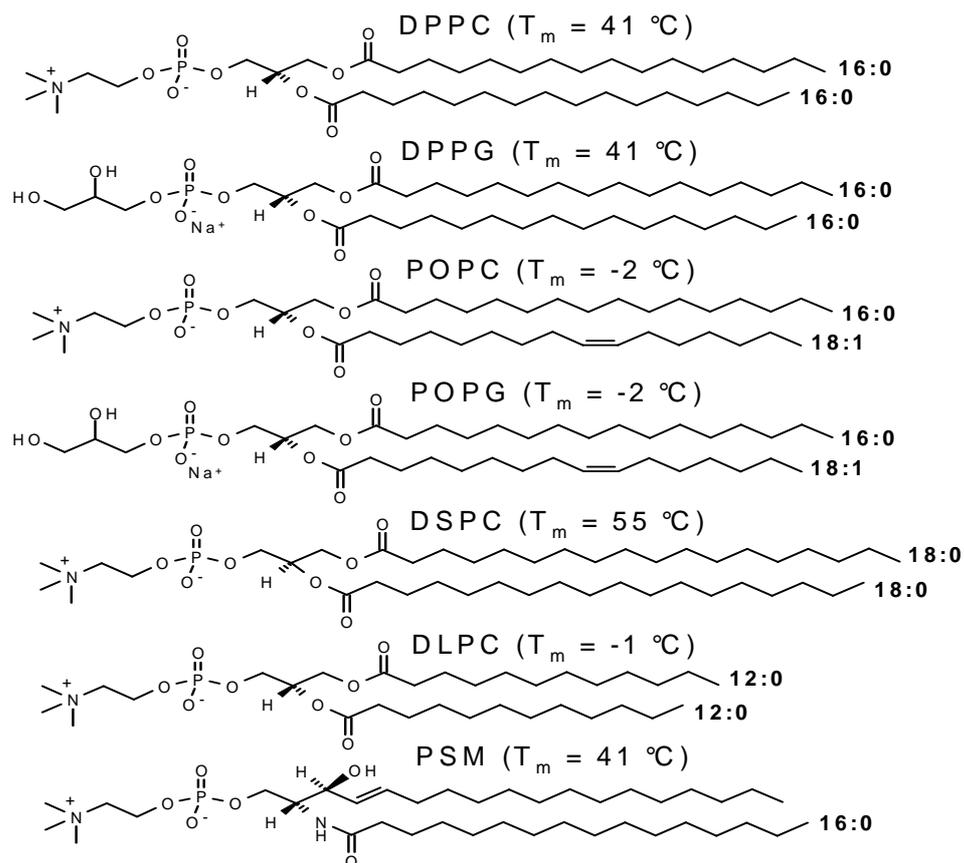


Abb. 2-1 Strukturformeln der verwendeten Lipide und deren thermotrope Phasenübergangstemperaturen von flüssig-kristallin zu gelförmig.

Darstellung von perdeutertem PSM

Perdeutertes N-perdeuteropalmitoyl-sphingomyelin (PSM- d_{31}) wurde durch N-Acylierung von D-Erythrosphingosylphosphocholine synthetisiert. Dabei wurde der *p*-Nitrophenylester der Palmitinsäure und wasserfreies Kaliumcarbonat zu einer Lösung von *lyso*-Sphingomyelin in wasserfreien Dimethylformamid und Dichlormethan (mol/mol 1:1) gegeben und die Mischung für einen Tag unter Stickstoffatmosphäre rühren gelassen. Das *lyso*-Sphingomyelin wurde dabei durch wasserfreie, saure Methanolyse von Ei-Sphingomyelin wie beschrieben [63] erhalten. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:35:5). Die Reinheit des Produktes wurde über Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie überprüft.

Puffer

Soweit nicht anders angegeben wurde folgender wässriger Puffer benutzt: 20 mM NaPO_4 , 100 mM KCl, 0.2 g/l NaN_3 , pH 7.4 (Laborbezeichnung: „ITC-Puffer“). Für Verwendung in DLS-Experimenten wurden eventuell in Lösung vorhandene Staubbpartikel mittels eines 0.2 μm Whatman Anotop 10 filter (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) entfernt.

75 mg Glycin (MW: 75.07) wurden in 100 ml H₂O_{dest.} gelöst und mit Hilfe von NaOH ein pH von 9 eingestellt. 5 ml dieser Mischung wurde direkt vor jeder Messung mit 5 µl einer Thioflavin T Stammlösung (3.2 mg Thioflavin T in 1 ml EtOH, [ThT] = 10 mM) versetzt um den fertigen Thioflavin T Puffer ([ThT] = 10 µM) zu erhalten.

Thioflavin T Puffer

Perdeuterierte Palmitinsäure (*d*₃₁-Palmitinsäure) und Deuteriumoxid stammten von Cambridge Isotopes (Promochem GmbH, Wesel, Deutschland). Cholesterin und C₁₂E₈ (Octaethylen-glycol-monododecyl-ether) wurden von Sigma bezogen, SDS von SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland). N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (NBD-PE) und Rhodamin-B-1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (Rh-PE) wurden bei Invitrogen gekauft. Die Synthese der Peptide KTKEGV, 1-25, 9-36, 31-55, 41-65, 61-85 und 115-140 wurde bei Coring System Diagnostics GmbH (Gernsheim, Deutschland) in Auftrag gegeben.

Sonstige Materialien

2.2 Probenpräparation

2.2.1 Proteinpräparation

Um Proteinlösungen herstellen wurden die Peptide, wt- α S, die Deletionsmutanten, sowie die chemisch trunkierte Variante von α S (α S₆₋₁₁₅) trocken eingewogen und mit abgemessener Menge Puffer versetzt um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Zur weiteren Verifizierung wurden die Konzentration der Stammlösung, ausser im Fall der zu wenig UV-absorbierenden Peptidfragmente (KTKEGV, 1-25, 9-36, 31-55, 41-65, 61-85 und 115-140), photometrisch durch Messung eines Transmissionsspektrums bestimmt (theoretischer Extinktionskoeffizient von wt- α S und den Deletionsmutanten: $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 5960 \text{ (Mol/l*cm)}^{-1}$, theoretischer Extinktionskoeffizient von α S₆₋₁₁₅: $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 1490 \text{ (Mol/l*cm)}^{-1}$).

Allgemeine Proteinpräparation

Um das Fragment α S₆₋₁₁₅ zu erhalten wurde rekombinates α S mit Hilfe von CNBr selektiv an den Methioninen in Position 5 und 115 gespalten [153]. Dazu wurde das gereinigte Protein in 70% Vol% Ameisensäure gelöst und 2% wt% CNBr zugegeben. Die Mischung wurde für 18 Stunden bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Rohprodukt wurde lyophilisiert, in Puffer gelöst und mit einer S-200 Sephadex-Säule chromatographisch gereinigt (Laufmittel: ITC-Puffer). Das Produkt wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie identifiziert (MALDI-TOF, m/z: 11112 [(M+Na)⁺]). Der Reaktionsmechanismus nach [153] ist in Abb. 2.2 dargestellt. Die Spaltung verläuft

Bromcyanspaltung von rekombinanten α -Synuclein

über Anlagerung des CNBr an den Thioester des Methionins (**1** in Abb. 2.2) unter Bildung eines Cyansulfoniumbromintermediats (**2**). Bei saurem pH erfolgt in einem Zwischenschritt unter Abspaltung von Methylthiocyanat (**3**) die Umlagerung zu einem Iminolacton (**4**). Die Spaltung des Proteins wird mit der Bildung des C-terminalen Homoserinlactons durch die im Säuren anschließende Hydrolyse der Peptidbindung abgeschlossen. Das C-terminale Ende bleibt hierbei zum Homoserinlacton (**5**) modifiziert.

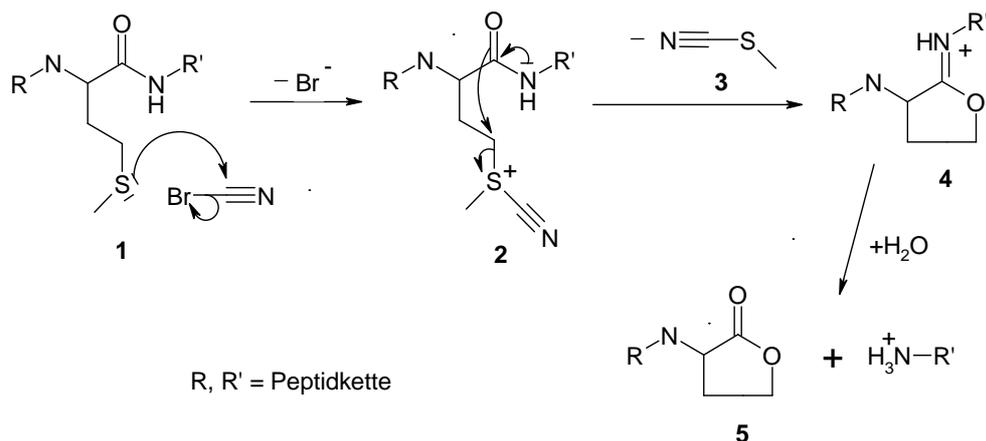


Abb. 2-2 Reaktionsmechanismus der spezifischen Peptidspaltung am Methionin mit Bromcyan nach [153].

Die Spezifität der Reaktion beruht darauf, dass zwar mehrere andere Aminosäurenseitenketten ein für die Bildung eines zu **2** analogen Intermediats notwendiges Nucleophil aufweisen (Aspartat, Cystein, Glutamat, Serin, Threonin, Tyrosin), diese Nucleophile jedoch vor Bildung des Lactons durch Deprotonierung eine stabile Verbindung mit den Cyanid eingehen. Da sich dadurch ein neues elektrophiles Zentrum am Kohlenstoff des Cyanids bildet, wird dieses durch einfachen Angriff von Wasser wieder hydrolysiert und von dem Aminosäurerest als Cyansäure abgespalten.

Zielgerichtete Mutagenese zur Konstruktion von α -Synuclein-Deletionsmutanten

Die N-terminalen Deletionsmutante 3-140, 4-140 and 5-140 wurden mittels der Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifiziert [154]. Dazu wurden die 5'-Oligonucleotid-Primer GGAATTCCATATGGTATTCATGAAAGGACTTTA (3-140), GGAATTCCATATGTTTCATGAAAGGACTTTAAAG (4-140) und GGAATTCCATATGATGAAAGGACTTTAAAGGCC (5-140) und dem 3'-Oligonucleotid-Primer GGAATTCCATATGTTAGGCTTCAGGTTTCGTAGTC benutzt. Für das C-terminale Deletionsmutanten-Konstrukt (1-116) wurde der 5'-Oligonucleotid-Primer GGAATTCCATATGATGTATTCATGAAAGGACTT und der 3'-Oligonucleotid-Primer GGAATTCCATATGTTACATATCTTCCAGAATTCCTTCCTG benutzt. Die Primer enthielten eine

Sequenz die einen spezifischen Verdau durch das Restrictionenzym NdeI ermöglichte. Für die PCR wurden jeweils 25 µl Probe und 25 µl Mastermix zusammen pipettiert:

Probe	Mastermix
1 µl dNTP-Mischung ([10 mM] je dNTP, Roche, Mannheim)	10 µl Pwo DNA-Polymerase (1 U/µl, Peqlab, Erlangen)
1 µl = 100 ng cDNA	
1 µl 5'-Oligonucleotid-Primer	20 µl Reaktionspuffer (10x, Peqlab, Erlangen)
1 µl 3'-Oligonucleotid-Primer	
21 µl H ₂ O (bidest., steril)	70 µl H ₂ O (bidest., steril)

Tab. 2-2 In der PCR verwendete Reaktionsmischung

Die DNA Konzentrationen wurden photometrisch (Jasco V-550 Spektrophotometer) durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt. Es wurden jeweils Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen gebildet. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	94	5 min
2	94	30 s
3	63	30 s
4	72	30 s
5	Wiederholung der Schritte 2-4 (29x)	
6	72	10 min
7	10	-

Tab. 2-3 Programm der PCR

Die korrekte Amplifizierung wurde mittels Elektrophorese (1,5% Agarose, TBE-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM Na₄EDTA, pH 8) überprüft. Die Fragmente wurden mittels eines Kits gereinigt (NucleoSpin Extract II, Machery-Nagel, Düren) und die Proben, sowie das Plasmid pET-5a mit einem T7 Promotor (Novagen, San Diego, USA) mittels NdeI über Nacht bei 37 °C verdaut:

Ansatz Restriktionsverdau je Probe

25 µl PCR Produkt/Plasmid (10 µg)
1,5 µl NdeI (20 U/µl, New England Biolab, New England, USA)
5 µl 10x Reaktionspuffer (New England Biolab, New England, USA)
18,5 µl H ₂ O (bidest., steril)

Tab. 2-4 Reaktionsansatz für Restriktionsverdau mittels NdeI

Die Proben wurden gereinigt (NucleoSpin Extract II, Machery-Nagel, Düren). Im Falle des Plasmids wurde der korrekte Verdau erneut über Agarosegel-Elektrophorese bestätigt. Die PCR Produkte wurden nun mittels Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 1 U/µl, Roche, Mannheim) 10 Minuten bei 37 °C dephosphoryliert und das Enzym anschließend 15 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

Ansatz Dephosphorylierung je Probe

50 µl PCR Produkt
7 µl SAP
6 µl Reaktionspuffer
4 µl H ₂ O (bidest., steril)

Tab. 2-5 Reaktionsansatz für Dephosphorylierung mittels SAP

Die Ligation von DNA wurde mit T4 DNA Ligase (1000 U/µl, Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 50-100 ng Vektor-DNA mit dem jeweiligen DNA-Fragment in molaren Verhältnissen von 1:3 bis 3:1, dem entsprechenden Puffer und 1 µl T4 Ligase in 10 µl Reaktionsvolumen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die primäre Transformationen erfolgte nach der sog. Hitzeschock-Methode. Ein Aliquot der transformationskompetenten Bakterien BL21(DE3) wurde auf Eis aufgetaut und 10 min mit 3 µl eines Ligationsansatzes inkubiert. Der Ansatz wurde 45 Sekunden auf 42 °C erwärmt und auf mit Ampicilin (100 µg/ml) versetztem LB-Agar Nährboden ausplattiert. Jeweils fünf positive Kolonien wurden pro Mutante gepickt, in 5 ml mit Ampicilin (100 µg/ml) versetztem LB-Nährmedium angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurden Mini-Preps von je 2 ml der Bakteriensuspension (NucleoSpin Plasmid Kit, Machery-Nagel, Düren) angefertigt und die Konstrukte durch Sequenzierung (GATC Biotech, München) bestätigt. 0,5 ml der positiven Klone wurden nun mit 0,5 ml einer 85 Vol%igen Lösung von Glycerin in H₂O (bidest., steril) gemischt und bei -80 °C eingefroren.

Nach 4-stündiger Kultivierung unter Beigabe von Isopropyl- β -D-Thiogalactosid wurden die Bakterien durch Einfrieren/Auftauen und Beschallung lysiert. Nach weiterem 15-minütigem Kochen und anschließender Zentrifugation (17000xg) wurde der hitzeresistente Überstand auf eine Q-Sepharose-Säule (Firma Amersham Biosciences) geladen und gereinigt. Auf einer Superdex 75 Gel-Säule wurde die α -Synuclein-enhaltende Fraktion entsalzt, wie in [155] beschrieben. Dem Einsatz des Proteins ging ein finaler Reinigungsschritt auf einer S-200-Sephacryl-Säule in einer ÄKTA Purifier-Anlage (FPLC) (Firma Amersham Biosciences) voraus.

Expression und Reinigung von α -Synuclein und dessen Mutanten

Um die α -Synuclein Oligomere zu präparieren wurde gereinigtes und lyophilisiertes α -Synuclein in 100 μ l ITC-Puffer gelöst, um eine Proteinkonzentration von 350 μ M zu erhalten. Eine Abtrennung eventuell bereits vorhandener Aggregate in dieser Lösung fand nicht statt, da diesbezügliche Versuche (lyophilisieren aus reinem Hexafluoroisopropanol, Zentrifugation der Probe) keinerlei Einfluss auf die Ausbeute an Oligomeren zeigten. Die Proteinlösung wurde auf Eis für 60 min inkubiert und die entstandenen Aggregate sofort mittels einer S-200-Sephacryl-Säule in einer ÄKTA Purifier-Anlage (FPLC) (Firma Amersham Biosciences) die mit ITC-Puffer equilibriert wurde, getrennt. Ein charakteristisches Chromatogramm dieser Reinigung ist in Abb. 2-3 abgebildet.

Präparation der α -Synuclein Oligomere

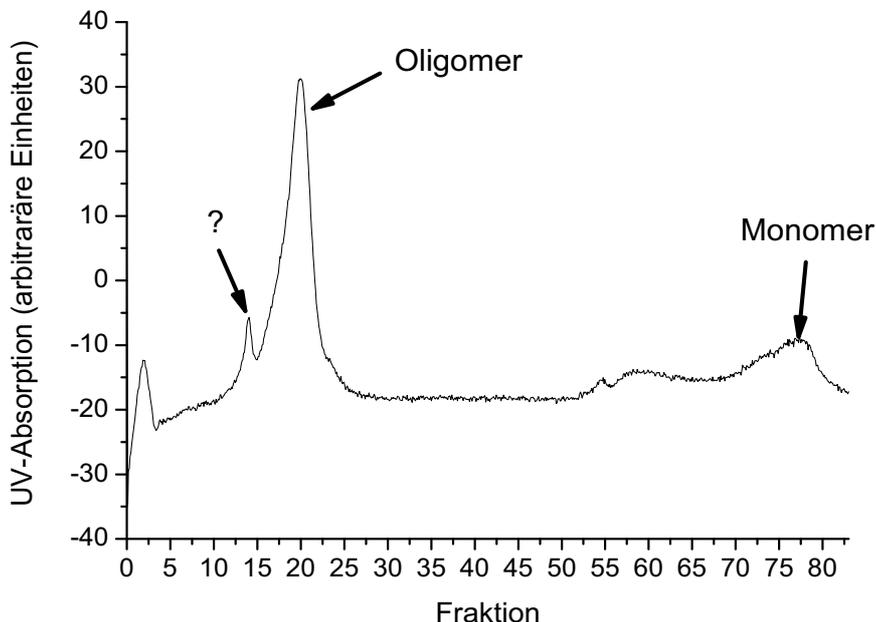


Abb. 2-3 Typisches Säulenchromatogramm einer Reinigung von α -Synuclein-Oligomeren mittels einer Sephadex S-200 Gelfiltrationssäule. Markiert sind die Signale für α -Synuclein Oligomere und Monomere, sowie ein nicht zuordnungsbares Signal, welches vermutlich zu einer Aggregatspezies zwischen Fibrillen und Oligomeren gehört.

In diesem Chromatogramm sind deutlich die Signale von α -Synuclein Monomer und Oligomer zu erkennen. Das sehr breite Signal links des Monomersignals (welches über Massenspektrometrie bestätigt wurde) zeigt wahrscheinlich die Existenz kleinerer Aggregate (Dimere, Trimere usw.) an. Das mit einem Fragezeichen markierte Signal, welches in jedem Säulenlauf vorhanden war, gehört wahrscheinlich zu einer Aggregatspezies die von der Grösse knapp oberhalb der Oligomere liegt. Da jedoch auch mehrere Säulenläufe nicht genug Protein lieferten, um eine Grössenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) zuzulassen, konnte diese Frage nicht geklärt werden. Die Oligomere lieferten in der Grössenbestimmung mittels DLS einen uniformen hydrodynamischen Durchmesser von 34 nm. Die Oligomer-Fractionen wurden im weiteren in VISKING Typ 27/32 Dialyseschläuche (SERVA, Heidelberg) überführt und gegen destilliertes Wasser dialysiert (Probenvolumen ca. 8 ml, Austauschvolumen 1 l, mindestens 5 Schritte je 45 min). Die so erhaltene Proteinlösung wurde in 1.5 ml Eppendorf LoBind Reaktionsgefässe (Eppendorf, Hamburg) überführt, mit flüssigem N_2 eingefroren und lyophilisiert. Die verschiedenen trockenen Fractionen wurden erneut in 50 μ l destilliertem Wasser aufgenommen, die Reaktionsgefässe mit je zweimal 50 μ l destilliertem Wasser ausgespült und sämtliche Fractionen in einem LoBind Gefäss vereinigt und erneut eingefroren sowie lyophilisiert.

2.2.2 Präparation der Lipidvesikel

Präparation der unilamellaren Schallvesikel (SUV)

Die Phospholipide ($[Lipid_{Total}] = 10\text{mmol}$) wurden in 1 ml Puffer für 30 min bei 45°C hydratisiert. Um uniforme SUV (Small Unilamellar Vesicles = Kleine unilamellare Vesikel, Durchmesser 30 nm) zu erhalten wurde die Phospholipid-Suspension für 20 Minuten unter Ar bei Temperaturen $\sim 5^\circ\text{C}$ über der betreffenden Phasenübergangstemperatur (T_m) der Lipide beschallt. Zur Beschallung wurde ein Branson Sonifier Cell Disruptor B15 (Branson, CT, USA) mit einer Mikrospritze benutzt und mit einer Pulsdauer von 30% und einer Pulsstärke von 4 betrieben. Falls die Vesikel aus einer Mischung von verschiedenen Lipiden oder Cholesterin bestanden, wurden die betreffenden Mischungen zuerst in CHCl_3 aufgenommen, das Lösemittel unter N_2 -Strom abgeblasen und die Probe für eine Stunde im Vakuum getrocknet. Die Lipidmischungen wurden in *t*-BuOH gelöst, tiefgefroren und über Nacht lyophilisiert. Die so vollständig durchmischten Lipide wurde in 1 ml Puffer für eine Stunde oberhalb von T_m hydratisiert und anschliessend beschallt. Die Vesikellösungen wurden oberhalb von T_m aufbewahrt um vorzeitige Fusion zu unterbinden und bei $12000\times g$ 5 Minuten

lang zentrifugiert um eventuell vorhandene Titansplitter abzutrennen. Zur Prüfung der Uniformität der Vesikelgrösse mit einem Durchmesser von ca. 30 nm wurde ein Malvern HPP5001 DLS Spektrometer benutzt.

Zur Herstellung der unilamellaren Extrudervesikel (Large Unilamellar Vesicles = grosse unilamellare Vesikel, Durchmesser 100 nm) wurden die Lipide, bzw. Lipidmischungen bis zur Hydratation behandelt wie bei der Präparation der SUV beschrieben (siehe oben). Die wässrigen Lipidsuspensionen wurden mehrmals in flüssigem N₂ tiefgefroren und wieder aufgetaut um die durch die Hydratation entstandenen multilamellaren Liposomen zu verkleinern und zu homogenisieren. Die Lipidlösungen wurden oberhalb der betreffenden T_m mittels eines Mini-Extruders durch Polycarbonatmembranen (beides LipoFast™, Armatis GmbH, Weinheim, Deutschland) mit einer Porengrösse von 100 nm gepresst um uniforme LUV mit einem Durchmesser von 100 nm zu erhalten. Zur Prüfung der Uniformität der Vesikelgrösse mit einem Durchmesser von ca. 100 nm wurde ein Malvern HPP5001 DLS-Spektrometer benutzt.

Präparation der unilamellaren Extrudervesikel (LUV)

Für die Experimente zur Erforschung der Fusionkinetik von Lipid-SUV mittels Fluoreszenzspektroskopie wurden jeweils zwei Vesikelsorten vorbereitet. *Akzeptorvesikel*: Die Lipidvesikel wurden hergestellt wie oben bei der SUV-Präparation beschrieben. Im Fall von negativ geladenen Lipidvesikeln, deren Fusion durch Zugabe von Ca²⁺-Ionen gestartet wurde, ist die gesamte Probenpräparation statt mit ITC-Puffer mit 20 mM HEPES-NaOH Puffer (pH 7.4) vorgenommen worden. *Donorvesikel*: Stammlösungen von 1 mM NBD-PE und 1 mM N-Rh-PE wurden in CHCl₃ angesetzt. Die Lipide ([Lipid_{Total}] = 10 μmol) wurden in CHCl₃ gelöst und mit 200 μl 1 mM NBD-PE und 200 μl 1 mM Rh-PE gemischt. Das Lösemittel wurde unter N₂-Strom abgeblasen und die Probe für eine Stunde im Vakuum getrocknet. Danach wurde ein 1 ml Puffer zugegeben und die Lipide für 30 Minuten oberhalb der betreffenden T_m hydratisiert. Im weiteren wurden die beiden Vesikelsorten behandelt wie bei der Präparation der unilamellaren Schallvesikel beschrieben.

Präparation von Fluoreszenzmarkierten SUV

2.2.3 Präparation der Lipidmembranen für NMR-Messungen

Die Lipide mit einer Gesamtmasse (Lipide und Cholesterin) von 25-30 mg, mit einem Minimalanteil an deuteriertem Material von 12 mg, wurden in 2,5 ml *t*-BuOH gelöst. Jeweils 48 μl der so erhaltene Lipidlösung wurde mit Hilfe einer Mikropipette auf 50 ultradünne Glassplättchen (8.3x18.3x0.08 mm; Marienfeld Laboratory Glassware,

Orientierte Membranen

Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgetragen und für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Mit einer Fläche von 152 mm^2 pro Glasplättchen und einer ungefähren Fläche von 60 \AA^2 pro Lipid wurden damit ca. 700 Lipid-Doppelschichten pro Glasplättchen erhalten. Die Reste des Lösungsmittels wurden anschliessend in durch Evakuierung der Probe für mindestens 18 Stunden bei ca. 20-30 Pa entfernt. Wie in der Abb. 2-4 beschrieben wurden die Glasplättchen aufeinander gestapelt und zusammen mit zwei Hälften eines Glaszylindersegments ober- und unterhalb der Glasplättchen in ein dafür zugeschnittenens NMR-Röhrchen (Aussendurchmesser 10 mm) geschoben. An den offenen Enden des Glasröhrchens wurden nun zwei Filterpapierstreifen angebracht, die mit jeweils $7 \mu\text{l}$ einer $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90:10 (v/v) getränkt wurden um die langsame Hydratisierung der Lipidschichten gewährleistet. Anschliessend wurden beide Enden des Röhrchens mittels zwei Teflonstöpseln mit O-Ringen aus Silikon abgedichtet. Um die Probe zusätzlich vor Dehydratation zu schützen, wurden die Silikonstöpsel vor Einführung in die Glasröhrchen mit Parafilm umwickelt. Die Membranen wurden vor der Messung bei $45 \text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens 8 Stunden inkubiert. Die korrekte Orientierung der Lipid-Schichten und deren ausreichende Hydratierung wurden durch Messung des Wassersignals an der Offset-Frequenz des NMR-Spektrums sichergestellt. Die Reinheit der Lipide wurde zu Beginn und am Ende der NMR-Messreihen mittels Dünnschichtchromatographie geprüft.

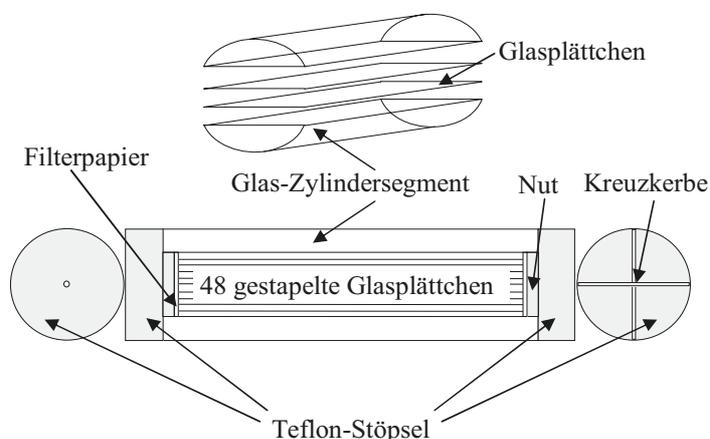


Abb. 2-4 Schematische Zeichnung des Probenhalters für ^2H -Festkörper-NMR-Messungen von orientierten Lipid-Doppelschichten

Unorientierte Membranen

Die unorientierten NMR-Proben wurden wie folgt hergestellt: Die aus *t*-BuOH lyophilisierte Lipid-Mischung, mit einem Anteil von mindestens 20 mg an deuteriertem Material, wurde in ein an einer Seite abgeschmolzenes Glasrohr mit einem inneren Durchmesser von 10 mm eingewogen und 50 wt% isotopenreines $^1\text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Die Probe wurde an den Boden des halboffenen Glasrohrs zentrifugiert und unter

Erhitzung mittels eines Sauerstoffbrenners unter Ar oberhalb der Probe eine Verengung in das Glas gezogen. Direkt danach wurde das offene Ende des Glasrohrs unter Vakuum abgeschmolzen und dadurch versiegelt. Während der gesamten Erhitzung wurde der Boden des Glasrohrs mit der Probe in flüssigem N₂ gekühlt. Das Probengefäß wurde ca. 6-8 mal bei 5000xg oberhalb der Phasenübergangstemperatur zentrifugiert, wobei nach jedem Zentrifugationsschritt das Gefäß invertiert wurde. Durch das mehrfache Passieren der Lipidmischung durch die Verengung wurde komplette Durchmischung und gleichmässige Hydratation der Probe sichergestellt. Das Glasrohr wurde nun an einer Seite mit Hilfe eines Glasschneiders geöffnet und die Probe in eine runde Polykarbonat-Hülse mit einem äusseren Durchmesser von 5 mm überführt, indem leichter Druck mit Hilfe eines Pipettenhütchens appliziert wurde. Die Hülse wurde beidseitig mit Hilfe von maschinell gefertigten Teflon-Stöpseln verschlossen. Vor der Messung wurde die Probe mindestens 6 Stunden bei 50 °C äquilibriert. Der Hydratationsstatus konnte auf Grund der Verwendung von isotonenreinem ¹H₂O nur über das Aussehen des ²H-NMR-Spektrums oberhalb des Phasenübergangs bestimmt werden. Die Reinheit der Lipide wurde auch in diesem Fall zu Beginn und am Ende der NMR-Messreihen mittels Dünnschichtchromatographie geprüft

2.3 Methoden und Messparameter

2.3.1 ²H-NMR-Spektroskopie

Alle ²H-NMR Spektren, bis auf die Relaxationszeitmessungen, wurden mit einem Varian VXR-400 Spektrometer mit einer magnetischen Flussdichte von 9.4 Tesla (²H Frequenz von 61.4 MHz) betrieben. Bei den Relaxationszeitmessungen wurde ein Bruker AMX-500 Spektrometer mit einer magnetischen Flussdichte von 11.8 T (²H Frequenz von 76.8 MHz) benutzt. Die Spektren der makroskopisch orientierten Membranen wurden in einer Spule mit 10 mm Durchmesser gemessen. Im Fall der orientierten Proben wurde ein handgefertigtes Goniometer benutzt um die Proben auf den Winkel $\theta = 0^\circ$ einzustellen, wobei θ den Winkel zwischen der Membranflächennormale und der Richtung des magnetischen Feldes darstellt [156]. Die unorientierten Proben wurden in einer 5 mm Spule gemessen und mittels schneller Dekonvolution durch gewichtete Fourier-Transformation de-Paked [157]. Zur Anregung des Signals wurde die quadrupolare Echo-Pulssequenz benutzt [158], mit einer 90°Pulsbreite von 10 μ s für die 10 mm Spule und 3 μ s für die 5 mm Spule. Der Pulsabstand betrug 20 μ s mit einer Recyclezeit die der jeweiligen Probe angepasst wurde um Sättigung zu vermeiden. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern

Festkörper-²H-NMR Spektroskopie

wurden nur der Realteil der Datenpunkte prozessiert und die Spektren symmetrisiert. Die Ordnungsparameter der einzelnen Kohlenstoffsegmente der N-Palmitoylkette von PSM- d_{31} oder der *sn*-1-Kette von POPC- d_{31} wurden aus den quadrupolaren Aufspaltungen der Signal berechnet:

$$|\Delta(\nu_Q^{(i)})| = \frac{3}{2}\chi_Q|P_2(\cos\theta)||S_{CD}^{(i)}| \quad \text{Glg.2.11}$$

χ_Q bezeichnet dabei die quadrupolare Kopplungskonstante (167 kHz für eine C- ^2H Bindung), $P_2(\cos\theta)$ ist das zweite Legendre Polynom, und $S_{CD}^{(i)}$ der Ordnungsparameter der *i*-ten Kohlenstoff-Deuterium Bindung der Kohlenstoffkette, vgl. Glg 1.10. Die quadrupolaren Aufspaltungen der C2 Methylengruppen wurden hierbei auf Grund ihrer Inäquivalenz nicht berücksichtigt; Die wahrscheinlich fast parallele Orientierung zur Membranoberfläche des *pro-R* Deuterons sowie der ungefähre 34° Winkel des *pro-S* Deuterons wie es z.B. für DPPC gezeigt wurde [159] erlauben keinen direkten Vergleich mit den anderen Methylensegmenten. Die Signale wurden normalerweise unter dem Gesichtspunkt zugeordnet, dass die Ordnungsparameter von dem C3 zu dem Methylende abnehmen und die Fläche unter jedem Signal proportional zur Anzahl der enthaltenen Deuteronen ist. Eine teilweise präzisere Zuordnung wurde, wo möglich, auf Grund bereits publizierter Daten [160][161] angewendet. Für die orientierten Proben wurde die Anzahl der Wassermoleküle pro Lipidkopfgruppe (n_W) berechnet, indem das Verhältnis der Integrale der ^2H -Signale von $^2\text{H}_2\text{O}$ und der perdeuterierten Lipide bestimmt wurde. Die Hydratation wurde dabei in einem Bereich gehalten, der volle Hydratisierung der Membrandoppelschichten garantierte ($25 < n_W < 35$). Der Winkel θ zwischen der Flächennormalen der Glasplättchen und dem magnetischen Feld wurde dabei solange variiert bis die quadrupolaren Aufspaltungen $\Delta\nu_Q^{(i)}$ ein Maximum erreichten, was den Fall $\theta = 0^\circ$ widerspiegelt (Glg. 2.11). Im Fall der unorientierten Proben wurde die vollständige Hydratation durch die Zugabe von 50 wt% Deuterium-depletiertem Wasser sichergestellt. Das erste Spektralmoment wurde jeweils für die unorientierten Pulverspektren berechnet nach:

$$M_1 = \frac{\int_0^\infty \omega f(\omega) d\omega}{\int_0^\infty f(\omega) d\omega} \quad \text{Glg.2.12}$$

mit $f(\omega)$ als Verteilungsfunktion der spektralen Intensitäten und $\omega = 0$ für die Larmorfrequenz ω_0 .

Zur Prozessierung der Daten im Sinne des First-Order-Mean-Torque Modells wurden zwei Routinen für das Programm MathCad (PTC, Needham, MA, USA) geschrieben. In diesen Routinen wurde das First-Order-Mean-Torque Modells nach [162][163] benutzt, welches im Folgenden etwas näher erläutert werden soll:

Berechnung der Strukturparameter mit Hilfe des First-Order-Mean-Torque Modells

Wenn als erste Annäherung für die mittlere Form der Kohlenstoffketten ein Prisma (Zylinder oder Quader) angenommen wird, kann die zurückgelegte Distanz zwischen den Kohlenstoffsegmente $i+1$ und $i-1$, projiziert auf die Membranflächennormale, ausgedrückt werden durch:

$$D_i = \frac{2V_{CH_2}}{A_i} \quad \text{Glg.2.13}$$

Dabei ist A_i die Querschnittsfläche und V_{CH_2} das Volumen einer einzelnen Methylengruppe. Das Volumen kann angenähert werden durch $V_{CH_2}(T) \approx V_{CH_2}^0 + \alpha_{CH_2}(T - (273))$ [163], mit den empirisch bestimmten Parametern $V_{CH_2}^0 = 26.5 \text{ \AA}^3$ und $\alpha_{CH_2} = 0.0325 \text{ \AA}^3/\text{K}$. D_i kann durch das theoretisch erreichbare Maximum der Projektion auf die Membranflächennormale (2.54 \AA) des Vektors, welcher zwei benachbarte Kohlenstoffatome des Segments i verbindet, sowie dessen Winkel mit der Flächennormale ausgedrückt werden:

$$D_i = D_M \cos \beta_i \quad \text{Glg.2.14}$$

Die mittlere Auslenkung eines Kohlenstoffsegments ist daher definiert als:

$$\langle D_i \rangle = D_M \langle \cos \beta_i \rangle \quad \text{Glg.2.15}$$

Dieses Ergebnis erlaubt die Berechnung der mittleren projizierten Kettenlänge $\langle L_C^* \rangle$, welche den mittleren Abstand zwischen dem C2 der Kohlenstoffkette und der terminalen Methylgruppe wiedergibt, durch Summation der Projektionen jedes Kohlenstoffsegments:

$$\langle L_C^* \rangle = \sum_{i=3,5,\dots}^{n_C} \langle D_i \rangle \quad \text{Glg.2.16}$$

Wobei n_C die Anzahl der Kohlenstoffatome pro Kette angibt. Indem wir $\langle D_2 \rangle$ als identisch zu $\langle D_3 \rangle$ annehmen und als Annäherung für den Beitrag der terminalen Methylgruppe $n_C=16$ den Term $\langle D_{n_C-1} \rangle$ zufügen können wir die volle Kettenprojektion bestimmen:

$$\langle L_C \rangle = \frac{1}{2} \sum_{i=2}^{n_C-1} \langle D_i \rangle + \langle D_{n_C-1} \rangle \quad \text{Glg.2.17}$$

Es sollte hierbei betont werden, dass die hydrophobe Dicke und die Kettenlänge auf Grund der Verteilung der Acylkettenlängen und durch Verzahnung der beiden Lipidschichten nicht notwendigerweise identisch sind. Obwohl es möglich ist, die mittlere Kettenprojektion über Summation der Beiträge der einzelnen Kohlenstoffsegmente zu bestimmen, kann die hydrophobe Dicke D_C , in guter Übereinstimmung mit Daten aus der Röntgenstreuung [163], einfach aus den Werten der Kohlenstoffsegmente der Plateauregion berechnet werden. Mit der Annahme, dass die mittlere Form einer Kohlenstoffkette ungefähr der eines geometrischen Prismas gleicht, ist die volumetrische Dicke D_C verbunden mit der mittleren Fläche $\langle A \rangle$ über:

$$D_C = \frac{2V_C}{\langle A \rangle} \quad \text{Glg.2.18}$$

Hier bezeichnet V_C das Gesamtvolumen einer einzelnen Kohlenstoffkette. Es ist bekannt, dass das Volumen einer Methylgruppe ungefähr dem doppelten einer Methylengruppe entspricht mit $V_{CH_3} \approx 2V_{CH_2}$ [294][295][296]. Für den oberen Teil der Kohlenstoffkette (nahe dem Wasser-Interface) Glg. 2.13 umgeformt werden zu:

$$\langle A \rangle = \frac{2V_{CH_2}}{D_M} \left\langle \frac{1}{\cos \beta} \right\rangle \quad \text{Glg.2.19}$$

In obiger Gleichung repräsentiert $\langle A \rangle$ die mittlere Fläche pro Acylkette in der Nähe des Wasser-Interface und β den Winkel der Kohlenstoffsegmente der Plateauregion, in welcher der Ordnungsparameter S_{CD} annähernd konstant ist. Unter Verwendung von Glg. 2.18 und Glg. 2.19 kann D_C geschrieben werden als:

$$D_C = \frac{1}{2} n_C D_M \left\langle \frac{1}{\cos \beta} \right\rangle^{-1} \quad \text{Glg.2.20}$$

Zur Berechnung der mittleren Fläche $\langle A \rangle$ und der hydrophoben Dicke D_C wird ausserdem noch der sogenannte Flächenfaktor $q = \langle \frac{1}{\cos\beta} \rangle$ [184] benötigt, der angenähert werden kann [163] durch:

$$q \approx 3 - 3 \langle \cos\beta \rangle + \langle \cos^2\beta \rangle \quad \text{Glg.2.21}$$

Für die individuellen Kohlenstoffsegmente kann der Wert für $\langle \cos^2\beta_i \rangle$ einfach aus den quadrupolaren Aufspaltungen mit Hilfe von Glg. 2.11 berechnet werden nach:

$$\langle \cos^2\beta_i \rangle = \frac{1 - 4S_{CD}^{(i)}}{3} \quad \text{Glg.2.22}$$

Den Wert für $\langle \cos\beta_i \rangle$ zu berechnen ist etwas komplizierter da $\sqrt{\langle \cos^2\beta_i \rangle} \neq \langle \cos\beta_i \rangle$ was die Varianz der Winkelverteilungen wiedergibt [291]. Für die Berechnung werden die ersten und zweiten Momente der Orientierungsverteilungsfunktion $f(\beta)$ benötigt. Um die möglichen Orientierungswinkel β statistisch behandeln zu können nimmt das Mean-Torque Modell an, dass die Orientierungsordnung der Acylketten-segmente bezüglich des lokalen Koordinatensystems als Molekularfeldorientierungspotential betrachtet werden kann. Dieses Potential $U(\beta)$ ist in einer Annäherung erster Ordnung $U(\beta) \approx U_1 \cos\beta$. Die Form der Verteilungsfunktion von β ist durch den Boltzmannfaktor gegeben:

$$f(\beta) = \frac{1}{Z} \exp\left(-\frac{U(\beta)}{k_B T}\right) \quad \text{Glg.2.23}$$

In welcher die Zustandssumme gegeben ist durch:

$$Z = \int_0^\pi \exp\left(-\frac{U(\beta)}{k_B T}\right) \sin\beta d\beta \quad \text{Glg.2.24}$$

Unter der Annahme eines Molekulardrehmomentpotentials erster Ordnung können die folgenden Gleichungen durch Integration der Gleichungen Glg. 2.23 und Glg. 2.24 zur Berechnung von $\langle \cos\beta \rangle$ herangezogen werden:

$$\langle \cos \beta \rangle = \coth\left(-\frac{U_1}{k_B T}\right) + \frac{k_B T}{U_1} \quad \text{Glg.2.25}$$

$$\langle \cos^2 \beta \rangle = 1 + 2\left(\frac{-k_B T}{U_1}\right)^2 + \frac{2k_B T}{U_1} \coth\left(\frac{-U_1}{k_B T}\right) \quad \text{Glg.2.26}$$

Mit Hilfe der Näherung $\coth\left(-\frac{U_1}{k_B T}\right) \approx 1$ kann nun eine analytische Lösung für $\langle \cos \beta \rangle$ gefunden werden die für die einzelnen Kohlenstoffsegmente folgende Gleichung ergibt:

$$\langle \cos \beta_1 \rangle = \frac{1}{2} \left(1 + \sqrt{\frac{-8 S_{CD}^{(i)} - 1}{3}} \right) \quad \text{Glg.2.27}$$

Auch wenn obige Gleichung nur für Ordnungsparameter $S_{CD}^{(i)} \leq -\frac{1}{8}$ gültig ist, ist dies ausreichend für die meisten Ordnungsparameterwerte für die Plateaubereiche in der $^2\text{H-NMR}$ Spektroskopie von Lipidmembranen. Im Falle von kleineren Ordnungsparametern wurden ausserdem Glg. 2.25 und Glg. 2.26 nach $\langle \cos \beta \rangle$ numerisch gelöst. Es sollte ausserdem angemerkt werden, dass das Mean-Torque Modell nur im Fall von grossen Werten von $|S_{CD}|$ mit guter Näherung gilt. Trotzdem kann die Berechnung der Kettenlänge auch von stark beweglichen Lipiden mit kleinen Ordnungsparametern eine gute Möglichkeit darstellen, Vergleiche für die gleichen Acylketten bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Mischungen anzustellen. Als letztes können schliesslich aus den Werten von D_C und $\langle A \rangle$ die isobaren thermischen Ausdehnungskoeffizienten parallel $\alpha_{||}$ und senkrecht α_{\perp} zur Membranflächennormale berechnet werden, durch:

$$\alpha_{||} = \frac{1}{D_C} \left(\frac{\partial D_C}{\partial T} \right)_P \quad \text{Glg.2.28}$$

$$\alpha_{\perp} = \frac{1}{\langle A \rangle} \left(\frac{\partial \langle A \rangle}{\partial T} \right)_P \quad \text{Glg.2.29}$$

2.3.2 CD-, ESR-und Fluoreszenzspektroskopie

Die CD-Spektren wurden mit Hilfe eines Jasco 810 Spektropolarimeter (Firma Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) aufgenommen. Die Experimente wurden in einer Quartz-Küvette von einer Dicke von 0.2 cm durchgeführt. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 205-260 nm aufgenommen, mit einer Abtastgeschwindigkeit von 100 nm/min. Als Lösemittel wurde ITC-Puffer benutzt. Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern wurden die Spektren vierfach akkumuliert. Die Temperatur wurde mit einer Genauigkeit von ± 0.5 °C (Peltier-Element) kontrolliert. Für die Spektren bei denen Protein gebunden an Vesikel vermessen wurde, wurden die Lipidvesikel zunächst alleine gemessen und die erhaltenen Spektren von den Proteinspektren abgezogen. Die Strukturberechnungen wurden mit einem von Dr. Thomas Mehnert geschriebenen Dekonvolutionsprogramm [164] durchgeführt, das die Anpassungsalgorithmen CDSSTR, SELCON3 und CONTINLL verwendete. Um die molare Elliptizität Θ_{222} zu berechnen wurde folgende Gleichung verwendet:

CD-Spektroskopie

$$\Theta_{222} = \frac{\Psi_{222}}{10cd} \quad \text{Glg.2.30}$$

mit Ψ_{222} der von dem Spektrometer ausgegebenen Elliptizität bei 222 nm in mdeg, c der Proteinkonzentration in mol/l und d als Dicke der Küvette in cm. Der Faktor 10 ergibt sich aus der Umrechnung in die von der Literatur verwendeten Dimension von Θ_{222} (deg*cm²/dmol). Teilt man den berechneten Wert von Θ_{222} durch die Anzahl der im Protein vorhandenen Aminosäuren, erhält man die in dieser Arbeit verwendete Mean Residue Ellipticity (θ_{222}).

Die ESR-Spektren wurden auf einem Bruker ER-200 D-SRC Spektrometer mit Temperaturkontrolleinheit aufgenommen. 40-50 µl der Proben wurden hierzu in Glasskapillaren mit einem inneren Durchmesser von 0.9 mm gebracht. Die Spektren wurden mit Hilfe einer TE102-Kavität mit einer Modulationsfrequenz von 100 kHz, einer Modulationsamplitude von 0.4 G, einem Abtastbereich von 100 G, einem zentralen Magnetfeld von 3600 G und einer Mikrowellenleistung von 5 mW aufgenommen. Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern wurden die Spektren 20fach akkumuliert.

ESR-Spektroskopie

Sämtliche Fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden auf einem Jasco FP-6300 Spektrometer (Firma Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) angefertigt. Für die Messung der Proteinaggregation mittels Thioflavin T wurden hierbei in einer kleinen

Fluoreszenzspektroskopie

quadratischen Küvette (5 x 5 mm) jeweils 10 µl der Proteinlösung + 300 µl Thioflavin T Puffer mit einem Magnetrührer unter Temperaturkontrolle (± 0.5 °C) gemessen. Der detektierte Wellenlängenbereich betrug dabei 465-600 nm, mit einer Anregungswellenlänge von 450 nm (detektiertes Fluoreszenzmaximum lag bei 480 nm). Die Spektren wurden vierfach akkumuliert, mit einer Abtastrate von 100 nm/min.

Für die Fluoreszenzmessung zur Verfolgung der Vesikelfusion wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 530 nm (Anregung 450 nm) für jeweils 40 min verfolgt, mit einem Datenpunktabstand von 2 s. Jeweils 2 ml der Proben wurden in einer 2.5 ml Küvette mit Magnetrührer und Temperaturkontrolle gemessen. Im Fall der Beschleunigung der Vesikelfusion durch Detergenz oder CaCl_2 Zugabe wurde durch diese durch ein kleines Nadelloch in der Abdeckung des Spektrometers bei geschlossener Versuchsanordnung mittels einer Hamiltonspritze 2 min nach Messbeginn zugegeben.

2.3.3 Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung

Jeweils 50 µl der Vesikellösung mit 150 µl ITC-Puffer oder 200 µl der aufgereinigten Oligomerlösung wurden in einer Glassküvette mit 2 mm Breite und 1 cm Tiefe gegeben. Der hydrodynamische Radius der Vesikel wurde mit Hilfe eines High Performance Particle Sizer (HPPS) der Firma Malvern Instruments (Herrenberg, Germany) bestimmt. Die dynamische Lichtstreuung wurde dreimal je 15 min gemessen. Die Anzahl-gewichtete Partikelverteilung wurde mittels der mitgelieferten Gerätesoftware berechnet.

Statische Lichtstreuung

Zur statischen Lichtstreuung wurde ein Jasco FP-6300 Spektrometer (Firma Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) bei gleichzeitiger Anregungs- und Detektionswellenlänge von 500 nm und einer Detektionsspannung von 220 V verwendet. Die Messung wurde für 40 min aufgezeichnet, mit einem Datenpunktabstand von 2 s. Jeweils 2 ml der Proben wurden in einer 2.5 ml Küvette mit Magnetrührer und Temperaturkontrolle gemessen. Im Fall der Beschleunigung der Vesikelfusion durch Detergenz oder CaCl_2 Zugabe wurde durch diese durch ein kleines Nadelloch in der Abdeckung des Spektrometers bei geschlossener Versuchsanordnung mittels einer Hamiltonspritze 2 min nach Messbeginn zugegeben.

2.3.4 Kalorimetrie

Für die Isotherme Titrationskalorimetrie wurde ein VP-ITC Gerät mit einer motorgetriebenen Spritze verwendet (MicroCal, Amherst, MA, USA). Das Volumen der Kalorimetriezelle betrug hierbei 1.41 ml. Typischerweise wurden 40 Injektionen je 7 µl Volumen einer 40 mM Vesikellösung mittels einer elektronisch kontrollierten Spritze in die vorgelegte Proteinlösung injiziert. Die Signalintegration, Basislinienkorrektur und Normierung in Bezug auf die Protein- und Lipid-Konzentrationen wurden mit Hilfe der mitgelieferten MicroCal ORIGIN Software durchgeführt. Zur Kontrolle wurden Titrations der Vesikel in Puffer und Protein in Puffer durchgeführt und die Ergebnisse von den experimentellen Daten abgezogen. Die sigmoiden Titrationskurven, die man mit den DPPC-SUV unterhalb deren Phasenübergangstemperatur erhielt, wurden unter der Annahme unabhängiger Lipidbindungsstellen an dem Protein ausgewertet. Dazu wurde zunächst die Ligandenkonzentration mit der Gesamtkonzentration der Lipide in der Spritze gleichgesetzt. Als nächstes wurden N unabhängige Lipidbindungsstellen an dem Protein angenommen. Der Besetzungsgrad Φ und die Konzentration der freien Lipide sowie die Gesamtkonzentration an Protein $[L]$ und $[P]_{Gesamt}$ ergeben dann die mikroskopische Bindungskonstante $K^{\dagger} = \Phi / ((1 - \Phi)[L])$ und die Gesamtlipidkonzentration $[L]_{Gesamt} = [L] + N\Phi[P]_{Gesamt}$. Der Sättigungsanteil des Proteins korreliert dabei mit der Gesamtwärme Q die durch $Q = N\Phi[P]_{Gesamt}\Delta H^{\dagger}V_0$ gegeben ist, mit ΔH^{\dagger} als die molare Enthalpie der Ligandenbindung und V_0 als das Gesamtvolumen der Zelle. Durch Eliminierung von $[L]$ und Φ kann die Wärme der Zelle als eine Funktion der Gesamtligandenkonzentration $[L]_{Gesamt}$ ausgedrückt werden, mit $a = L_{Gesamt}/NP_{Gesamt}$:

$$Q = \frac{1}{2}N[P]_{Gesamt}\Delta H^{\dagger}V_0 \left[1 + a \left(1 + \frac{1}{K^{\dagger}} \right) - \sqrt{\left(1 + a \left(1 + \frac{1}{K^{\dagger}} \right) \right)^2 - 4a} \right]$$

Glg.2.31

Die inkrementellen Wärmen $\Delta Q = Q_{i-1} - Q_i$ wurden berechnet und die Daten durch Variation von N , K^{\dagger} und ΔH^{\dagger} nach dem Standard Marquard-Levenberg-Algorithmus angeglichen [292]. Die Anzahl der Bindungsstellen N wurde nun als die Zahl der gebundenen Lipidmoleküle pro Proteinmolekül angesehen, was die Enthalpie (pro Mol Protein) $\Delta H_0 = N\Delta H^{\dagger}$ und die Bindungskonstante $K = NK^{\dagger}$ liefert.

Isotherme Titrationskalorimetrie

Dynamische Differenzkalorimetrie

Die dynamische Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry, DSC) wurde mit Hilfe eines VP-DSC Instruments (MicroCal, Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die Basislinienkorrektur erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten MicroCal Software. Die beschallten Vesikel ([Lipid] = 2.5 mM) wurden direkt nach Fertigstellung zentrifugiert (3000 x g), entgast und 0.5 ml in die Kalorimetriezelle des Instruments gegeben. Die Referenzzelle wurde mit ITC Puffer befüllt. Es wurden 4 Upscans und 4 Downscans je Lipidmischung gemessen, mit jeweils 20 min Äquilibrierungszeit vor den Messungen.

2.3.5 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

0.1 mg der säulenchromatographisch gereinigten, dialysierten und lyophilisierten Protein-Aggregate wurden in 100 µl ITC-Puffer gelöst, bevor sie auf die ausgeglühten Kohlenstoff-beschichteten Kupfergitter adsorbiert wurden. Die Gitter wurden mit 4 Tropfen Puffer gewaschen und mit einem Tropfen 2% Uranylacetat (w/v) angefärbt. Die TEM-Bilder wurden auf einem Philips CM 100 Elektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 100 kV aufgenommen.

2.3.6 Plasmon-Waveguide-Resonance (PWR) Spektroskopie**Parameter und Aufbau des PWR-Spektrometers**

Die Resonanzspektren wurden auf einem von der Mitarbeiterin Han Zhang der Arbeitsgruppe von Prof. Scott Saavedra an der University of Arizona eigens angefertigten PWR-Instrument aufgenommen. Bei dieser Art der Spektroskopie werden die relativen Reflektivitäten (d.h. das Verhältnis der gemessenen Intensität von reflektiertem und eingestrahlem Licht) gegen den Einfallswinkel des anregenden Lichtes mit einer Auflösung von 1 mGrad bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Messungen bei Raumtemperatur vorgenommen. Dabei sollte erwähnt werden, dass verschiedene, unabhängige PWR-Messungen im Allgemeinen verschiedene absolute Werte für die exakte Position der Spektren liefern. Dies liegt an einer weiten Bandbreite von Faktoren, wie z.B. Variationen in der mikroskopischen Beschaffenheit der Lipiddoppelschichten oder Veränderungen in der Oberfläche des Substrates auf Grund vorherigen Gebrauchs. Die Absolutwerte der verschiedenen Resonanzwinkelverschiebungen können jedoch ohne Probleme quantitativ zwischen den einzelnen Experimenten verglichen werden. Die Messmethode basiert auf der resonanten Anregung kollektiver Elektronenschwingungen (Plasmonen) in einem dünnen Silberfilm, der auf der Oberfläche eines BK7 Glassprismas aufgetragen war,

welches wiederum mit einer dielektrischen Schicht (SiO_2) beschichtet wurde (Kretschmann-Konfiguration, Abb. 3-54). Zur Anregung wurde das p -polarisierte Licht eines He-Ne Lasers (632.8 nm, JDSU 1101P) unter Totalreflektionsbedingungen verwendet. Um die Polarisationseffizienz zu erhöhen wurde ein Polarisator (Newport 481A) verwendet. Die PWR-Messzelle wurde hierbei auf eine bewegliche Bühne montiert, deren Rotation durch eine NEAT 310 Kontrolleinheit (New England Affiliated Technology Inc USA) gesteuert wurde. Die Intensität des reflektierten Lichts wurde über eine Photodiode (Hamamatsu Inc. Japan) detektiert. Zu Vorverstärkung der Signale vor A/D-Umwandlung wurde ein Verstärker benutzt und die Datenaufnahme sowie Synchronisation der einzelnen Bauteile über LabView 8.0 (National Instrument, USA) gesteuert.

Eine 2.5 mM Lösung von EYPC oder EYPC/EYSM/Cholesterin 2:2:1 SUV (Präparation der Schallvesikel siehe oben) in ITC-Puffer wurde in die Probenkammer gegeben um die Fusion der Vesikel mit der Substratoberfläche zu starten. Im Falle der EYPC/EYSM/Cholesterin 2:2:1 SUV wurde die Fusion zusätzlich durch Zugabe von 5 μM C_{12}E_8 stimuliert. Die Ausbildung einer komplett die Substratoberfläche bedeckenden Lipiddoppelschicht wurde über das korrespondierende PWR-Spektrum verfolgt. Im Zweifelsfall wurde eine 10 μM Albuminlösung zugegeben, welches durch seine Bindung an offene Substratoberfläche, und der damit verbundenen detektierbaren Resonanzwinkelverschiebung, Lücken in der Lipiddoppelschicht anzeigte. Die Messzelle wurde für 30 min mit ITC-Puffer gespült (355 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Proteinlösung in ITC-Puffer wurde nun mittels eines Polyethylen-Schlauches in die Messzelle gesaugt und die Messung sofort gestartet.

Präparation der Membran und Proteinproben

3

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Phasenseparation in Lipidmembranen

Die Bedeutung von Sphingomyelin und seinen Derivaten in Zusammenspiel mit Cholesterin für die laterale Organisation von neuronalen Membranen ist unbestritten [135][165][166]. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist jedoch selbst das Phasenverhalten von einfachen Lipidmischungen Gegenstand kontroverser Diskussion [167][168][169]. Da jedoch die spezielle Interaktion zwischen den Monomeren sowie den Oligomeren von α S mit eben diesen Domänen das zu untersuchende Gebiet waren, schien eine genauere biophysikalische Charakterisierung der Phasenseparation in Sphingomyelin/POPC/Cholesterin Membranen vonnöten. Dazu wurde zunächst der Einfluss von Cholesterin auf Sphingomyelin sowie POPC einzeln mit Hilfe der 2 H-NMR Spektroskopie untersucht, um dann in weiteren Experimenten die strukturellen sowie mikromechanischen Eigenschaften von ternären Mischungen der drei Komponenten festzustellen.

Allgemeine Bemerkungen

Da es im Verlauf der Arbeit zunehmend Probleme mit der Spektrenqualität (nicht korrigierbare Phasenfehler, inhomogene Verteilung der Anregungsleistung, siehe Abb. 3-2) der mit einer 10 mm Spule gemessenen, orientierten Proben gab, wurde dazu übergegangen, mit einer zweiten Spule mit 5 mm Durchmesser zu arbeiten. Der kleine Durchmesser der Spule machte jedoch die Messung von unorientierten Proben notwendig. Um einen direkten Vergleich mit orientierten Proben zu ermöglichen, wurden die Spektren der unorientierten Proben mathematisch in Spektren mit $\theta = 0^\circ$ Orientierung überführt, eine Prozedur die als De-Pakeing [170][157] bekannt ist. Diese Prozessierung hatte jedoch den bekannten Nachteil bei der Berechnung Artefakte in den Spektren zu erzeugen (Abb. 3-4). Auf Grund des Signalverlusts während des De-Pakeings war es ausserdem notwendig nur den Realteil der gemessenen Daten zu prozessieren und die den im Imaginärteil der Spektren enthaltenen Teil durch Spiegelung der Daten an der Larmorfrequenz herzuleiten. Da die Spektren theoretisch eine perfekte Symmetrie zeigen sollten führt dies zwar nicht zu einer

grundsätzlichen Verfälschung der Daten, etwaige Informationen, die im Imaginärteil enthalten sind gehen allerdings verloren. Um sämtliche Informationen zu erhalten, wurden die Spektren die für die beobachtbaren Phasenseparationsphänomene von Bedeutung waren (meist handelte es sich dabei um die Spektren der ternären Lipidmischungen) im orientierten und im unorientierten Zustand gemessen, um Nachteile der einen Technik mit Hilfe der anderen auszugleichen. In den Abbildungen wurden dann die Spektren mit den besten Charakteristika verwendet.

3.1.1 $^2\text{H-NMR}$ von PSM- d_{31} in Mischungen mit Cholesterin

$^2\text{H-NMR}$ Spektren von reinen Sphingomyelin-Membranen

Um eine mögliche präferentielle Interaktion des Cholesterins mit Sphingomyelin oder POPC in später gemessenen, komplexeren Mischungen bestimmen zu können, musste zunächst der Effekt von Cholesterin auf die einzelnen Komponenten festgestellt werden. Daher wurde zunächst Sphingomyelin alleine und in Mischung mit Cholesterin untersucht. Zusätzlich konnte ausserdem so anhand der Phasenübergangstemperatur der Probe die Reinheit des verwendeten synthetischen Sphingomyelins mit perdeuterierter Palmitinseitenkette überprüft werden.

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$\Delta\nu_Q$ /kHz										
			15	20	25	30	36	38	40	45	50	55	
A	3								72.3	70.6	69.3	67.3	
B	3							68.0	65.7	67.1	65.2	63.9	
C	2,4-6									63.2	55.8	57.9	
D	7-9								63.7	59.3		53.2	
E	10								56.8	52.8	51.2	47.2	
F	11		117.0	116.8	114.3	105.5	90.9	55.1	54.4		48.8	45.2	
G	12								51.6	46.3	42.8	39.5	
H	2							43.8	48.0	42.2	39.4	36.5	
I	13								38.9	37.7	37.3		
J	14								36.6	31.3	34.3	31.4	28.7
K	15							35.0			27.5	25.0	22.9
L	16		32.8	31.8	27.6	25.6	13.6	7.4	6.2	5.3	4.8	4.4	

Tab. 3-1 Spektrale $^2\text{H-NMR}$ Zuordnungen der Deuteronensignale (zugeordnet zu den einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für reine PSM- d_{31} -Membranen bei verschiedenen Temperaturen. Die Zuordnung der Signale für *i* = 2 und 3 erfolgte nach [161].

Die Temperaturabhängigkeit der orientierten N-perdeuteropalmitoyl-Sphingomyelin

(PSM- d_{31}) Membranen offenbart hierbei eine reine Probe mit einem scharfen Phasenübergang von flüssig-kristallin zu Gelphase bei ca. 38-36 °C und mit einer bemerkenswert grossen Aufspaltung der äusseren Resonanzen von 72.3 kHz ($\theta = 0^\circ$; Tab. 3-1), was ein Indikator für die hohe Ordnung der Acylketten der Palmitinsäure ist. Die Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur im Vergleich mit dem Literaturwerts (41.5 °C) kann mit der bekannten Verringerung der Schmelztemperatur durch den Austausch von Wasserstoff durch Deuterium [171] erklärt werden. Die Gelphase von PSM- d_{31} ist gekennzeichnet durch ein breites Doublett mit einem maximaler Aufspaltung von 117.0 kHz (Tab. 3-1) bei 15 °C

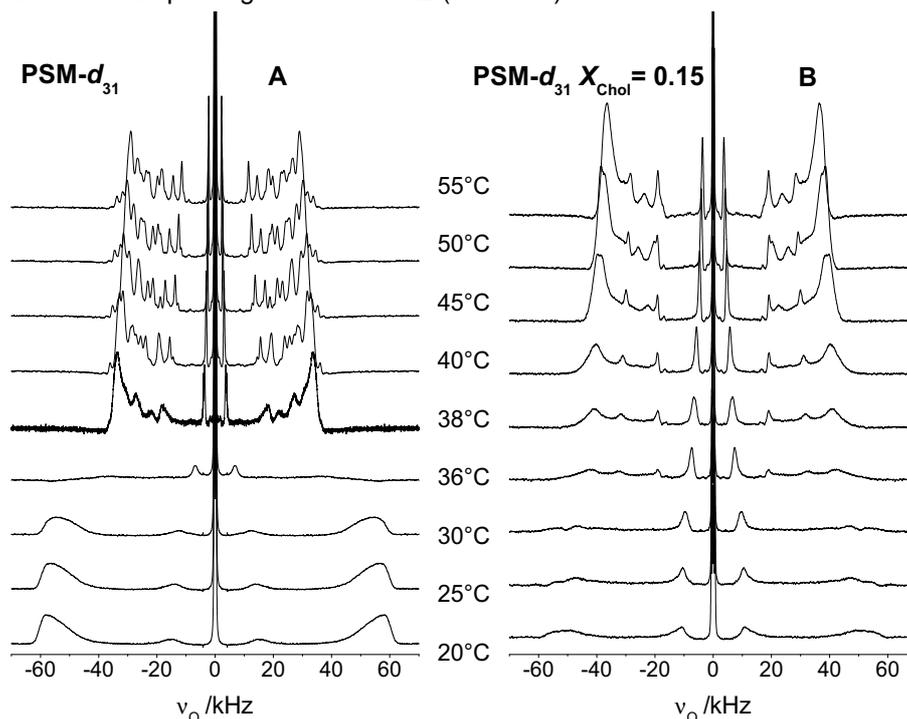


Abb. 3-1 Temperaturabhängigkeit der Festkörper- ^2H -NMR Spektren von A: PSM- d_{31} ; B: PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.15$. Die Membranen wurden für die Messung makroskopisch auf Glassplättchen orientiert ($\theta = 0^\circ$). Bei A setzt zwischen 38 °C und 36 °C ein Phasenübergang von flüssig-kristallin zu Gelphase ein. Bei B setzt bei ca. 45 °C ein Phasenübergang ein, der bis zum Ende der Messreihe, bei 20 °C, noch nicht abgeschlossen ist

Nach Zugabe von einer Cholesterin $X_{\text{Chol}} = 0.15$ (Abb. 3-1 B) ändern sich die Spektren sowie der Phasenübergang von PSM- d_{31} (Abb. 3-2). Die quadrupolare Aufspaltung der äussersten Resonanzen wächst um 15 kHz bei 55 °C (Tab. 3-2) durch den stark ordnenden Einfluss des starren Sterolrings des Cholesterins [172][173]. Die damit einhergehende Signalverbreiterung kann zu einem gewissen Teil auf den schnellen Austausch von Lipiden an Phasengrenzen zwischen flüssig-geordneten (l_o , liquid-ordered) und flüssig-ungeordneten (l_d , liquid-disordered) Domänen zurück-

^2H -NMR Spektren von PSM- d_{31} -Membranen nach Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.15$

geführt werden. Inhomogene Signalverbreiterung durch die eine ungleichmässig angeordnete Probe auf den Probengläschen kann auch als eine Erklärung dienen. Der Phasenübergang ist zusätzlich stark verbreitert. Er beginnt bei ca. 42 °C und ist bei der zuletzt gemessenen Temperatur von 20°C immer noch nicht vollständig. Da sich ein Phasenübergang bei einer höheren Temperatur (42 °C mit Cholesterin vs. 37 °C ohne Cholesterin) und nicht bei einer niedrigeren Temperatur andeutet, wie es bei Mischungen an sich zu erwarten ist, ist anzunehmen, dass es sich um keinen echten Phasenübergang handelt, sondern eine allmähliche Phasenseparation beobachtet wird.

Signal	<i>i</i>	T/°C	$\Delta\nu_Q/\text{kHz}$							
			20	25	30	35	40	45	50	55
A	2-5					83.9	81.0	79.8	77.2	72.9
B	6-9							76.5	74.8	
C	10,11		102.3	95.3	93.2		62.2	59.9	58.4	56.7
D	12,13					64.2			51.5	47.6
E	14,15						51.9	45.3	40.8	38.0
F	16		21.9	21.0	19.3	14.7	11.6	9.3	8.2	7.4

Tab. 3-2 Spektrale ²H-NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (zugeordnet zu den einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für PSM-*d*₃₁-Membranen mit Zusatz von $X_{\text{Chol}} = 0.15$ bei verschiedenen Temperaturen.

²H-NMR Spektren von PSM-*d*₃₁-Membranen nach Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.2$

Eine weitere Erhöhung der Cholesterinkonzentration auf $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (Abb. 3-2 A) führt zu einer kompletten Unterdrückung des Phasenübergangs von *l*_d zu Gelphase (solid-ordered, *s*₀). Hier wird die Koexistenz zweier Phasen noch deutlicher.

Signal	<i>i</i>	T/°C	$\Delta\nu_Q/\text{kHz}$								
			20	25	30	35	40	45	50	60	
A	2-9		114.5	110.1	107.7	99.7		84.8	79.6	76.9	70.6
B	10-13		97.7	96.1	93.3	89.2					
C	14		81.3	78.1	74.9	67.5	61.2	58.7	56.6	53.1	
D	15								40.5	42.2	
E	16		18.4	17.4	15.7	13.5	11.0	8.3	6.8	4.9	

Tab. 3-3 Spektrale ²H-NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (zugeordnet zu den einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für PSM-*d*₃₁-Membranen mit Zusatz von $X_{\text{Chol}} = 0.20$ bei verschiedenen Temperaturen.

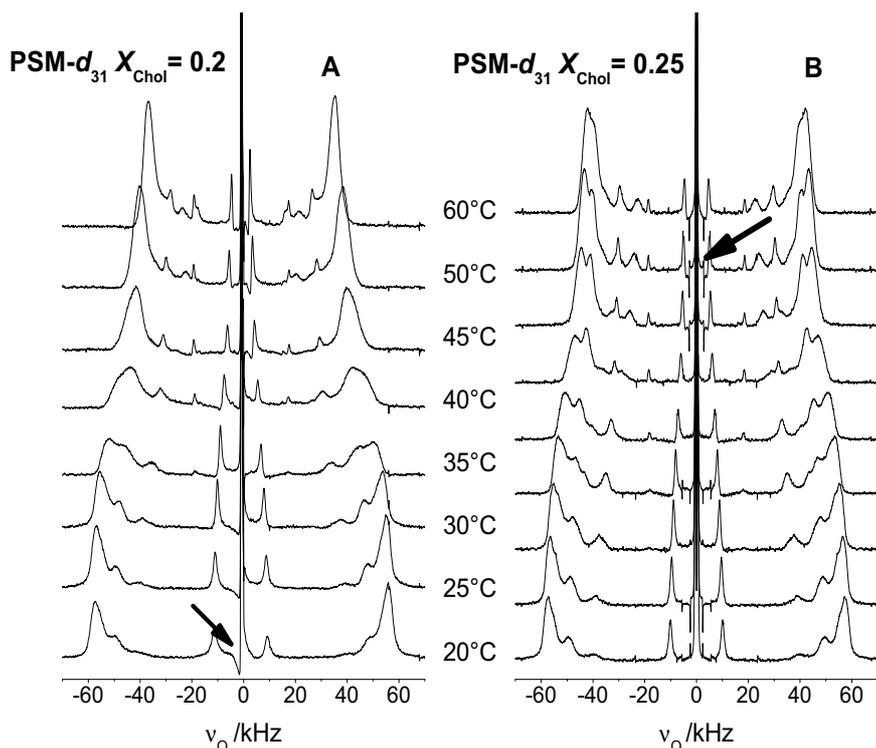


Abb. 3-2 Temperaturabhängigkeit der Festkörper- ^2H -NMR Spektren von A: PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.2$; B: PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.25$. Die Membranen wurden für die Messung makroskopisch auf Glassplättchen orientiert ($\theta = 0^\circ$). Bei beiden Mischungen setzt bei ca. 45-40 °C die Abspaltung einer zweiten spektralen Komponente ein. Mit einem Pfeil gekennzeichnet sind nicht korrigierbare dispersive Signale.

Zunächst setzt wie bei der Mischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.15$ bei ca. 45 °C eine starke Signalverbreiterung ein. Im Gegensatz zu der binären Mischung mit geringerem Cholesteringehalt scheint die Phasenseparation schon bei 30 °C beendet zu sein. Offensichtlich ist bei höheren Cholesterinmengen die zweite, geordnetere Phase schon bei höheren Temperaturen ausreichend stabilisiert um das Gleichgewicht komplett zu ihren Gunsten zu verschieben. In diesem Fall wird ausserdem deutlich, dass es bei der zweiten Phase keineswegs um eine Gelphase, sondern eher um eine flüssig-geordnete Phase handelt, erkennbar an den äusseren Resonanzen. Diese zeigen zwar quadrupolare Aufspaltungen vergleichbar mit einer Gelphase (114,5 kHz für $X_{\text{Chol}} = 0.15$ vs. 117,0 kHz für $X_{\text{Chol}} = 0$, beides 20 °C, Tab. 3-2 und Tab. 3-1), gleichzeitig aber die geringe Signalbreite einer flüssigen Phase mit hoher Beweglichkeit der Lipide.

^2H -NMR Spektroskopie von PSM- d_{31} -Membranen nach Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.25$

Die Spektren der Mischung von PSM- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.25$ (Abb. 3-2 B) zeigt ein ähnliches Verhalten über den gemessenen Temperaturbereich wie die Membranen mit dem niedrigeren Cholesteringehalt von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (Abb. 3-2 B). Zwischen 45-40 °C ist wiederum eine Abspaltung einer zweiten spektralen Komponente zu sehen die eine hohe, fast identische Quadrupol-Aufspaltung der äusseren Resonanzen von 114.3 kHz bei 20 °C (Tab. 3-4) aufweist. Insgesamt sind die Signale der einzelnen Deuteronen jedoch deutlich besser aufgelöst, was ein Indikator von höheren Domänengrössen und damit Minimierung des Lipidaustauschs an den Domänengrenzen ist. Trotzdem ist die Aufspaltung der der Kopfgruppe näheren Deuteronen, also im sogenannten Plateaubereich, selbst bei hohen Temperaturen immer noch bemerkenswert hoch (84 kHz, 60 °C, Tab. 3-4).

Signal	<i>i</i>	T/°C	$\Delta\nu_Q/\text{kHz}$							
			20	25	30	35	40	45	50	60
A	2-7		114.3	113.1	110.1	106.7	101.2	93.4	89.0	84.0
B	8-12		99.3	97.8	95.7	93.3	91.0	85.1	81.8	
C	13,14		79.9	77.5	75.2	70.2	66.2	63.1	61.8	59.4
D	15								51.3	45.3
E	16		20.2	19.2	17.8	16.2	14.1	12.2	10.7	9.2

Tab. 3-4 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (zugeordnet zu den einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für PSM- d_{31} -Membranen mit Zusatz von $X_{\text{Chol}} = 0.25$ bei verschiedenen Temperaturen.

^2H -NMR Spektroskopie von PSM- d_{31} -Membranen nach Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.33$

In Membranen bestehend aus PSM- d_{31} mit einem Cholesterinanteil von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-3 A) sind Veränderungen der Spektren auf Grund von Phasenübergängen oder Phasenseparation über den gesamten Temperaturbereich kaum noch messbar. Die geringe Signalbreite des Spektrums gerade bei hohen Temperaturen zeigt die Membran als eine homogene Flüssigkeit mit einer sehr hohen quadrupolaren Aufspaltung der Deuteriumsignale (91 kHz bei 60 °C, 113.2 kHz bei 20 °C, Tab. 3-5). Dies lässt eine hohe longitudinale Ordnung der Acylketten erkennen, die in Verbindung mit der offensichtlich hohen lateralen Beweglichkeit der Lipide für eine stabile flüssig-geordnete Phase ohne Beteiligung einer Gel- oder flüssig-ungeordneten (I_d) Phase spricht. Eine Cholesterinkonzentration von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ scheint dann ausreichend zu sein um eine I_d -Phase komplett in einer binären Mischung von PSM und Cholesterin zu unterdrücken. Die quadrupolare Aufspaltung der äussersten Signale vergrössert sich bereits bei 40 °C von 65.7 kHz im Falle von PSM- d_{31} ohne Cholesterin (Tab. 3-1) auf 104.8 kHz (beides $\theta = 0^\circ$) für PSM- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Tab. 3-5), was einem Ordnungsparameter von $S_{\text{CD}} = 0.42$ entspricht, vergleichbar mit dem

Wert von Lipid-Deuteronen in einer Gelphase.

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$\Delta\nu_Q$ /kHz								
			20	25	30	35	38	40	45	50	60
A	2-6		113.2	111.7	109.7	107.4	105.7	104.8	99.7	97.4	91.0
B	7-10				97.3	94.6	92.4	91.2	87.9	85.8	80.2
C	11,12		100.4	98.9	87.1	84.1	82.1	80.3	75.9	73.2	66.7
D	13								64.1	62.9	58.8
E	14,15		76.1	74.0	71.0	68.1	66.6	65.6	60.5	57.5	52.2
F	16		19.8	19.0	17.8	16.9	15.3	14.8	13.5	13.2	10.2

Tab. 3-5 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (zugeordnet zu den einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für PSM- d_{31} -Membranen mit Zusatz von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ bei verschiedenen Temperaturen.

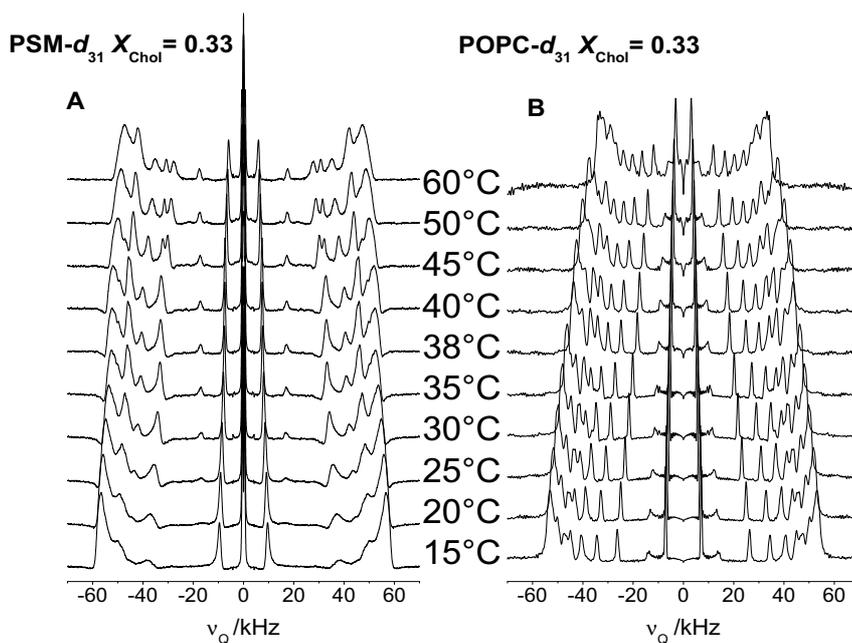


Abb. 3-3 Temperaturabhängigkeit der Festkörper- ^2H -NMR Spektren von A: PSM- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.33$; B: POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.33$. Die PSM- d_{31} -Membran wurden für die Messung makroskopisch auf Glassplättchen orientiert ($\theta = 0^\circ$), Die POPC- d_{31} -Membran wurde unorientiert gemessen und die Spektren für diese Abbildung De-Paked ($\theta = 0^\circ$). Für beide Lipide ist über den gesamten Temperaturbereich keine Phasenseparation sichtbar.

Ausserdem ist diese Aufspaltung bemerkenswert nahe an der theoretisch maximal

erreichbaren Aufspaltung von 127.5 kHz, für den Fall von komplett zur Membranflächennormalen parallel angeordneten Acylketten.

3.1.2 $^2\text{H-NMR}$ von POPC- d_{31} in Mischung mit Cholesterin

$^2\text{H-NMR}$ von reinen POPC- d_{31} -Membranen

Als nächstes wurde der Effekt des Cholesterins auf POPC-Membranen bestimmt. Abbildung 3-4 A zeigt die Spektren für eine reine POPC-Membran, bei einer Orientierung von $\theta = 0^\circ$. Allgemein kann für die POPC Spektren gesagt werden, dass die quadrupolaren Aufspaltung der Deuteronen der Palmitoylseitenkette bedeutend niedriger sind als die entsprechenden Aufspaltungen in Palmitoyl-Sphingomyelin [161]. Das Sphingosin-Grundgerüst scheint einen sehr viel stärker ordnenden Einfluss auf die Acylseitenketten zu haben als das Glyceringerüst mit einer Oleylkette in *sn*-2-Position. So ist die Aufspaltung des Plateaubereichs von reinem POPC- d_{31} bei 55 °C mit 44.2 kHz (Tab. 3-6) deutlich geringer als die 67.3 kHz die für den selben Bereich in PSM- d_{31} bei 55 °C gemessen werden (Tab. 3-1). Zusätzlich kann festgestellt werden, dass die Aufspaltungen über den gesamten gemessenen Temperaturbereich von 55-15 °C stabil bleiben, da sich das Lipid offensichtlich in den gesamten Bereich in einer ungeordneten flüssig-kristallinen Phase befindet.

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$\Delta\nu_Q$ /kHz				
			15	20	30	45	55
A	2-5					47.5	44.2
B	6-8		55.3	54.5	50.7	44.1	40.4
C	9		50.1	50.6	44.7	40.2	36.1
D	10		47.9	47.8	41.9	37.2	33.4
E	11		42.5	42.8	37.4	32.6	29.1
F	12		39.0	38.9	33.7	29.2	25.8
G	13		33.2	33.3	28.6	24.7	21.5
H	14		27.9	28.1	24.1	20.6	17.8
I	15		21.0	21.0	17.9	15.3	13.2
J	16		6.2	6.3	5.3	4.4	3.7

Tab. 3-6 Spektrale $^2\text{H-NMR}$ Zuordnungen der Deuteronensignale (zugeordnet zu den einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für reine POPC- d_{31} -Membranen

Da es bereits ausreichende Studien zu dem Einfluss von Cholesterin auf POPC gibt [174][175], wurden nur zwei Cholesterinkonzentrationen in POPC-d₃₁-Membranen gemessen, X_{Chol} = 0.20 und X_{Chol} = 0.33, um zumindest einen direkten Vergleich mit den PSM-d₃₁-Membranen zu erlauben. Die erste Cholesterinzugabe von X_{Chol} = 0.20 (Abb. 3-4 B) führt wie erwartet zu einer allgemeinen Vergrößerung der Signalaufspaltungen (z.B. von 44.2 kHz bei 55 °C für den Plateaubereich in POPC-d₃₁ zu 53.7 kHz bei 60 °C für den Plateaubereich in POPC-d₃₁ X_{Chol} = 0.2, Tab. 3-6 und Tab. 3-7). Diese sind jedoch nicht so ausgeprägt wie in der binären Mischung von POPC-d₃₁ mit X_{Chol} = 0.2, weder in Relation zum Ausgangswert noch im Absolutwert der quadrupolaren Aufspaltungen. Im Vergleich mit dem Sphingolipid hat das starre Sterolgerüst des Cholesterins einen geringer ausgeprägten Ordnungseffekt auf die Palmitinkette des POPC. Erneut kann bemerkt werden, dass die gemessenen Spektren keinen erkennbaren l_d-l_o Phasenübergang aufweisen. Offensichtlich bildet sich eine zumindest makroskopisch homogene flüssig-kristalline Phase zwischen dem Glycerophospholipid und Cholesterin aus.

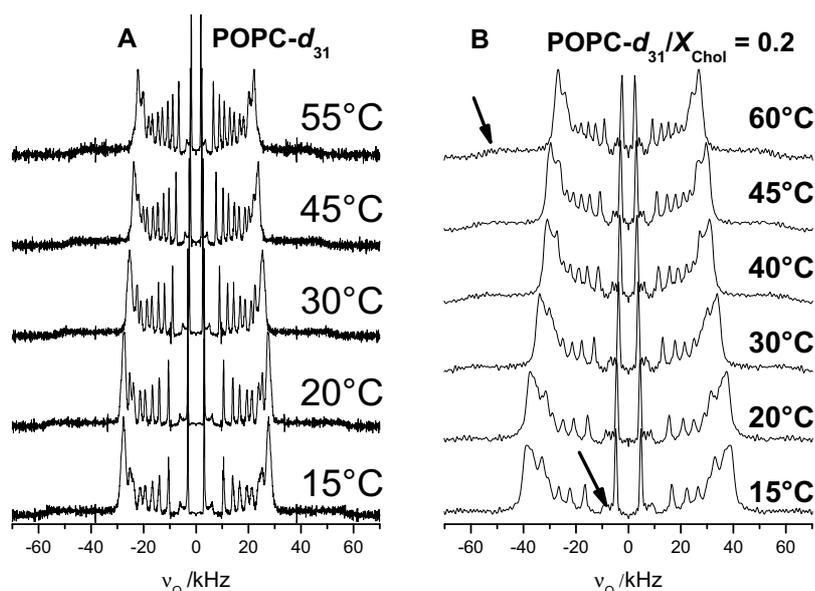


Abb. 3-4 Temperaturabhängigkeit der Festkörper-²H-NMR Spektren von A: POPC-d₃₁; B: POPC-d₃₁ X_{Chol} = 0.2. Die POPC-d₃₁-Membranen wurden unorientiert gemessen und die Spektren für diese Abbildung De-Paked ($\theta = 0^\circ$). Mit Pfeilen gekennzeichnet sind bei der mathematischen Prozessierung der unorientierten Spektren nicht vermeidbaren Artefakte [157].

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$\Delta\nu_Q$ /kHz							
			15	20	30	40	45	60		
A	2-7		77.5	75.1	67.7	61.6	59.2	53.7		
B	8-10					54.3	53.7	48.2		
C	11		65.9	63.5	60.4	49.4	47.0	40.3		
D	12			58.0	50.0	44.6	42.1	36.0		
E	13		53.1	50.0	42.7	37.8	36.0	30.5		
F	14		44.6	41.5	35.4	31.7	29.3	25.0		
G	15		33.0	31.1	26.2	22.6	21.4	18.3		
H	16		9.8	9.2	7.3	6.7	6.1	4.9		

Tab. 3-7 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (der einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.20$ von 60-15 °C

^2H -NMR Spektren von POPC- d_{31} in Mischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$

Die letzte Zugabe von Cholesterin zu POPC- d_{31} mit einem Molbruch von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-3 B) führt zunächst zu einem Anstieg der quadrupolaren Aufspaltung um ca. 10 kHz für die Signale im Plateaubereich, was vergleichbar mit dem Schritt von $X_{\text{Chol}} = 0$ zu $X_{\text{Chol}} = 0.20$ ist. Es fällt jedoch auf, dass die Steigerung der Signalaufspal-

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$\Delta\nu_Q$ /kHz									
			15	20	25	30	35	38	40	45	50	60
A	2-5		106.1	103.3	99.5	96.0	92.4	87.4	85.0	80.3	74.7	
B	6-8										71.0	66.5
C	9		100.5	97.3	93.2	89.5	85.7	80.7	78.3	76.0	67.3	
D	10,11		94.9	92	87.7	82.5	79.0	74.2	71.9	66.8	61.7	58.3
E	12		90.0	86.7	82.2	77.8	73.8	68.2	66.2	60.8	55.4	47.9
F	13		81.4	78.0	73.6	69.5	65.5	60.0	57.4	52.6	47.4	40.4
G	14		68.9	65.8	61.7	58.0	54.4	49.7	47.5	43.2	39.0	32.8
H	15		52.7	49.9	46.4	43.3	40.4	36.7	34.9	31.6	28.3	23.8
I	16		14.3	13.5	12.5	11.6	10.8	9.8	9.4	8.5	7.6	6.2

Tab. 3-8 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (der einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für POPC- d_{31} $X_{\text{Chol}} = 0.33$ von 60-15 °C

tungen in Mischungen mit Cholesterin sehr viel temperaturabhängiger sind als in

reinen POPC- d_{31} -Membranen. So steigt die quadrupolare Aufspaltung von 55-15 °C in reinem POPC- d_{31} von 44.2 kHz auf 55.3 kHz um gerade 11.1 kHz (Tab. 3-6). In der ersten Cholesterinmischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ hingegen schon von 53.7 kHz auf 77.5 kHz (von 60-15 °C) um 23.8 kHz (Tab. 3-7). Schließlich, bei einem Cholesterinanteil von $X_{\text{Chol}} = 0.33$, ist der Zuwachs stark ausgeprägt, die quadrupolare Aufspaltung des Plateaubereichs erreicht bei 60 °C einen Wert von 66.5 kHz und wächst zu einem Wert von 106.1 kHz an (Tab. 3-8), was einer Steigerung von 39.6 kHz entspricht. Der Übergang von einer eher flüssig-ungeordneten Phase zu einer Phase welche die longitudinale Ordnung einer l_o Phase zeigt ist hier, anders als im Fall von Sphingomyelin, durch einen kontinuierlichen Übergang gekennzeichnet.

Besonders deutlich wird die unterschiedliche Wirkung von Cholesterin auf die beiden Lipide bei Betrachtung der Ordnungsparameterprofile (Abb. 3-5). Diese bieten einen schnellen Überblick der longitudinalen Beweglichkeit der einzelnen Kohlenstoffsegmente der Acylkette. Allgemein kann hierbei festgestellt werden, dass es für beide

Ordnungsparameterprofile von binären Mischungen

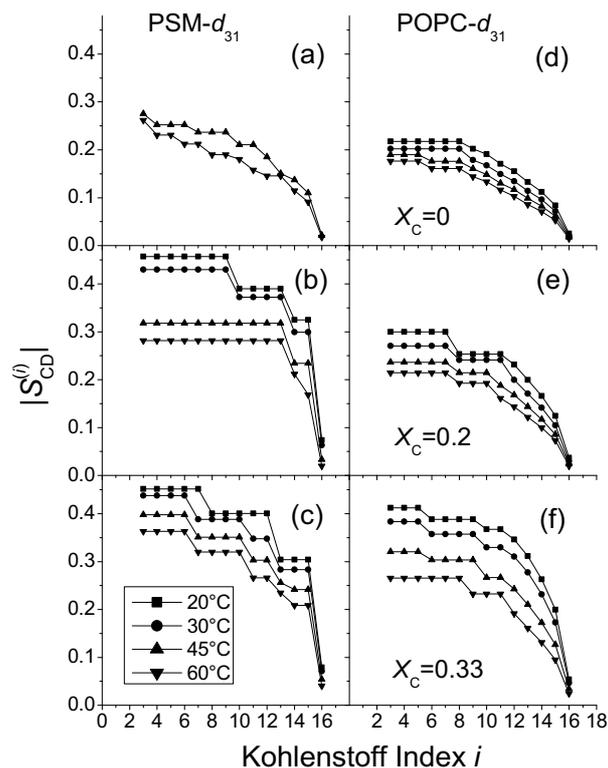


Abb. 3-5 Ordnungsparameterprofile von binären Lipid/Cholesterin Mischungen: (a) reines PSM- d_{31} ; (b) PSM- d_{31} /Cholesterin, $X_C = 0.20$; (c) PSM- d_{31} /Cholesterin, $X_C = 0.33$; (d) POPC- d_{31} ; (e) POPC- d_{31} /Cholesterin, $X_C = 0.20$; (f) POPC- d_{31} /Cholesterin, $X_C = 0.33$.

Lipide eine Abnahme der Ordnung mit zunehmender Entfernung des Kohlenstoffseg-

ments von der Kopfgruppe erkennbar ist, sowie eine Abnahme mit steigender Temperatur. Es werden jedoch Unterschiede zwischen den beiden Lipiden deutlich. Sowohl der bereits angesprochene stärkere Temperatureinfluss wie auch das Fehlen eines „Ordnungssprungs“, welcher einen Phasenübergang kennzeichnet zeigt sich im Fall von POPC- d_{31} (Abb. 3-5 (d), (e), (f)) im Vergleich mit PSM- d_{31} in den Mischungen mit Cholesterin. Bemerkenswert ist auch die Angleichung der Ordnungsparameterprofile beider Lipide bei Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.33$, besonders bei tiefen Temperaturen (Abb. 3-5 (c) und (f)). Dies sollte eine gute Mischbarkeit der Lipide in ternären Mischungen gewährleisten, eine Gleichverteilung von Cholesterin zwischen beiden Lipiden vorausgesetzt.

3.1.3 $^2\text{H-NMR}$ von ternären SM/POPC/Cholesterin-Membranen

Allgemeine Bemerkungen

Als nächstes war die Wechselwirkung der einzelnen Lipide in einer komplexeren Mischung von Interesse. Eine Mischung von Sphingomyelin, POPC und Cholesterin ist dabei ein simples Modell, das es gestattet die physikalischen Eigenschaften der lateralen Entmischung in biologischen Membranen, sogenannten „Lipid-Rafts“, zu untersuchen. Von Interesse ist hierbei nicht nur die Existenz und der Existenzbereich dieser Mikrodomänen sondern auch eine mögliche präferentielle Interaktion zwischen zwei Lipiden, wie sie für Sphingomyelin und Cholesterin diskutiert wird [176][160][177][178][179][180]. Dies ist von besonderem Interesse, da es eine Korrelation zwischen den zellulären Mengen von Cholesterin und Sphingomyelin zu geben scheint [181][182]. Während Sphingomyelin und Cholesterin elementare Bestandteile der Plasmamembran sind (typischerweise 30-40 mol% Cholesterin und 10-20% Sphingomyelin [182][183]) ist POPC mit seiner ungesättigten *sn*-2- und gesättigten *sn*-1-Acyllkette ein gutes Modelllipid für die verschiedenen Phosphoglycerolipide der Plasmamembran. Es wurde hier ein Verhältnis von Sphingomyelin zu POPC von 1:1 gewählt. Dies ist zwar ein unverhältnismäßig grosser Anteil von Sphingomyelin im Vergleich zu biologischen Membranen, aus praktischen Gesichtspunkten schien diese Menge jedoch sinnvoll. Einerseits war die Gesamtmenge an Lipid in den präparierten Proben auf Grund des experimentellen Aufbaus begrenzt (nur eine begrenzte Menge Lipid konnte auf den Glasplättchen orientiert werden), andererseits musste darauf geachtet werden genug deuteriertes Material zu verwenden um ausreichend Signalstärke zu erreichen. Zu geringe Anteile von Sphingomyelin hätten hier zu geringer Signalintensität, bzw. zu langer Messzeit geführt

Zunächst wurde die Mischbarkeit und Interaktion beider Lipide untereinander untersucht. Die selektive Deuterierung der einzelnen Komponenten bietet dabei die Gelegenheit, die physikalischen Eigenschaften der Lipide unabhängig voneinander zu betrachten. Betrachtet man die Temperaturverlauf der Spektren von der Mischung PSM-d₃₁/POPC 1:1 (Abb. 3-6) fällt sofort auf, dass Sphingomyelin keinen Phasenübergang von l_d zu s_o bei 36-38 °C mehr zeigt. Die Aufspaltungen im Bereich von 55-25 °C von 56.2-74.1 kHz für den Plateaubereich (Abb. 3-9) sind charakteristisch für PSM-d₃₁ in einer flüssig-kristallinen Phase, sie sind sogar ein wenig kleiner als die Aufspaltungen von reinem PSM-d₃₁ [161].

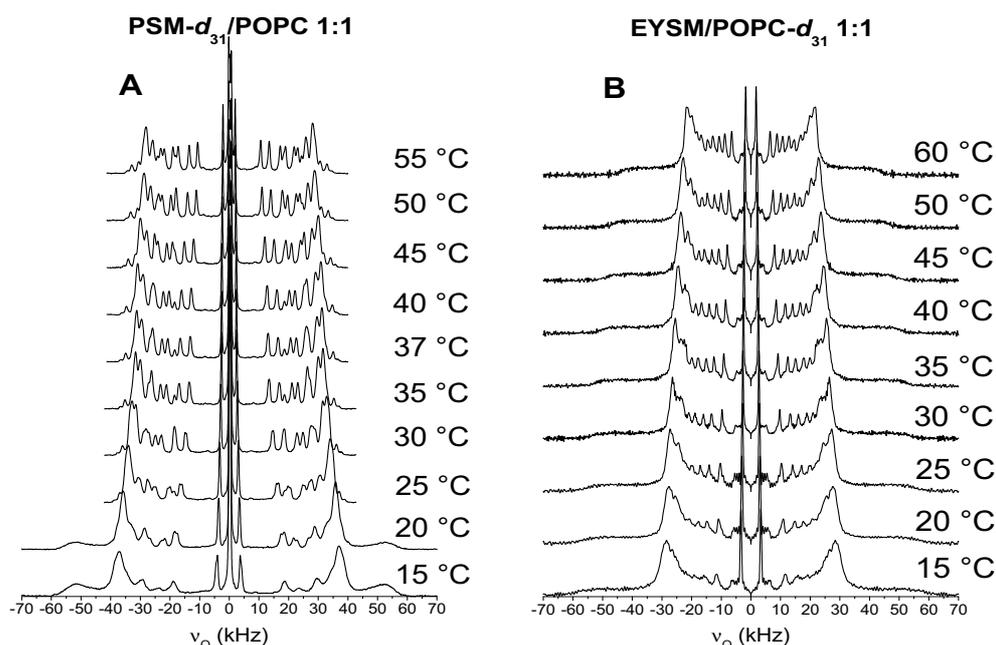


Abb. 3-6 Temperaturabhängigkeit der Festkörper-²H-NMR Spektren von A: PSM-d₃₁/POPC 1:1; B: EYSM/POPC-d₃₁ 1:1. Die PSM-d₃₁-Membran (A) wurden für die Messung makroskopisch auf Glassplättchen orientiert ($\theta = 0^\circ$), Die POPC-d₃₁-Membran (B) wurde unorientiert gemessen und die Spektren für diese Abbildung De-Paked ($\theta = 0^\circ$).

Das beigemischte POPC sorgt offensichtlich für eine höhere laterale Beweglichkeit der Palmitinkette in PSM und destabilisiert so die Ausbildung einer Gelphase. Um diesen Effekt zu zeigen, muss angenommen werden, dass sich beide Lipide homogen mischen. Unterhalb von 25 °C spaltet sich schließlich eine zweite spektrale Komponente ab, welche die Aufspaltung und Signalbreite einer koexistierenden Gelphase aufweist. Die Beobachtbarkeit dieser zweiten Komponente impliziert ausserdem, dass die Domänengröße dieser zweiten koexistierenden Phase gross genug ist, dass der Austausch von Lipiden zwischen beiden Phasen durch Diffusion im Vergleich zur NMR-Zeitskala langsam ist.

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$\Delta\nu_Q$ /kHz									
			15	20	25	30	35	37	40	45	50	55
A	3				74.1	72.3	70.5	70.2	69.7	68.2	66.7	65.9
B	3		73.9	71.7		65.7	63.2	62.4	61.7	63.7	62.0	61.3
C	4-7				67.9					60.2	57.5	56.2
D	2,8,9					63.0	60.0	59.2	58.1	55.7	52.9	51.6
E	10		58.9	57.6	61.4	55.6	52.7	52.0	52.1	50.5	49.34	48.8
F	11										47.5	46.2
G	12		47.8	44.6	55.4	49.6	46.2	43.1	50.5	48.1	45.2	43.8
H	2				49.8	45.5	42.21	41.3	40.5	42.0	39.3	37.9
I	13				39.6	37.0	37.1	37.1	37.2	38.1	35.8	34.4
J	14		37.5	35.8			33.7	32.8	32.1	30.2	28.0	26.9
K	15				33.0	29.5		26.9	26.2	25.6	24.0	22.0
L	16		7.3	6.7	6.1	5.4	5.0	4.9	4.7	4.5	4.1	4.0

Tab. 3-9 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Signale (der Kohlenstoffsegmente *i*) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für PSM- d_{31} /POPC von 55-15 °C. Die Zuordnung für $i = 3$ erfolgte nach [161]

^2H -NMR Spektren von EYSM/POPC- d_{31} 1:1

Auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit von chemisch definiertem undeutertem Palmitoyl-Sphingomyelin (PSM), welches für einen Austausch gegen die perdeuterte Variante in Sphingomyelin/POPC- d_{31} -Membranen notwendig wäre, wurde stattdessen das aus Hühnereidotter (engl. egg yolk) extrahierte Egg Yolk Sphingomyelin (EYSM) verwendet. Da dieses zu 84% aus PSM besteht (Tab. 2-1), bietet es sich als exzellenter Ersatz an. Die Temperaturreihe der gemessenen Spektren für EYSM/POPC- d_{31} in einer 1:1 Mischung (Abb. 3-6 B) zeigt auch für POPC ein Lipid in einer durchgängig flüssig-kristallinen Phase. Die quadrupolaren Aufspaltungen für EYSM/POPC- d_{31} (Tab. 3-10) sind hierbei bemerkenswerterweise fast identisch mit den für reine POPC- d_{31} -Membranen gemessenen (Tab. 3-7). Dies ändert sich in dem Temperaturbereich von 30-15 °C. In diesem Bereich, in dem bei dem sich in der vergleichbaren PSM- d_{31} /POPC Phasenseparation direkt beobachtbar ist, wächst die Signalbreite. Das POPC wechselt offensichtlich sehr schnell zwischen beiden Domänen aus, was die Signalbreiten erklärt.

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$\Delta\nu_Q$ /kHz								
			15	20	25	30	35	40	45	50	60
A	2-5			55.2	54.5	52.9	51.0	48.8	47.3	45.6	43.4
B	6-8										39.6
C	9					49.3	47.3	44.5	42.6	40.7	36.4
D	10		56.8	51.2	49.0	47.4	44.9			37.6	33.5
E	11					41.9	39.6	37.2	35.0	33.1	29.3
F	12			41.3	39.6	37.6	35.6	33.3	31.5	29.4	25.8
G	13			35.2	34.3	32.0	30.1	28.1	26.3	24.6	21.4
H	14		32.0	29.6	28	26.6	24.9	23.4	21.5	20.2	17.5
I	15		23.0	21.8	20.7	19.5	18.2	17.1	16.0	15.0	13.0
J	16		6.7	6.1	5.7	5.4	5.0	4.8	4.4	4.1	3.7

Tab. 3-10 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (der einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für EYSM/POPC- d_{31} von 60-15 °C

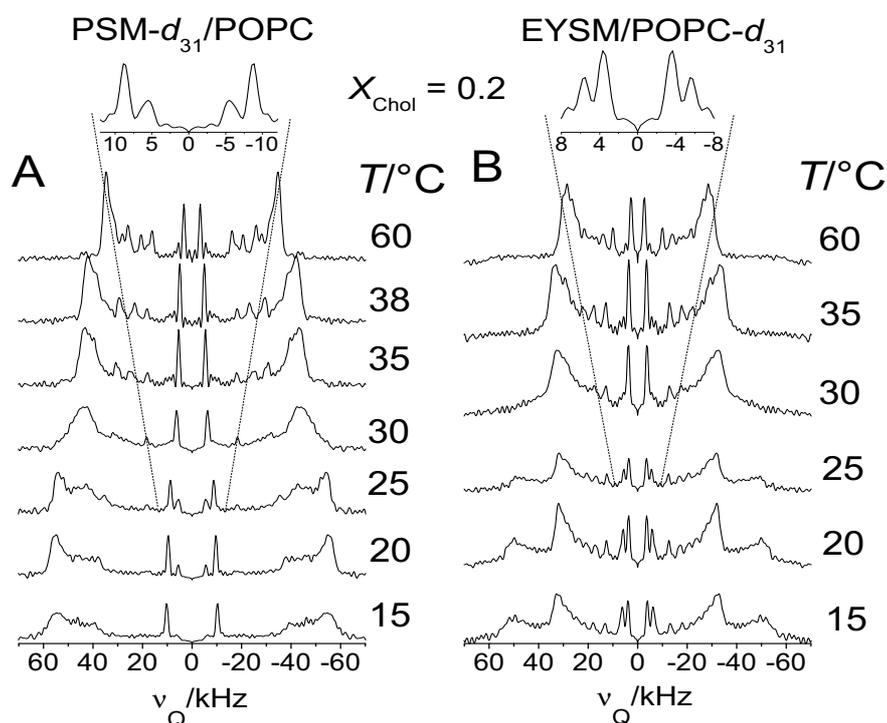


Abb. 3-7 Temperaturabhängigkeit der Festkörper- ^2H -NMR Spektren von A: PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.2$; B: EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.2$. Die Membranen wurde unorientiert gemessen und die Spektren für diese Abbildung De-Paked ($\theta = 0^\circ$). Vergrößert dargestellt ist die Aufspaltung des Methylgruppensignals welche in beiden Mischungen bei 30 °C einsetzt.

**^2H -NMR Spektren
von PSM- d_{31} /POPC
1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$**

Die Spektren des Temperaturverlaufs in der ternären Mischung mit PSM- d_{31} /POPC 1:1 und $X_{\text{Chol}} = 0.2$ weisen interessante Eigenschaften auf (Abb. 3-7). Die Aufspaltungen des Plateaubereichs liegen dabei zwischen denen für PSM- d_{31} /POPC ohne Cholesterin (56.2 kHz bei 55 °C, Tab. 3-9) und denen für PSM- d_{31} , $X_{\text{Chol}} = 0.33$ in der l_o Phase (91 kHz bei 60 °C, Tab. 3-5). Bei ca. 35 °C setzt in der ternären PSM- d_{31} /POPC 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ erneut eine starke Signalverbreiterung ein, die bis 15 °C anhält. Die binäre Mischung mit PSM- d_{31} , $X_{\text{Chol}} = 0.2$, ohne POPC, zeigt zwar auch einen vergleichbaren, bei 45 °C einsetzenden Phasenübergang von l_d zu l_o , dieser ist allerdings schon bei 35 °C abgeschlossen (Abb. 3-2 A). Wieder hat die Beimischung von POPC die Destabilisierung einer geordneten PSM-Phase zur Folge, in diesem Fall der l_o Phase. Interessanterweise spaltet sich im Temperatur-

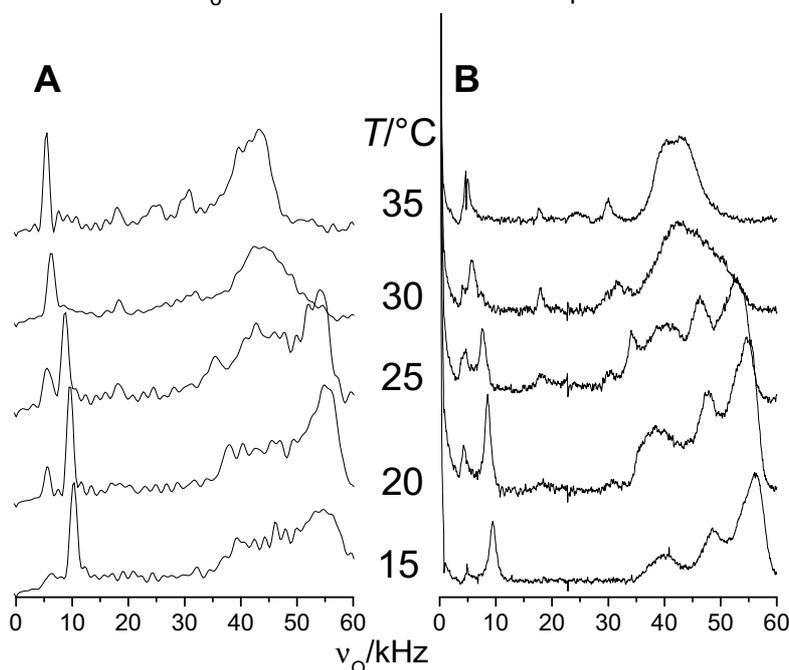


Abb. 3-8 Vergleich der Festkörper- ^2H -NMR Spektren von A: PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.2$, unorientiert gemessen und De-Paked ($\theta = 0^\circ$); B: PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.2$, auf Glassplättchen orientiert ($\theta = 0^\circ$) gemessen. Zu sehen sind die Aufspaltungen der Methylgruppen, die unabhängig von der verwendeten Technik die Koexistenz einer zweiten Phase im Temperaturbereich von 30-15 °C anzeigt.

bereich von 35-15 °C das Signal der Acylkettenmethylgruppe zu einem Duplett von einem Duplett auf (Abb. 3-7 A, Vergrößerung), was als direkt beobachtbare Bildung einer zweiten, koexistierenden Phase gewertet werden muss. Nach der Betrachtung des Verhältnisses der Integrale der Methylgruppensignale kann davon ausgegangen werden, dass die Hauptphase von einer l_o Phase mit der korrespondierenden quadrupolaren Aufspaltung von 17.7 kHz gestellt wird, während das zweite Signal mit

einer Aufspaltung von 11.0 kHz die koexistierende l_d Phase darstellt. Das zweite, kleinere Signal verschwindet fast bei 15 °C, was einen kompletten Übergang des PSM zu einer l_o Phase kennzeichnet.

Abb. 3-8 zeigt den Vergleich der Spektren die mit orientierten wie auch unorientierten Proben gemessen wurden, um den Verdacht auszusräumen, das es sich bei der Aufspaltung der Methylgruppensignale um ein Artefakt der De-Pakeing-Prozedur handeln könnte (die üblicherweise an den äusseren Resonanzen sowie den Signalen in der Nähe der Larmor-Frequenz auftauchen). Auf Grund der nicht klaren Zuordnung der restlichen Signale zu den einzelnen Phasen wurde in diesem Fall, wie auch im Fall der Mischung von EYSM/POPC- d_{31} 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.20$, auf eine tabellarische spektrale Zuordnung verzichtet.

Ein Vergleich der Spektren von PSM- d_{31} /POPC 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ mit dem entsprechenden Temperaturverlauf der Spektren von EYSM/POPC- d_{31} 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (Abb. 3-7 A und B) zeigt einige Gemeinsamkeiten. Die starke Verbreiterung der Signale setzt auch hier bei ca. 35 °C ein. Auch hier spaltet das Duplett des Methylgruppensignals zu einem weiteren Duplett bei ca. 25 °C auf. Der Hauptpeak weist eine quadrupolare Aufspaltung von 8.8 kHz auf, der zweite Peak, vermutlich zu einer l_o Phase gehörend, hat eine höhere Aufspaltung von 11.5 kHz. Im Vergleich zu der Mischung mit perdeutertem PSM als Sonde ist das Verhältnis der Signalintegrale genau umgekehrt. Die Hauptfraktion von POPC- d_{31} hält sich anscheinend in der ungeordneten Phase auf, während die flüssig-geordnete Phase den kleineren Anteil darstellt. Wie im Falle von PSM- d_{31} wächst allerdings die Fraktion in der geordneten Phase mit sinkender Temperatur. Bemerkenswerterweise wird unterhalb von 25 °C ausserdem ein zweiter Plateaupeak mit einer quadrupolaren Aufspaltung von 96 kHz sichtbar, was zusätzlich auf einen Einschluss von POPC- d_{31} in die flüssig-geordnete Phase von EYSM und Cholesterin hinweist. Die Zunahme dieser breiten Signalkomponente korreliert mit der Zunahme des zweiten Methyl-Signals.

**$^2\text{H-NMR}$ Spektren
von EYSM/POPC-
 d_{31} 1:1 mit $X_{\text{Chol}} =$
0.2**

Die Spektren der Mischung von PSM- d_{31} /POPC 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ sind in Abb. 3-9 A dargestellt. Die Spektren mit diesen hohen Cholesterinanteilen weisen sehr einfache Charakteristiken auf. Wie in den binären Mischungen von PSM- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-3 A) ist kein Phasenübergang mehr zu sehen. Die starke Signalverbreiterung bei 60 °C spricht allerdings dafür, dass zumindest ein kleiner Teil des Sphingomyelins in eine ungeordnetere Phase übergeht. Für den restlichen Temperaturbereich befindet sich das Sphingomyelin offensichtlich in einer l_o Phase, wie die quadrupolaren Aufspaltungen der Methylgruppen zeigen (95.2 kHz für $\theta = 0^\circ$ bei 40 °C für den Plateaubereich, Tab. 3-11). Der Vergleich mit den Aufspaltungen der

**$^2\text{H-NMR}$ Spektren
von PSM- d_{31} /POPC
1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$**

binären Mischung PSM- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (104.8 kHz für $\theta = 0^\circ$ bei 40 °C für den Plateaubereich, Tab. 3-5) zeigt jedoch, dass das vorhandene POPC zu einer leichten Störung der geordneten Phase führt. Grund hierfür ist wahrscheinlich die ungesättigte *sn-2* Acylkette des POPC. Gleichzeitig spricht dies natürlich für eine weitgehende Durchmischung von PSM und POPC.

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$(\Delta\nu_Q)$ /kHz									
			15	20	25	30	35	38	40	45	50	60
A	2-9		111.0	109.1	106.6	103.2	99.9	97.5	95.2	91.6	87.2	79.5
B	10-13		99.7	95.8	91.9	89.1	86.9	84.2	84.4	81.4	78.8	
C	14		89.0	85.0	81.4	76.5	71.9	69.5	68.2	63.5	58.6	52.0
E	2		73.4	70.4	66.2	62.3	63.2	62	61.4	60.0		
F	15						59.0	55.3	53.7	50.8	47.1	40.2
G	16		18.6	17.3	15.9	14.4	13.4	12.4	12.0	10.9	10.0	8.3

Tab. 3-11 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (der einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.33$ von 60-15 °C

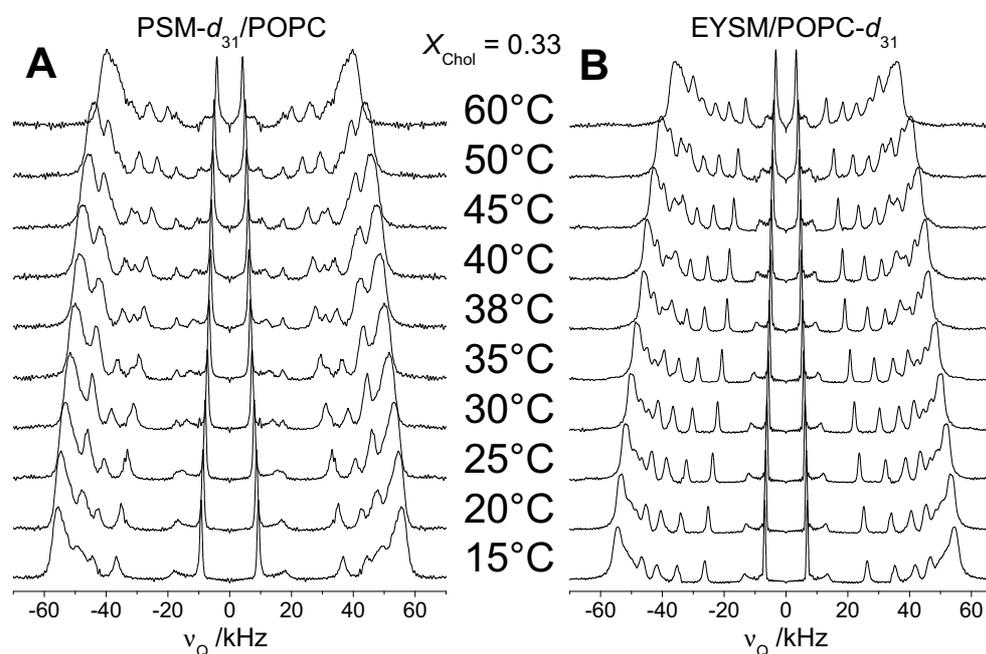


Abb. 3-9 Temperaturabhängigkeit der Festkörper- ^2H -NMR Spektren von A: PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.33$; B: EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.33$. Die Membranen wurde unorientiert gemessen und die Spektren für diese Abbildung De-Paked ($\theta = 0^\circ$).

Signal	<i>i</i>	<i>T</i> /°C	$(\Delta\nu_Q)$ /kHz									
			15	20	25	30	35	38	40	45	50	60
A	2-6				103.8	100.7	97.2	92.3	89.9	85.7	80.6	71.4
B	7-9		109.1	106.3	98.7	94.1	89.9	85.5	83.4	79.2	75.1	
C	10,11				93.4	89	85.1	80.1	77.4	72	67.9	60.0
D	12,2		93.6	90.76	86.8	82.8	78.8	74.0	71.5	66.9	62.7	54.6
E	13		83.6	81.1	77.4	73.2	69.2	64.2	61.8	57.6	53.6	45.7
F	14		70.4	68.2	64.4	60.5	57.0	52.7	50.7	46.9	43.4	36.8
G	15		52.5	50.3	47.4	44.3	41.4	38.1	36.5	33.7	30.9	26.0
H	16		13.8	13.2	12.4	11.5	10.8	9.9	9.5	8.7	7.9	6.6

Tab. 3-12 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (der einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.33$ von 60-15 °C

Die Spektren der Mischung von EYSM/POPC- d_{31} 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-9 B) zeigen sehr ähnliche Eigenschaften wie die entsprechende Mischung mit perdeutertem Sphingomyelin (Abb. 3-9 A). Auch hier beobachtet man sehr homogene Spektren über den gesamten Temperaturbereich mit grossen quadrupolaren Aufspaltungen (89.9 kHz für $\theta = 0^\circ$ bei 40 °C für den Plateaubereich, Tab. 3-12). In diesem Fall sind die Aufspaltungen sogar grösser als in der binären Mischung von POPC- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (85.0 kHz für $\theta = 0^\circ$ bei 40 °C für den Plateaubereich, Tab. 3-8). Die Mischung von POPC und Sphingomyelin hat einen ordnenden Effekt auf POPC, wie sich auch in den binären PSM/POPC Mischungen gezeigt hat. Ein weiterer Unterschied ist der kleinere Plateaubereich für POPC, der sich ca. über die Methylengruppen 3-6 erstreckt (3-9 für PSM). Die restlichen Signale sind generell höher aufgelöst und weisen geringere quadrupolare Aufspaltungen auf. Grund hierfür ist wahrscheinlich erneut die Doppelbindung der ungesättigten *sn*-2 Oleylkette des POPC.

^2H -NMR Spektren von EYSM/POPC- d_{31} 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$

Die letzte Erhöhung des Cholesteringehalts auf $X_{\text{Chol}} = 0.5$ in einer PSM- d_{31} /POPC 1:1 Mischung bringt weitere Vereinfachungen in den Temperaturverlauf der ^2H NMR Spektren (Abb. 3-10 A). Die quadrupolaren Aufspaltungen sind weiter durch den Einfluss von Cholesterin gestiegen, 104.6 kHz für $\theta = 0^\circ$ bei 40 °C für den Plateau-

^2H -NMR Spektren von PSM- d_{31} /POPC 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.5$

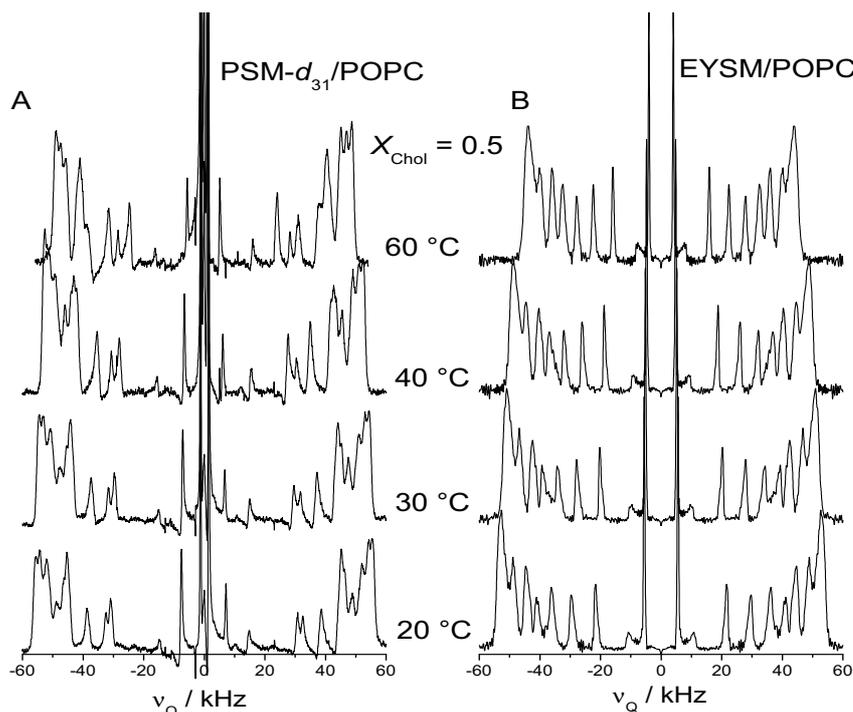


Abb. 3-10 Temperaturabhängigkeit der Festkörper- ^2H -NMR Spektren von A: PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.5$; B: EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.5$. Die PSM- d_{31} -Membran wurden für die Messung makroskopisch auf Glassplättchen orientiert ($\theta = 0^\circ$), die POPC- d_{31} -Membran wurde unorientiert gemessen und die Spektren für diese Abbildung De-Paked ($\theta = 0^\circ$).

Signal	i	$T/^\circ\text{C}$	$(\Delta\nu_Q)/\text{kHz}$							
			20	25	30	35	40	45	50	60
A	2,3,4,5		111.1	109.5	108.9	107.4	104.6	103.2	99.9	97.3
B	6,7		108.6	106.9	106.1	105.0	102.6	99.8	96.9	94.1
C	8,9		103.9	102.6	102.0	100.6	98.1	96.3	93.5	90.0
D	10		74.3	95.7	95.1	94.2	91.0	89.2	86.0	81.1
E	11		90.6	91.2	90.7	89.6	87.0	86.0	83.7	
F	12,13			88.7	88.2	87.4	85.4	81.8	79.1	75.6
G	14		77.4	75.3	74.4	73.2	69.9	68.1	65.3	62.2
H	2		65.1	64.0	63.5	62.9	60.7	60.1	58.3	56.6
I	15		61.7	59.6	59.2	57.9	55.4	53.7	51.2	48.1
J	16		14.3	13.7	13.5	13.2	12.2	11.8	11.7	10.2

Tab. 3-13 Spektrale ^2H -NMR Zuordnungen der Deuteronensignale (der einzelnen Kohlenstoffsegmenten i der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für PSM- d_{31} /POPC 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.5$ von 60-20 $^\circ\text{C}$

bereich, Tab. 3-13) was bemerkenswerterweise fast identisch ist mit den Aufspal-

tungen für die der binären Mischung PSM- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (104.8 kHz für $\theta = 0^\circ$ bei 40 °C für den Plateaubereich, Tab. 3-5). Insgesamt kann hier auch eine generell höhere Auflösung der einzelnen Signale und geringere Signalbreiten festgestellt werden. Insbesondere die Signale der Methylengruppen 3-9 zerfallen hier in drei gut auflösbare Signale, während in der ternären Mischung von PSM- d_{31} /POPC 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ nur ein einzelner Peak für diesen Plateaubereich beobachtet werden kann.

Die Spektren der ternären Mischung EYSM/POPC- d_{31} 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.5$ (Abb. 3-10 B) ähneln sehr den komplementären Spektren mit PSM- d_{31} als Sonde. Auch hier sind durchgängig hohe quadrupolare Aufspaltungen zu beobachten, die für den Plateaubereich nochmals ca. 10 kHz über der EYSM/POPC- d_{31} 1:1 Mischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ liegen (Tab. 3-14, Tab. 3-12). Da die gemessenen Splittings sehr nahe an denen für PSM- d_{31} /POPC 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.5$ liegen, kann von einer gemeinsamen Ordnung der Umgebung der Lipide ausgegangen werden und damit von einer homogenen Verteilung der Lipide innerhalb der Membran

$^2\text{H-NMR}$ Spektren von EYSM/POPC- d_{31} 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.5$

Signal	<i>i</i>	T/°C	$(\Delta\nu_Q)/\text{kHz}$								
			15	20	25	30	35	40	45	50	60
A	2,3,4,5,6		107.3	105.3	104.2	102.0	99.7	98.0	95.5	93.2	88.0
B	7,8,9		99.0	97.9	95.7	93.6	91.5	89.1	86.9	85.0	80.1
C	10,11		91.2	89.5	87.0	84.9	82.8	80.7	78.6	76.8	72.2
D	12		83.7	82.2	80.7	78.8	76.5	73.6	71.7	69.7	65.0
E	13		74.0	72.4	70.2	68.6	66.5	64.4	62.0	60.0	55.8
F	14		61.1	59.2	57.6	55.7	54.2	52.3	50.1	48.8	44.7
G	15		44.7	43.2	42.0	40.4	39.1	37.6	36.2	34.8	31.9
H	16		11.5	11.2	10.8	10.4	10.0	9.6	9.2	8.9	8.1

Tab. 3-14 Spektrale $^2\text{H-NMR}$ Zuordnungen der Deuteronensignale (der einzelnen Kohlenstoffsegmenten *i* der Palmitoylkette) sowie deren quadrupolaren Aufspaltungen (für $\theta = 0^\circ$) für EYSM/POPC- d_{31} 1:1 $X_{\text{Chol}} = 0.5$ von 60-15 °C

Ein detaillierterer Vergleich der unterschiedlichen Ordnung der verschiedenen Acylketten in PSM- d_{31} und POPC- d_{31} ist in Abb. 3-11 A-F mit den berechneten Ordnungsparametern für die einzelnen Methylengruppen gegeben. Sofort fällt auf, dass PSM- d_{31} in binären Mischung und ternärer Mischung mit mittlerem Cholesterinanteil von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ über die gemessenen Temperaturbereiche sehr viel grössere Ordnungsparameter aufweist als POPC- d_{31} in vergleichbaren Membranen. Bei Betrachtung der einfachen binären Mischung beider Lipide in Abb. 3-11 A und D wird

Ordnungsparameterprofile von ternären Mischungen

jedoch deutlich, dass der Unterschied der Acylkettenordnung bei hohen Temperaturen nicht gross genug ist um Phasenseparation zu verursachen. Bei niedrigen

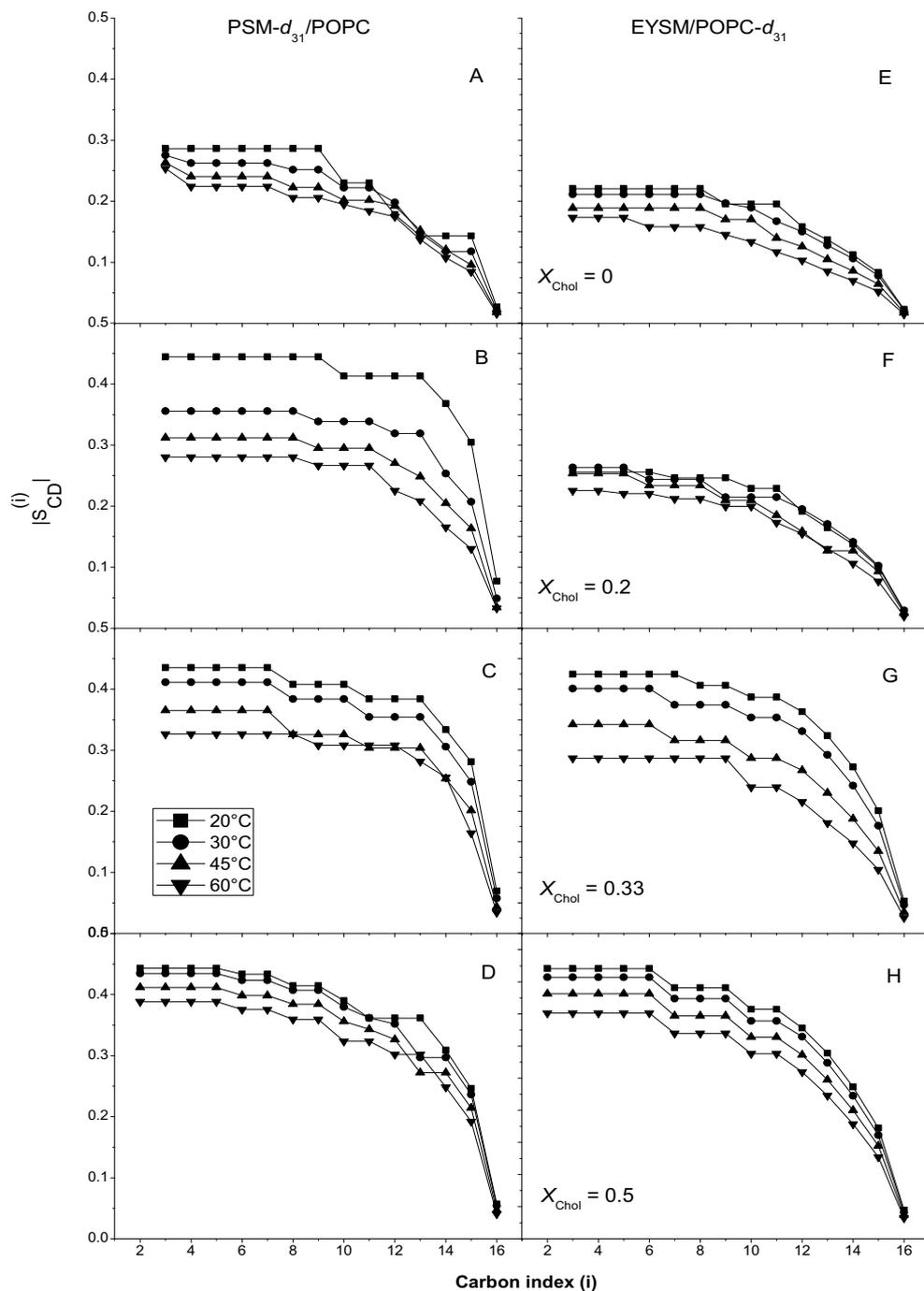


Abb. 3-11 Ordnungsparameterprofile von ternären Lipid/Cholesterin Mischungen: A: PSM- d_{31} /POPC; B: PSM- d_{31} /POPC/Cholesterin, $X_{\text{Chol}} = 0.20$; C: PSM- d_{31} /POPC/Cholesterin, $X_{\text{Chol}} = 0.33$; D: PSM- d_{31} /POPC/Cholesterin, $X_{\text{Chol}} = 0.5$; E: EYSM/POPC- d_{31} ; F: EYSM/POPC- d_{31} /Cholesterin, $X_{\text{Chol}} = 0.20$; G: EYSM/POPC- d_{31} /Cholesterin, $X_{\text{Chol}} = 0.33$; H: EYSM/POPC- d_{31} /Cholesterin, $X_{\text{Chol}} = 0.5$

Temperaturen hingegen ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Ordnungsparameter der Palmitoylkette von PSM- d_{31} und POPC- d_{31} erkennbar. Der Unterschied von $\Delta|S_{CD}| = 0.05$ bei 30 °C und $\Delta|S_{CD}| = 0.07$ bei 20 °C für den Plateaubereich sind ein Anzeichen für strukturelle Unterschiede der Lipide, zumindest im Interphasebereich. Durch Zusatz von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ wachsen die Unterschiede der Acylkettenordnung deutlich (Abb. 3-11 B und E). Während die Ordnungsparameter in PSM- d_{31} die Charakteristiken einer l_o Phase aufweisen, ist die Ordnung der Palmitoylkette in POPC- d_{31} nur mäßig erhöht, mit Werten die einer l_d Phase entsprechen. Die Unterschiede der Ordnungsparameter wachsen in diesen Lipidmischungen auf $\Delta|S_{CD}| = 0.11$ bei 30 °C und $\Delta|S_{CD}| = 0.19$ bei 20 °C. In diesem Bereich sollten die unterschiedlichen Acylkettenordnungen innerhalb einer Membran ein klares Zeichen für zwei unterschiedliche, koexistierende Domänen sein. Ausserdem wird auch hier ein unterschiedlicher Einfluss der Temperatur auf die beiden Lipide sichtbar. Ein Abkühlen der Lösung führt zu einem viel stärkeren Anstieg der Ordnung in PSM- d_{31} als in POPC- d_{31} , wahrscheinlich auf Grund der Bildung einer kleinen Fraktion einer dritten Phase, die wahrscheinlich aus PSM- d_{31} in einer Gelphase besteht. Eine Erhöhung des Cholesterinanteils der Membran auf $X_{\text{Chol}} = 0.33$ führt zu einer Annäherung der Ordnungsparameterprofile für beide Lipide (Abb. 3-11 E und F), auch was die Temperaturabhängigkeit angeht. Die Unterschiede sind bemerkenswert gering, was für eine homogene Mischung der beiden Lipide spricht. Insgesamt weisen die hohen Werte für beide Lipide auf eine l_o Phase hin.

Die ersten Spektralmomente eines ^2H -NMR-Spektrums $M_1 = \int \omega f(\omega) d(\omega) / \int f(\omega) d\omega$ sind ein Maß für den Mittelwert der Ordnungsparameter

Analyse der ersten Spektralmomente ternärer Mischungen

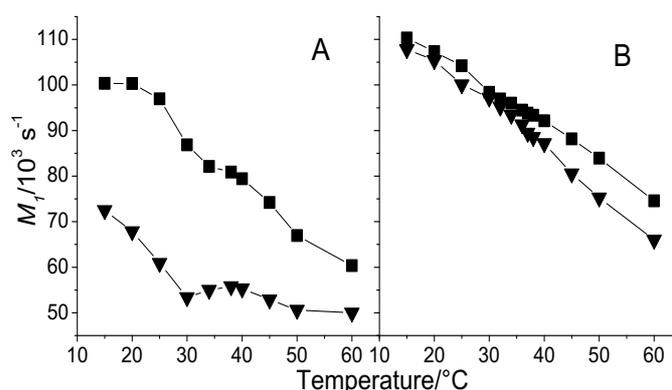


Abb. 3-12 Die ersten Spektralmomente der unorientierten Membranen in Abhängigkeit der Temperatur. Abgebildet sind die Daten für PSM- d_{31} /POPC (■) und EYSM/POPC- d_{31} (▼). A: $X_{\text{Chol}} = 0.2$; B: $X_{\text{Chol}} = 0.33$

meter, und somit für die Gesamtordnung des betrachteten Systems. Eine Auftragung von M_1 für PSM- d_{31} /POPC und EYSM/POPC- d_{31} gegen die Temperatur ist in Abb. 3-12 dargestellt. Bei einem Cholesterinmolenbruch von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (Abb. 3-12 A) werden erneut starke Unterschiede für beide Lipide sichtbar. Die Sphingomyelinkomponente der Membran befindet sich offensichtlich in einer Umgebung hoher longitudinaler Ordnung, während die Palmitoylkette von POPC eine hohe Beweglichkeit besitzt. Hierdurch wird weiter die Koexistenz zweier Phasen verschiedener Ordnung in Membranen mittlerer Cholesterinkonzentration betont. Bei Erhöhung der Cholesterinzugabe auf $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-12 B) sind die Unterschiede der verschiedenen ersten Spektralmomente fast vollständig verschwunden, mit charakteristischen Werten einer l_o Phase für beide Lipide. Erst bei höheren Temperaturen werden kleine Unterschiede für beide Lipide deutlich, was eine beginnende laterale Inhomogenisierung der Membran andeutet. Vermutlich geht POPC durch seine intrinsisch höhere Kettenunordnung bei diesen Temperaturen wenigstens partiell in eine l_d Phase über, was auch bereits in den zugehörigen Spektren durch Signalverbreiterung angedeutet wurde (Abb. 3-9 A und B). Insgesamt kann aber von einer homogenen Mischung beider Lipide bei einer Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ unterhalb von 50 °C ausgegangen werden.

3.1.4 Analyse der ^2H -NMR-Daten mit Hilfe des First-Order-Mean-Torque Modells

Eine weitere Prozessierung der Daten mit Hilfe des First-Order-Mean-Torque Modells [163][185] ist eine nützliche Möglichkeit über die gemessenen ^2H -NMR-Spektren weitergehende Informationen über die betrachteten Membranen zu erhalten. So können strukturelle Parameter wie die Acylkettenlänge, hydrophobe Schichtdicke, pro Lipid eingenommene Fläche, sowie über deren Temperaturabhängigkeit des thermischen Expansionskoeffizienten parallel und senkrecht zur Membranflächennormale bestimmt werden. Dies liefert nicht nur interessante Einsicht in die strukturelle Organisation der Membran sondern ausserdem weitere Hinweise zur Domänenbildung innerhalb der Lipidschichten.

Kettenlängenprofile für binäre PSM- d_{31} Membranen

Zunächst wurde die durchschnittlichen Projektionen der einzelnen Kohlenstoffsegmente auf die Membranflächennormale relativ zu einem Referenzpunkt, hier die terminale Methylgruppe, bestimmt. Um einen direkteren Vergleich des Einfluss des Cholesterins auf den Interfacebereich zu haben wurden die einzelnen Kohlenstoffsegmente i mit dem alternativen Index $i' = n_C - i + 2$ neu indiziert. Es ergibt sich damit

ein reverser Index mit $i' = 2$ für die terminale Methylgruppe und $i' = 16$ für das C2 Kohlenstoffsegment. Das daraus resultierende Kettenlängenprofil für PSM- d_{31} in Mischung mit Cholesterin in Abb. 3-13 dargestellt. Bei niedrigen Temperaturen (Abb. 3-13 (a) und (b)) wird deutlich, dass die l_0 Phase, wie sie für eine Sphingomyelinmembran mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (■) angenommen wird, eine fast identische Streckung der Acylkette wie die bei diesen Temperaturen für reines Sphingomyelin (▲) erhaltene Gelphase aufweist.

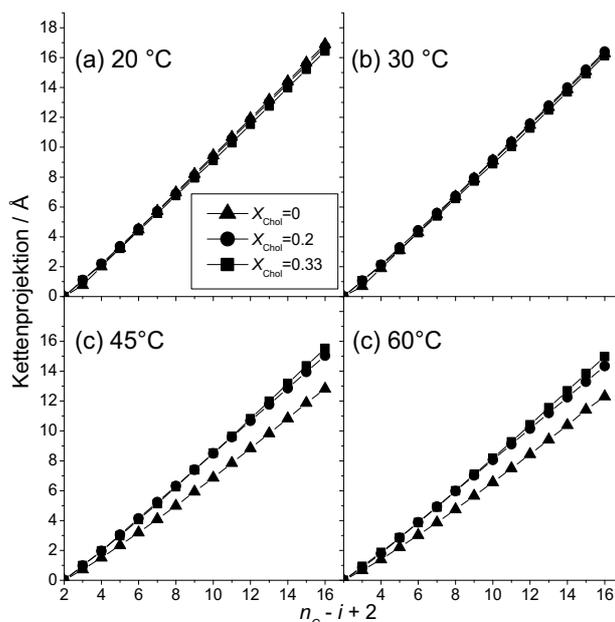


Abb. 3-13 Projektionen der Kohlenstoffsegmente auf die Membranflächennormale für PSM- d_{31} Membranen bei verschiedenen Temperaturen. Errechnete Parameter sind abgebildet für reines PSM- d_{31} (▲), PSM- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (●) und PSM- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (■) bei (a) 20 °C; (b) 30 °C; (c) 45 °C; und (d) 60 °C. Der Wert der Kettenprojektion für $i' = 16$ entspricht $\langle L_C^* \rangle$.

Bei höheren Temperaturen (Abb. 3-13 (c) und (d)) wird hingegen der Unterschied zwischen reinem Sphingomyelin (▲) und Sphingomyelin mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (■) in den Gesamtlängen der Acylketten deutlich. Der grösste Unterschied wird hier wie auch für die Mischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (●) für die Kohlenstoffsegmente in der Interfaceregion ($i' = 10-16$) beobachtet. Der Effekt von Cholesterin auf die Streckung der Acylkette in PSM scheint schon bei mittleren Cholesterinmolenbrüchen gesättigt zu sein. Überraschenderweise weisen die Membranen mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (●) beinahe identische Kettenlängen im Vergleich mit PSM- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (■) auf. Gleichzeitig zeigt ein Blick auf die hohen Werte für die thermischen Ausdehnungskoeffizienten (Abb. 3-15) dass die Cholesterin-Molenbrüche $X_{\text{Chol}} = 0.15$ und $X_{\text{Chol}} = 0.2$ noch nicht ausreichend sind um Phasenübergänge komplett zu unterdrücken. So ist der Wert für $\alpha_{||}$ mit

$-7.0 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ für $X_{\text{Chol}} = 0.15$ bei 55 °C ein klares Zeichen für einen Übergang einer l_o zu einer l_d Phase.

	$T/\text{°C}$	$D_C/\text{Å}^a$	$\langle A \rangle/\text{Å}^2$ ^b	$\alpha_{ }/10^{-3} \text{ K}^{-1}$ ^c	$\alpha_{\perp}/10^{-3} \text{ K}^{-1}$ ^d	$L_C^*/\text{Å}$ ^e	$L_C/\text{Å}$ ^f
PSM- d_{31}	20	19.8	21.9	-0.3	0.9	16.4	18.4
	30	19.1	23.0	-8.8	11.9	15.8	17.7
	45	15.7	28.5	-4.0	6.5	12.8	14.3
	55	14.9	30.4	-0.1	0.5	12.3	13.6
$X_C = 0.15$	20	18.9	23.0	-1.6	2.9	16.6	19.0
	30	18.3	24.1	-5.3	6.5	16.1	18.4
	45	17.2	26.0	-1.8	2.9	14.2	16.0
	55	16.6	27.3	-7.0	7.9	13.9	15.5
$X_C = 0.20$	20	19.7	22.0	-1.0	2.0	16.7	18.9
	30	19.3	22.8	-4.8	6.2	16.4	18.5
	45	17.2	26.0	-6.2	7.6	15.0	17.0
	60	16.4	27.8	-0.6	1.4	14.3	16.0
$X_C = 0.33$	20	19.6	22.1	-0.6	1.7	16.3	18.6
	30	19.4	22.7	-1.4	2.7	16.0	18.2
	45	18.7	23.9	-2.7	3.8	15.4	17.5
	60	18.1	25.1	-1.9	3.2	14.8	16.9

Tab. 3-15 Zusammenfassung der strukturellen Ergebnisse für PSM- d_{31} in binären Mischungen, berechnet mit dem First-Order-Mean-Torque Modell. ^aHydrophobe Schichtdicke einer Acylkette, ^bMittlere Fläche pro Lipid, ^cisobarer thermischer Expansionskoeffizient parallel zur Membranflächennormale, ^disobarer thermischer Expansionskoeffizient senkrecht zur Membranflächennormale, ^eMittlere Kettenlänge von C3 bis C15, ^fAngenäherte mittlere Kettenlänge von C2 bis C16

Kettenlängenprofile für binäre POPC- d_{31} Membranen

Für POPC- d_{31} zeigen sich signifikante Unterschiede in der Abhängigkeit der Kettenlänge von der Zugabe von Cholesterin (Abb. 3-14). Die Palmitoylkette in dem Glycerophospholipid scheint nicht so stark auf die Zugabe von Cholesterin zu reagieren wie im Falle des Sphingolipids. Hier ist eine eher lineare Abhängigkeit der Kettenlänge

von der Cholesterinkonzentration zu beobachten. .

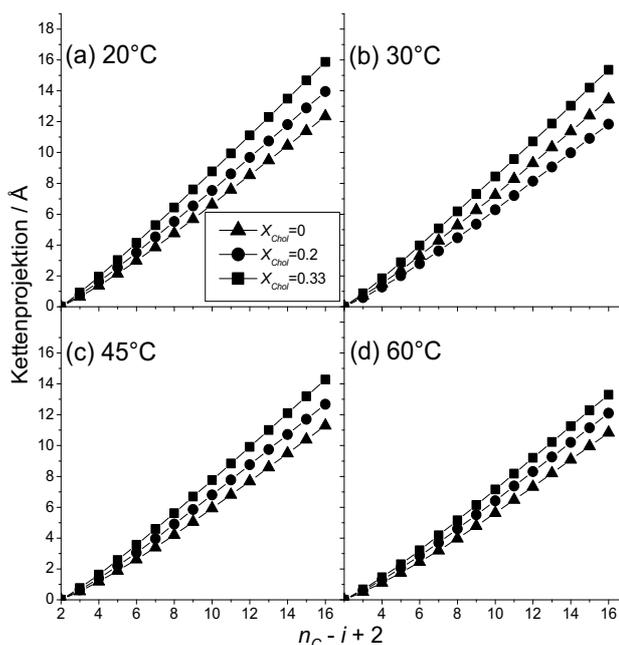


Abb. 3-14 Projektionen der Kohlenstoffsegmente auf die Membranflächennormale für POPC- d_{31} Membranen bei verschiedenen Temperaturen. Errechnete Parameter sind abgebildet für reines POPC- d_{31} (\blacktriangle), POPC- d_{31} mit $X_{Chol} = 0.2$ (\bullet) und POPC- d_{31} mit $X_{Chol} = 0.33$ (\blacksquare) bei (a) 20 °C; (b) 30 °C; (c) 45 °C; und (d) 60 °C. Der Wert der Kettenprojektion für $i' = 16$ entspricht $\langle L_C^* \rangle$.

Die Werte der Kettenprojektion der Membran mit $X_{Chol} = 0.33$ (\blacksquare) sind schliesslich vergleichbar mit der Sphingomyelinmembran gleichen Cholesterinhalts (15.7 Å für POPC- d_{31} mit $X_{Chol} = 0.33$ gegen 16.3 Å für PSM- d_{31} mit $X_{Chol} = 0.33$, beides 20 °C, Tab. 3-15 und Tab. 3-16). Gleichzeitig kann eine stärker ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Kettenlänge bei POPC festgestellt werden. So sinkt der Wert in der Mischung POPC- d_{31} mit $X_{Chol} = 0.33$ für die Kettenprojektion von 15.7 Å bei 20 °C auf 13.1 Å bei 60 °C. Im selben Bereich sinkt die Kettenlänge von PSM- d_{31} mit $X_{Chol} = 0.33$ von 16.3 Å auf 14.8 Å. Dies spiegelt sich auch durch die thermischen Expansionskoeffizienten im Falle von POPC- d_{31} wieder, die für $X_{Chol} = 0.33$ für sämtliche Temperaturen ca. doppelt so hoch sind wie in der Vergleichsmischung von PSM- d_{31} mit $X_{Chol} = 0.33$. Cholesterin ist offensichtlich im Fall von POPC schlechter in der Lage den Phasenübergang von l_o zu einer l_d Phase zu unterdrücken, während bei Sphingomyelin eine Cholesterinfraktion von $X_{Chol} = 0.33$ für den gesamten gemessenen Temperaturbereich ausreichend ist.

	$T/^\circ\text{C}$	$D_C/\text{\AA}^a$	$\langle A \rangle/\text{\AA}^2{}^b$	$\alpha_{ }/10^{-3}\text{K}^{-1}{}^c$	$\alpha_{\perp}/10^{-3}\text{K}^{-1}{}^d$	$L_C^*/\text{\AA}{}^e$	$L_C/\text{\AA}{}^f$
POPC- d_{31}	20	14.7	29.5			12.1	13.6
	30	14.3	30.8	-2.5	3.7	11.6	13.0
	45	13.9	32.2			11.1	12.4
	55	13.4	33.7			10.6	11.9
$X_C = 0.20$	20	16.8	25.9			13.8	15.5
	30	16.1	27.3	-3.5	4.6	13.3	14.8
	45	15.3	29.3			12.5	14.0
	60	14.7	31.1			11.9	13.3
$X_C = 0.33$	20	19.0	22.9	-2.0	3.1	15.7	17.7
	30	18.5	23.8	-3.6	4.8	15.2	17.1
	45	17.3	25.9	-5.4	6.5	14.1	15.8
	60	16.0	28.4	-4.0	5.3	13.1	14.7

Tab. 3-16 Zusammenfassung der strukturellen Ergebnisse für POPC- d_{31} in binären Mischungen, berechnet mit dem First-Order-Mean-Torque Modell. ^aHydrophobe Schichtdicke einer Acylkette, ^bMittlere Fläche pro Lipid, ^cisobarer thermischer Expansionskoeffizient parallel zur Membranflächennormale, ^disobarer thermischer Expansionskoeffizient senkrecht zur Membranflächennormale, ^eMittlere Kettenlänge von C3 bis C15, ^fAngenäherte mittlere Kettenlänge von C2 bis C16

Hydrophobe Schichtdicke und mittlere Fläche für binäre Mischungen

Mit Hilfe des First-Order-Mean-Torque Modell ist man in der Lage aus den gemessenen ^2H -NMR-Spektren zwei weitere wichtige strukturelle Parameter zu berechnen: Die hydrophobe Schichtdicke D_C einer einzelnen Lipidschicht und die mittlere eingenommene Fläche einer Acylkette in der Membran, siehe Glg. 2.19 und 2.20. Beide Parameter geben wertvolle Informationen über die Expansion der Acylkette senkrecht oder parallel zur Membranflächennormale. Abb. 3-15 zeigt die halblogarithmische Auftragung von D_C und $\langle A \rangle$ gegen die Temperatur für PSM- d_{31} und POPC- d_{31} (A und C) in binären Mischungen mit Cholesterin. Der Phasenübergang von PSM- d_{31} , der sich anhand der plötzlichen Zunahme der mittleren Fläche oder Abnahme der hydrophoben Schichtdicke mit steigender Temperatur zeigt, wird durch die Zugabe von Cholesterin schrittweise unterdrückt (Abb. 3-15 B und D). Im Gegensatz

dazu beobachtet man für POPC- d_{31} (Abb. 3-15 A und C) in denselben Temperaturbereichen zwar auch eine stetige Zunahme der hydrophoben Schichtdicke und Abnahme der mittleren Fläche mit steigender Cholesterinkonzentration, ein Phaseübergang ist jedoch über den gesamten Temperaturbereich nicht auszumachen. Einzig in Mischungen von POPC- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ zeichnet sich ein leicht sigmoider Temperaturverlauf ab, der auf einen Phasenübergang hindeuten könnte. Allgemein kann auch bemerkt werden, dass die Steigung der Temperaturabhängigkeiten von POPC- d_{31} im Ein-Phasenbereich steiler als im Falle von PSM- d_{31} sind, die hydrophobe Schichtdicke und mittleren Flächen für das Glycerophospholipid also stärker auf Temperaturänderungen reagieren.

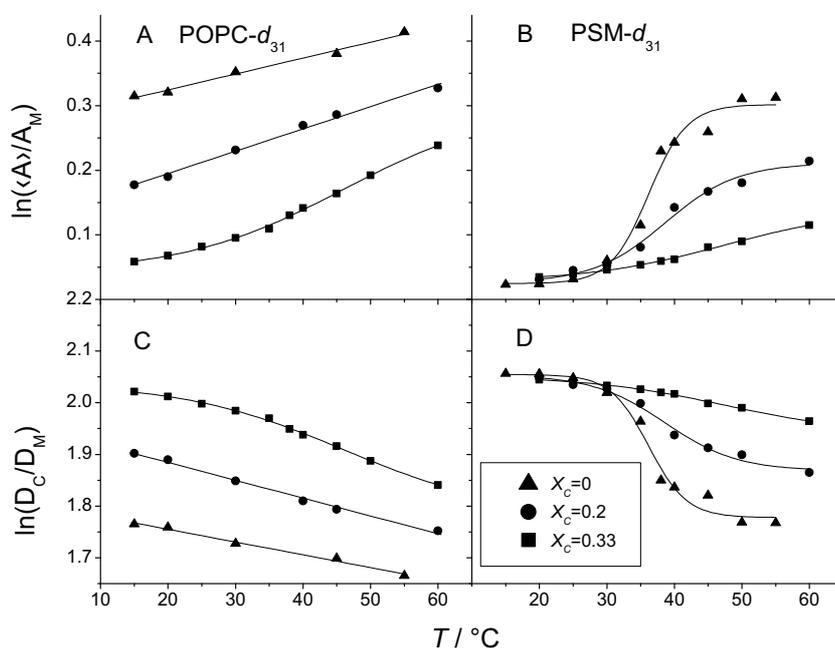


Abb. 3-15 Halblogarithmische Auftragung der mittleren Fläche pro Acylkette (A und B) und hydrophobe Schichtdicke (C und D), normiert auf die maximale Fläche $\langle A_M \rangle$ bzw. Dicke D_M , von PSM- d_{31} (B und D) und POPC- d_{31} (A und C). Abgebildet sind die Daten für reine Lipide (\blacktriangle), Lipide mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (\bullet) und Lipide mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (\blacksquare).

Die zuvor angewandte Reduktion der Daten mit Hilfe der First-Order-Mean-Torque Modells liefert in ternären Lipidmischungen weitere Informationen über die Lage der Ein- bzw. Zwei-Phasenbereiche in Abhängigkeit von Temperatur und Cholesterinanteil der Membran. Zunächst wurden erneut die mittleren Projektionen der einzelnen Kettensegmente auf die Membranflächennormale berechnet. Abb. 3-16 zeigt die betreffenden Profile bei verschiedenen Temperaturen. In der ersten Reihe von Abb. 3-16 sind die Mischungen von Sphingomyelin und POPC ohne Zusatz von Cholesterin zu sehen. Über die gesamte Temperaturspanne von 20-60 $^\circ\text{C}$ sind Unter-

Kettenlängenprofile für ternäre Lipidmembranen

schiede in der Gesamtkettenprojektion zu sehen. Bei 20 °C betragen diese 1.4 Å, ein Wert der auf eine teilweise Entmischung beider Lipide hindeutet. Auf Grund des bereits erwähnten stärkeren Effekts der Temperatur auf die Acylkettenordnung von POPC im Vergleich mit Sphingomyelin steigert sich die Differenz der Gesamtkettenprojektion auf 1.9 Å bei 60 °C. Hier sollte die hydrophobe Inkompatibilität der Acylketten für die Ausbildung von kleinen, segregierten Domänen sorgen, die aber offensichtlich nicht gross genug sind um als Subspektrien beobachtbar zu sein (Abb. 3-6).

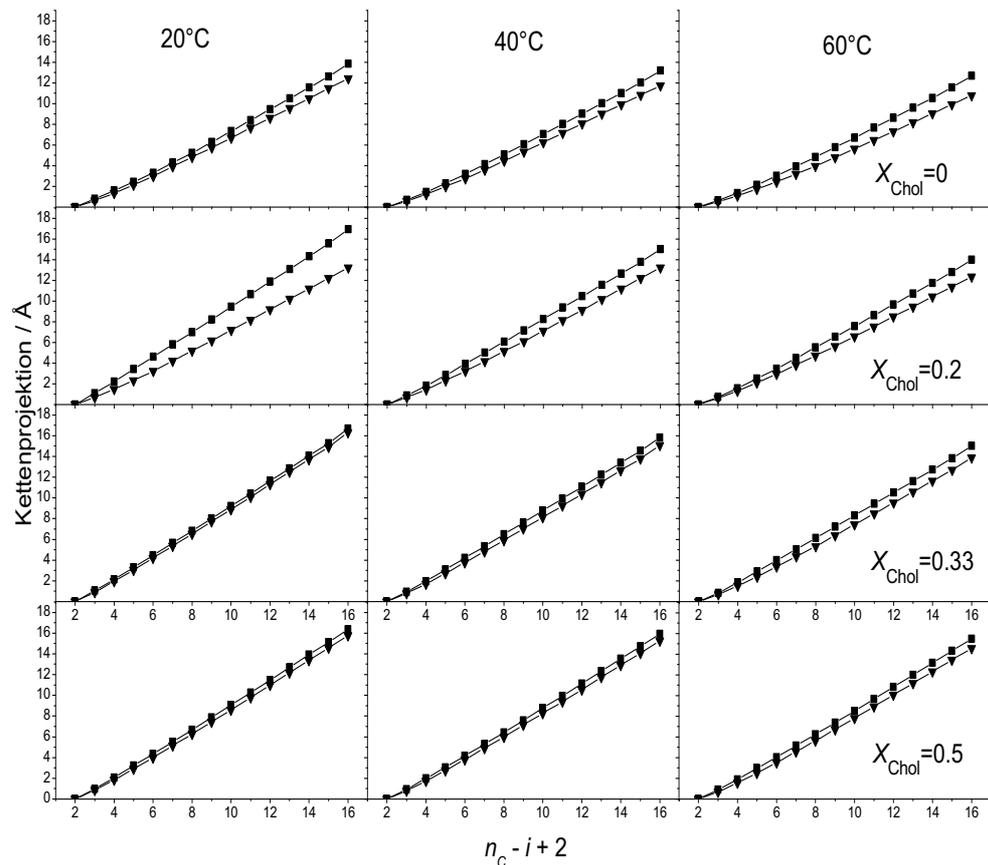


Abb. 3-16 Projektionen der Kohlenstoffsegmente auf die Membranflächennormale für SM/POPC Membranen mit variierendem Cholesterinanteil bei verschiedenen Temperaturen. PSM- d_{31} Membranen bei verschiedenen Temperaturen. Errechnete Parameter sind abgebildet für PSM- d_{31} (■) oder POPC- d_{31} (▼). Der Wert der Kettenprojektion für $i' = 16$ entspricht $\langle L_C^* \rangle$.

In der zweiten Reihe von Abb. 3-16 wurde der Cholesterinanteil auf $X_{\text{Chol}} = 0.2$ erhöht. Der Zusatz von Cholesterin sorgt für einen deutlichen Unterschied der Kettenlängen von POPC und PSM der bei 20 °C 3.6 Å beträgt. Dieser Unterschied macht deutlich, dass die zugehörigen Daten für die betreffenden Lipide offensichtlich in stark unterschiedlichen Phasen gesammelt wurden. In diesem Bereich sind die Unterschiede der Acylketten eindeutig gross genug um für laterale Entmischung des

Membransystems zu sorgen. Interessanterweise sind die Absolutwerte für $\langle L_C^* \rangle$ von POPC- d_{31} mit 13.1 Å bei 20 °C (Tab. 3-18) in einer ternären Mischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ deutlich niedriger als in der binären Mischung von POPC- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (13.8 Å) ohne Sphingomyelin. Gleichzeitig weist PSM- d_{31} in der ternären Mischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ bei 20 °C für $\langle L_C^* \rangle$ einen Wert von 16.9 Å (Tab. 3-17) auf, der leicht erhöht ist gegenüber dem Wert der binären Mischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ ohne POPC (16.7 Å, Tab. 3-15). Dies spricht für eine Umverteilung des Cholesterins von der POPC- in die

	$T/^\circ\text{C}$	$D_c/\text{Å}^a$	$\langle A \rangle/\text{Å}^2{}^b$	$\alpha_{ }/10^{-3}\text{K}^{-1}{}^c$	$\alpha_{\perp}/10^{-3}\text{K}^{-1}{}^d$	$L_C^*/\text{Å}{}^e$	$L_C/\text{Å}{}^f$
PSM- d_{31} /POPC 1:1	20	16.5	26.3	-3.2	4.4	13.6	15.4
	30	15.9	27.6	-3.0	4.3	13.2	15.0
	45	15.4	29.1	-2.2	3.2	12.8	14.4
	60	14.9	30.3	-1.6	1.9	12.4	14.0
$X_{\text{Chol}}=0.20$	20	19.5	22.3	-4.6	5.8	16.7	19.1
	30	17.9	24.5	-5.8	6.8	15.3	17.5
	45	17.1	26.2	-3.9	5.2	14.4	16.4
	60	16.3	28.0	-1.5	2.5	13.7	15.4
$X_{\text{Chol}}=0.33$	20	19.4	22.4	-1.5	2.7	16.4	18.8
	30	19.0	23.2	-2.4	3.6	16.0	16.0
	45	18.2	24.6	-3.6	4.7	15.2	15.2
	60	17.2	26.5	-3.3	4.6	14.7	14.7
$X_{\text{Chol}}=0.5$	20	19.5	22.3			16.2	18.4
	30	19.4	22.7			16.0	18.1
	45	19.0	23.6	-1.3	2.4	15.6	17.7
	60	18.6	24.5			15.4	17.3

Tab. 3-17 Tabellarische Auflistung der strukturellen Ergebnisse für ternäre Mischungen mit PSM- d_{31} als deuterierte Sonde. ^aHydrophobe Dicke einer Acylkette, ^bMittlere Fläche pro Lipid, ^cisobarer thermischer Expansionskoeffizient parallel zur Membranflächennormale, ^disobarer thermischer Expansionskoeffizient senkrecht zur Membranflächennormale, ^eMittlere Kettenlänge von C3 bis C15, ^fAngenäherte mittlere Kettenlänge von C2 bis C16

Sphingomyelin-reiche Phase, vermutlich auf Grund einer präferentielle Interaktion des Cholesterins mit dem Sphingomyelin. Eine Temperatursteigerung sorgt hier

jedoch für eine Abnahme der Unterschiede in den Kettenlängen. So sinkt die Differenz der Gesamtkettenprojektion bei 40 °C auf 1.8 Å und bei 60 °C auf 1.6 Å. Vermutlich wird hier die präferentielle Interaktion des Cholesterins mit dem Sphingomyelin durch die gesteigerte thermische Energie des Systems aufgehoben.

In der dritten Reihe von Abb. 3-16 ist der Cholesterinanteil in der ternären Mischung schliesslich auf $X_{\text{Chol}} = 0.33$ erhöht. Die weitere Erhöhung des Cholesterinanteils führt zu einer Angleichung der Kettenprojektionsprofile für beide Lipide in ternären Mischungen. Die Palmitoylkette von POPC- d_{31} und PSM- d_{31} ist bei niedrigen

	$T/^\circ\text{C}$	$D_c/\text{Å}^a$	$\langle A \rangle/\text{Å}^2^b$	$\alpha_{ }/10^{-3}\text{K}^{-1}^c$	$\alpha_{\perp}/10^{-3}\text{K}^{-1}^d$	$L_C^*/\text{Å}^e$	$L_C/\text{Å}^f$
EYSM/POPC- d_{31} 1:1							
$X_{\text{Chol}}=0$	20	14.8	29.3	-1.7	2.9	12.3	13.7
	30	14.6	30.2	-2.8	4.0	12.0	13.4
	45	13.9	32.3	-3.3	4.4	11.3	12.7
	60	13.3	34.2	-1.8	2.9	10.6	11.8
$X_{\text{Chol}}=0.20$	20	15.8	27.5	-3.0	0.1	13.1	14.6
	30	16.0	27.6	2.6	-1.4	13.0	14.6
	45	15.7	28.5	-3.0	4.2	12.5	14.1
	60	15.0	30.4	-5.0	6.1	12.1	13.6
$X_{\text{Chol}}=0.33$	20	19.2	22.6	-1.7	2.8	16.0	18.2
	30	18.8	23.4	-3.0	4.2	15.5	17.6
	45	17.7	25.3	-4.8	5.9	14.4	16.2
	60	16.5	27.6	-4.1	5.4	13.6	15.3
$X_{\text{Chol}}=0.5$	20	19.3	22.4			15.7	17.6
	30	19.1	22.9			15.5	17.4
	45	18.4	24.3	-1.7	2.8	14.9	16.7
	60	17.9	25.5			14.3	15.9

Tab. 3-18 Tabellarische Auflistung der strukturellen Ergebnisse für ternäre Mischungen mit POPC- d_{31} als deuterierte Sonde. ^aHydrophobe Schichtdicke einer Acylkette, ^bMittlere Fläche pro Lipid, ^cisobarer thermischer Expansionskoeffizient parallel zur Membranflächennormale, ^disobarer thermischer Expansionskoeffizient senkrecht zur Membranflächennormale, ^eMittlere Kettenlänge von C3 bis C15, ^fAngenäherte mittlere Kettenlänge von C2 bis C16

Temperaturen beinahe identisch, erst bei sehr hohen Temperaturen (60 °C) macht sich eine Differenz von 1.1 Å bemerkbar (Tab. 3-17, Tab. 3-18). In dieser ternären Membran scheinen POPC und Sphingomyelin eine gleich geordnete Umgebung zu erfahren, was für eine homogene Verteilung der drei Lipide innerhalb der Membran spricht. Die letzte Erhöhung des Cholesterinanteils auf $X_{\text{Chol}} = 0.5$ bringt nur wenig Veränderung (Abb. 3-16, vierte Reihe). Die maximale Streckung der Acylketten verändert sich für Sphingomyelin von 19.4 Å auf gerade einmal 19.5 Å und von 19.2 Å auf 19.3 Å für POPC (Tab. 3-17, Tab. 3-18, beide 20 °C). Insgesamt ist die Empfindlichkeit der Membranparameter mit steigender Temperatur für beide Lipide geringer, was auch durch die kleinen thermischen Expansionskoeffizienten für beide Lipide über den gesamten Temperaturbereich (Tab. 3-17, Tab. 3-18) zum Ausdruck kommt. In dem Temperaturbereich von 20-60 °C ist da mit kein Phasenübergang in der homogenen Mischung der drei Lipide vorhanden.

Die halblogarithmische Auftragung der hydrophoben Schichtdicke D_C und mittleren Fläche pro Acylkette $\langle A \rangle$ gegen die Temperatur liefert direkte Information über die Existenzbereiche von Ein- oder Mehrphasenregionen. In der binären Mischungen der Lipide POPC und Sphingomyelin (Abb. 3-17 A und E) zeigen sich direkt die Unterschiede in der Ausdehnung beider Lipide innerhalb der Membran. Auf Grund der Differenzen in den Absolutwerten für die Ausdehnung parallel und senkrecht zur Membranflächennormalen kann in diesen Mischungen davon ausgegangen werden, dass sich kleinere laterale Domänen von POPC-reichen und Sphingomyelin-reichen Arealen in der Membran ausbilden. Dies sollte auch oberhalb von 25 °C, der Temperatur unterhalb derer Subspektren verschiedener Phasen detektierbar werden (Abb. 3-6), stattfinden, wenn auch die Domänengröße deutlich kleiner sein sollte. Eine Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.20$ (Abb. 3-17 B und F) sorgt hier erneut für eine Verstärkung der Unterschiede. Besonders unterhalb von 35 °C setzt hier ein deutlicher Phasenübergang ein, der sich im Fall von PSM- d_{31} /POPC durch eine sprunghafte Verkleinerung von $\langle A \rangle$ bzw. Vergrößerung für D_C für die Sphingomyelinkomponente bemerkbar macht. Bei derselben Temperatur setzt in der Mischung EYSM/POPC- d_{31} eine entgegengesetzte Veränderung der physikalischen Parameter ein, ein eindeutiges Zeichen für eine klare Separation von Membrankomponenten mit unterschiedlichen Schichtdicken.

Erhöhung des Cholesteringehalts auf einen Molenbruch von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-17 C und G) führt zu einer Annäherung beider berechneter Parameter für PSM- d_{31} und POPC- d_{31} . In niedrigen Temperaturbereichen (15-40 °C) sind die Kurvenverläufe und Absolutwerte für PSM- d_{31} /POPC und EYSM/POPC- d_{31} beinahe identisch, eine

**Hydrophobe
Schichtdicke und
mittlere Fläche für
binäre Mischungen**

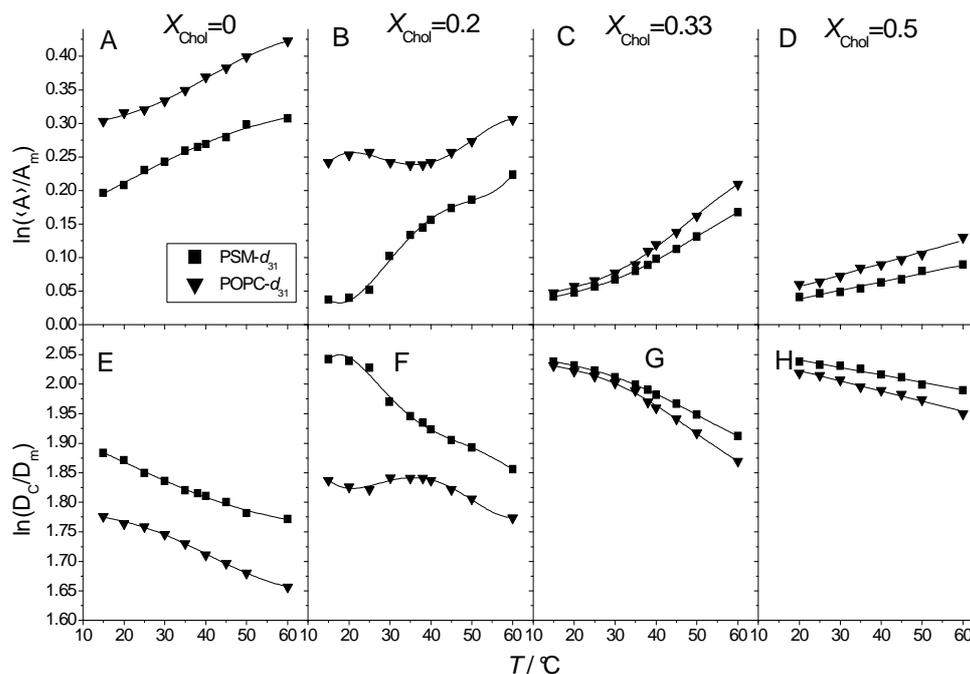


Abb. 3-17 Halblogarithmische Auftragung der mittleren Fläche pro Acylkette (A-D) und hydrophobe Schichtdicke (E-H) normiert auf die maximale Fläche $\langle A_M \rangle$ bzw. Dicke D_M , von PSM- d_{31} /POPC (■) und EYSM/POPC- d_{31} (▼) jeweils 1:1 für verschiedene Cholesterinanteile. Abgebildet sind die Daten für reine Lipide (A und E), Lipide mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (B und F), Lipide mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (C und G), sowie Lipide mit $X_{\text{Chol}} = 0.5$ (D und H).

starker Hinweis auf die homogene Mischung beider Lipide. Wieder zeigt sich jedoch für die Mischung von EYSM/POPC- d_{31} eine stärkere Temperaturabhängigkeit der Acylkettenparameter bei hohen Temperaturen (ab 50 $^\circ\text{C}$), die zu teilweiser lateraler Entmischung führen sollten. Die letzte Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.5$ nivelliert die Unterschiede zwischen dem Sphingo- und dem Glycerolipid weiter. Die Absolutwerte für PSM- d_{31} /POPC und EYSM/POPC- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.5$ unterscheiden sich zwar etwas stärker als im Falle von $X_{\text{Chol}} = 0.33$, dies liegt aber vermutlich an der früheren Sättigung des ordnenden Effektes von Cholesterin für POPC, auf Grund dessen eine Steigerung der Ordnung bei Erhöhung des Cholesterinanteils von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ auf $X_{\text{Chol}} = 0.5$ nicht mehr möglich ist. Im Falle von PSM scheint noch eine leichte Steigerung möglich zu sein. Die Kurvenverläufe hingegen, sind über den gesamten Temperaturverlauf von 20-60 $^\circ\text{C}$ linear und beinahe parallel für beide Lipide, ein Anzeichen für eine homogene l_0 -Phase in diesem Temperaturbereich.

3.1.5 Relaxationszeitmessungen in ternären Membranen

In der ^2H -NMR-Spektroskopie von Lipidmembranen können die gemittelten Strukturcharakteristika der beteiligten Kohlenstoffsegmente über die bereits vorgestellten Ordnungsparameter gemessen werden. Um die mikromechanischen Eigenschaften des Einflusses von Cholesterin in ternären Membranmischungen zu bestimmen sind neben den strukturellen Daten allerdings noch dynamische Informationen über das System notwendig. Diese dynamische Information ist über eine Messung der ^2H -NMR Spin-Gitter Relaxationszeiten T_{1Z} (Abb. 3-18), bzw. die Spin-Gitter Relaxationsrate R_{1Z} , bei verschiedenen Temperaturen zugänglich. Die zu jedem Kohlenstoffsegment korrespondierenden Spin-Gitter Relaxationsraten R_{1Z} hängen dabei sowohl von den Amplituden als auch von Autokorrelationszeiten der Fluktuationen der Kohlenstoffsegmente ab. Die Kombination beider Parameter stellt daher eine elegante Möglichkeit dar, ein zusammenhängendes Bild der kollektiven Bewegungen der einzelnen Membrandomänen zu erhalten.

Allgemeine Bemerkungen zur Relaxationszeitmessung

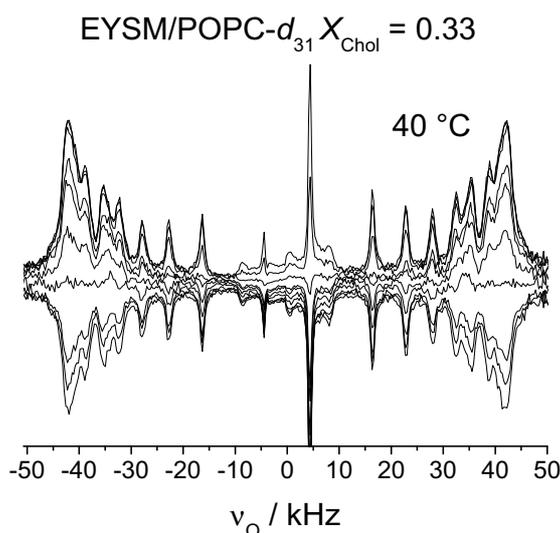


Abb. 3-18 Beispielspektren für eine Relaxationmessreihe. Abgebildet sind die Spektren von EYSM/POPC- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ bei 40 °C . Die Membran wurde unorientiert gemessen und die Spektren für diese Abbildung De-Paked ($\theta = 0^\circ$). Verzögerungszeiten waren 0.01, 5, 10, 30, 50, 100, 200, 400 und 800 ms.

Die inverse Relaxationszeit, die Spin-Gitter Relaxationsrate R_{1Z} , ist in Abb. 3-19 gegen die Kohlenstoffsegmentposition aufgetragen. In Abb. 3-19 A-C sind die Relaxationszeiten für PSM- d_{31} /POPC mit verschiedenen Zusätzen von Cholesterin abgebildet. Die Relaxationsraten sinken stufenweise mit dem Zusatz von Cholesterin. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der höheren Steifigkeit der Lipiddoppelschicht, welche die Relaxation durch kollektive Bewegungen der Membran behindert [186].

Relaxationsprofile von ternären Mischungen

Die einzige Ausnahme kann in Abb. 3-19 B im Vergleich mit C beobachtet werden. Hier führt die Erhöhung der Cholesterinkonzentration von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ auf $X_{\text{Chol}} = 0.33$ bei 20 °C zu einer Erhöhung der Relaxationsrate, was wahrscheinlich auf die teilweise Ausbildung einer s_0 Phase bei $X_{\text{Chol}} = 0.2$ zurückzuführen ist, die durch die weitere Cholesterinzugabe unterdrückt wird. Diese s_0 Phase sollte eine noch höhere Steifigkeit als die l_0 Phase aufweisen und daher weniger Möglichkeiten zur Relaxation liefern.

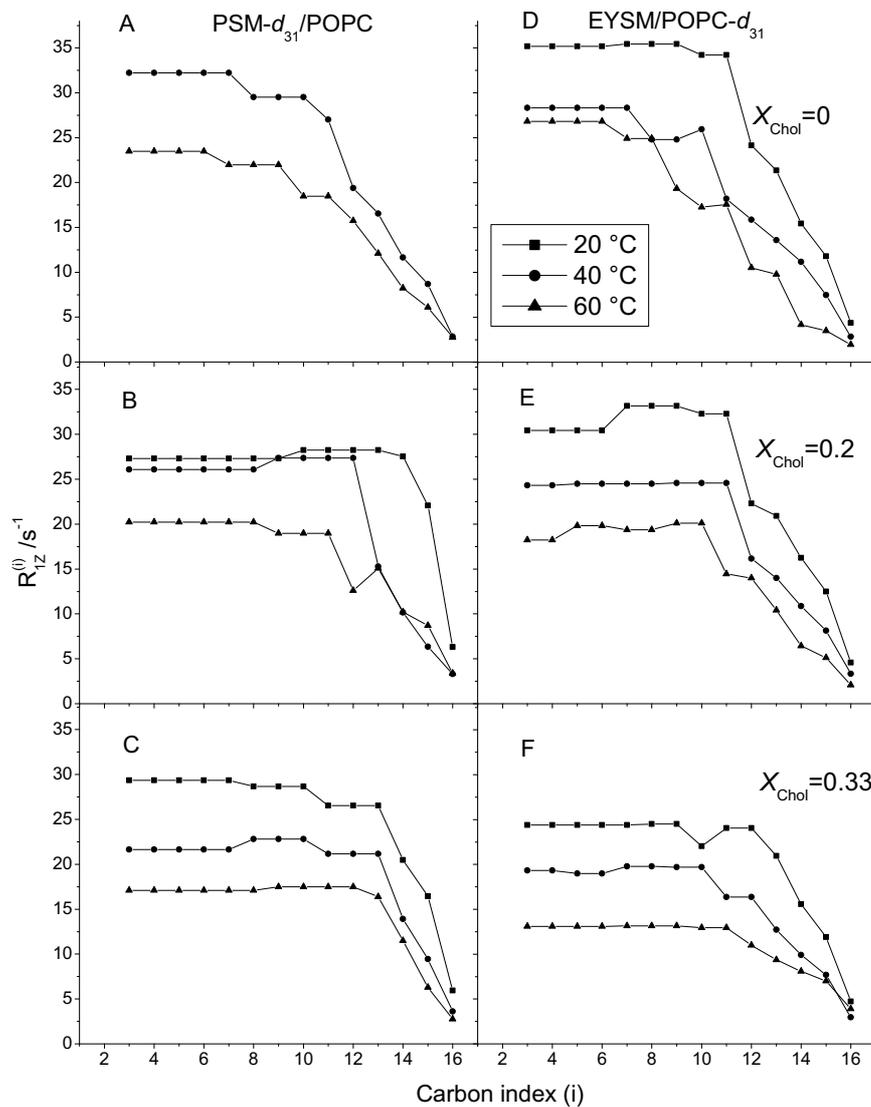


Abb. 3-19 Spin-Gitter-Relaxationsraten von PSM- d_{31} /POPC (A-C) und EYSM/POPC- d_{31} (D-F) in Abhängigkeit von der Acylkettensegmentposition mit Zusatz von verschiedenen Cholesterinkonzentrationen (A und D: $X_{\text{Chol}} = 0$; B und E: $X_{\text{Chol}} = 0.2$; C und F: $X_{\text{Chol}} = 0.33$).

Zusätzlich kann noch bemerkt werden, dass die Abnahme der Relaxationraten mit Acylkettenposition nicht so schnell abnimmt wie dies im Fall der Ordnungsparameter der Fall ist. So ähneln sich die Relaxationsraten für die Positionen 3-12 in den

meisten Fällen sehr stark, für die Ordnungsparameter ist dies jedoch meist nur für die Segmente in direkter Nachbarschaft der Wassergrenzfläche (ca. 2-7) der Fall.

Für EYSM/POPC- d_{31} , abgebildet in Abb. 3-19 D-F, ergibt sich ein leicht anderes Bild. Wieder spiegeln sich zwar die Charakteristika der Ordnungsparameterprofile in den Relaxationsprofilen wider, mit Ausnahme des Effektes der Addition von Cholesterin, die Temperaturabhängigkeit von R_{1Z} ist allerdings stärker ausgeprägt als im Fall von PSM- d_{31} /POPC. Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass die Relaxationsprofile für EYSM/POPC- d_{31} mit $X_{\text{Chol}} = 0$, siehe Abb. 3-19 D, sich stark von denen in Abb. 3-19 A, die PSM- d_{31} /POPC zeigen, unterscheiden. Diese Unterschiede in der Acylkettenbeweglichkeit können für den gesamten Temperaturbereich von 20-60 °C beobachtet werden, ein eindeutiges Anzeichen für unterschiedliche Dynamiken der Lipidumgebung. Auch nach Zusatz von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ Cholesterin (Abb. 3-19 E) ist dies der Fall, bei höheren Temperaturen scheinen die Werte für R_{1Z} von PSM- d_{31} /POPC und EYSM/POPC- d_{31} allerdings besser übereinzustimmen, was für einen gemeinsamen Modus der Bewegung spricht. In Abb. 3-19, welche die höchste Cholesterinkonzentration von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ für EYSM/POPC- d_{31} zeigt, stimmen die Relaxationsprofile erneut mit denen für PSM- d_{31} /POPC überein, was eine homogene Dynamik der gesamten Membran widerspiegelt. Wieder muss allerdings angemerkt werden, dass auch in EYSM/POPC- d_{31} der Parameter R_{1Z} erst sehr spät eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Segmentposition zeigt und teilweise sogar einen leichten Anstieg mit der Segmentposition verzeichnet, wie z.B. in Abb. 3-19 E bei 20 °C für die Positionen 7-11 beobachtet werden kann.

Da vorangegangene Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brown an der University of Arizona, an der die Relaxationszeitmessungen angefertigt wurden, eine lineare Abhängigkeit der Relaxationsraten von dem Quadrat der korrespondierenden Ordnungsparameter offenbart haben [187][188][189], wurde nun versucht die Daten weiter auf diese Beziehung zu untersuchen. Während die physikalischen Ursachen für dieses Phänomen immer noch debattiert werden, konnte dieses Verhalten für eine breite Variation von Lipidzusammensetzungen gezeigt werden, was dafür spricht, dass dies eine intrinsische Eigenschaft von Lipidmembranen ist. Diese sogenannten „square-law“ Diagramme sind in Abb. 3-20 für PSM- d_{31} /POPC (■) und EYSM/POPC- d_{31} (▼) bei verschiedenen Cholesterinkonzentrationen von 20-60 °C abgebildet.

Die PSM- d_{31} /POPC (■) Mischungen mit verschiedenen Mengen Cholesterin bei 60 °C (Abb. 3-20 A-C) zeigen eine zunehmende Abflachung der Steigung der linearen

Funktionelle Abhängigkeit von Ordnung und Rel- axationsprofilen

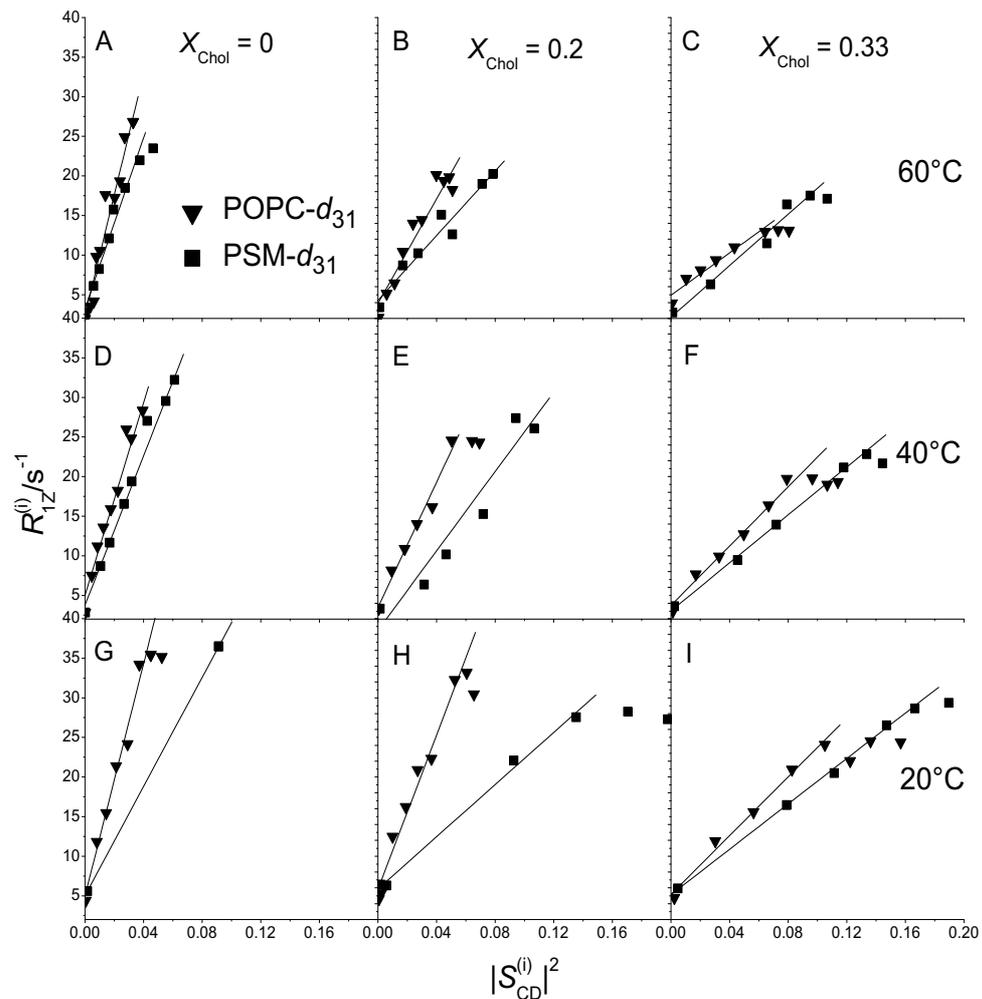


Abb. 3-20 Quadratische Abhängigkeit der Rate $R_{1Z}^{(i)}$ von $|S_{CD}^{(i)}|^2$ für PSM- d_{31} /POPC (■) und EYSM/POPC- d_{31} (▼) bei den Temperaturen 20, 40 und 60 °C für die Cholesterinmolenbrüche $X_{Chol} = 0$, $X_{Chol} = 0.2$ und $X_{Chol} = 0.33$. Die Daten sind für unorientierte Proben gemessen und wurden für die Berechnung de-Paked ($\theta = 0^\circ$).

Abhängigkeit, was mit einer Veränderung der elastischen Eigenschaften der Membran assoziiert wurde [187][172][190]. Eine Abnahme der Steigung wurde hierbei mit einer erhöhten Biegesteifigkeit der Membran assoziiert, was bei einer Zugabe von Cholesterin zu erwarten ist und auch schon in makroskopischen Studien von Lipidschichtfluktuationen gezeigt werden konnte [186]. Zusätzlich muss noch bemerkt werden, dass die Steigung in der Mischung PSM- d_{31} /POPC mit $X_{Chol} = 0.2$ (Abb. 3-20 B) bei diesen hohen Temperaturen fast identisch ist mit der Steigung für $X_{Chol} = 0.33$ (Abb. 3-20 C), was darauf hinweist, dass beide Membranen sehr ähnliche mechanische Eigenschaften besitzen, zumindest auf einer mesoskopischen Skala. In Abb. 3-20 D-F wurden die Mischungen auf 40 °C abgekühlt. Die Steigung der quadratischen Abhängigkeit ist von dieser Temperaturveränderung kaum

betroffen, was erwartet werden konnte, da sich die Lipide immer noch in derselben Phase befinden, deren mechanische Eigenschaften nicht allzu stark von der Temperatur abhängen sollten. Wieder ähneln sich ausserdem die Steigungen für PSM- d_{31} /POPC mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (Abb. 3-20 B) und $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-20 C) auch wenn ihre Steigungen etwas steiler werden. Bei 20 °C sind die Spektren für PSM- d_{31} /POPC ohne Zugabe von Cholesterin schliesslich auf Grund des Übergangs in eine s_0 Phase kaum noch aufgelöst, was eine Auswertung erschwert. Die beiden erhaltenen Datenpunkte sind der Vollständigkeit halber jedoch in Abb. 3-20 G abgebildet. Bei Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ bei dieser niedrigen Temperatur (Abb. 3-20 H) erhält man jedoch wieder aufgelöste Spektren deren quadratische Abhängigkeiten wieder Steigungen und damit Biegesteifigkeiten aufweisen, die einer l_0 Phase entsprechen.

Abb. 3-20 A-C zeigt hierbei die Daten für EYSM/POPC- d_{31} (▼) mit verschiedenen Cholesterinzusätzen bei 60 °C. Für $X_{\text{Chol}} = 0$ sowie $X_{\text{Chol}} = 0.2$ zeigen die steilen Steigungen der quadratischen Abhängigkeiten eine geringe Biegesteifigkeit an, was in Übereinstimmung mit der physikalischen Intuition ist, da durch die strukturellen Daten für diese Mischungen eine l_d Phase impliziert wurde, die mit ihrer geringeren Dicke weniger Energie zur Deformation benötigen sollte. Bei $X_{\text{Chol}} = 0.33$ sind allerdings die Steigungen für EYSM/POPC- d_{31} (▼) (Abb. 3-20 C) ähnlich den Daten für PSM- d_{31} /POPC (■), Dies deutet wiederum auf die gute Mischbarkeit beider Lipide und damit gemeinsame mechanische Eigenschaften bei hohen Cholesterinkonzentrationen hin. Anzumerken ist ausserdem, dass die Abhängigkeiten der Relaxationsrate vom Quadrat der Ordnungsparameter für $X_{\text{Chol}} = 0.33$ nur noch linear bei niedrigen Werten für den Ordnungsparameter sind und sich für höhere Werte asymptotisch einer bestimmten Relaxationsrate annähern. Das Verhalten der EYSM/POPC- d_{31} (▼) Membran bei verschiedenen Cholesterinzugaben setzt sich bei 40 °C (Abb. 3-20 D-F) fort. Auch hier zeigen die Mischungen mit $X_{\text{Chol}} = 0$ sowie $X_{\text{Chol}} = 0.2$ die Biegesteifigkeiten einer l_d Phase an. Die Mischung mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-20 F) zeigt hier wieder eine sich einem bestimmten Wert asymptotisch annähernde Abhängigkeit, deren Anfangssteigung jedoch mit den Daten für PSM- d_{31} /POPC (■) mit $X_{\text{Chol}} = 0.33$ übereinstimmt. Auch bei 20 °C (Abb. 3-20 G-I) zeigen sich keine Veränderungen für die verschiedenen EYSM/POPC- d_{31} (▼) Mischungen, mit den Charakteristika einer l_d Phase für $X_{\text{Chol}} = 0$ sowie $X_{\text{Chol}} = 0.2$ und denen einer l_0 Phase für $X_{\text{Chol}} = 0.33$. Offensichtlich gibt es in dem Temperaturbereich von 60-20 °C keinen ausgeprägten Phasenübergang für diese drei Mischungen.

3.1.6 Diskussion der Ergebnisse

Der Einfluss von Cholesterin auf Sphingomyelin

Wie in den Spektren leicht zuerkennen ist, unterdrückt die Zugabe von Cholesterin den Übergang von Sphingomyelin von der fluiden flüssig-kristallinen (l_d) in die Gelphase (s_o), abhängig von der Menge des zugegebenen Cholesterins über immer breitere Temperaturbereiche. Die Frage der Fluidität der zellulären Membran ist für alle Organismen von hoher Bedeutung. Von Bakterien und Hefen, Organismen deren physiologische Temperaturen mit der Aussentemperatur variieren, ist z.B. bekannt, dass sie die Fettsäurezusammensetzung ihrer zellulären Membranen mit der Temperatur verändern um gleichbleibende Membranfluidität zu gewährleisten [191][192][193][194]. Offensichtlich ist eine gleichbleibende laterale Diffusion innerhalb der Membran bei unterschiedlichen Temperaturen eine wichtige Voraussetzung für vitale Zellfunktionen. Da sich die Diffusionskonstante um ca. zwei Größenordnungen während eines l_d zu s_o Phasenüberganges ändert [177], ist eine Unterdrückung des Phasenüberganges für alle Zellen von essentieller Bedeutung.

In höheren eukaryontischen Organismen übernehmen grosse Mengen Cholesterin (bis zu 50 mol% Lipidanteil, [174][175]) die Aufgabe eine bei variierenden Temperaturen gleichbleibende Fluidität zu gewährleisten. Das Sterin erreicht dieses durch seine flache und starre Ringstruktur, die einen ordnenden Effekt auf die Konformation benachbarter aliphatischer Ketten aufweist, ohne dabei die translationale Beweglichkeit der beteiligten Lipide zu beeinflussen. Da Cholesterin nicht genau in das angestrebte Kristallgitter einer normalerweise unterhalb T_m erhaltenen s_o Phase passt, stört es stark die kristalline translationale Ordnung ohne dabei die konformationelle Ordnung zu beeinflussen. Dies führt zur Umwandlung von l_d oder s_o Phasen in eine l_o Phase, deren laterale Diffusionskoeffizienten meist nur um den Faktor 2-3 unter denen für l_d Phasen erhaltenen liegen [195]. Die Unterdrückung des Phasenüberganges ist hierbei nicht nur für die Stabilisation der lateralen Diffusion sondern auch für die Permeabilität der erhaltenen Membran von zentraler Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass die Durchlässigkeit einer Membran für Natrium-Ionen am Phasenübergang auf Grund von starken Dichteschwankungen am höchsten ist [196].

Dies ist gerade für Lipide wie Sphingomyelin interessant. Das Sphingosinrückgrat des Sphingomyelins mit seiner über ein Amid gebundenen Acylkette ist zum einen sehr viel polarer im Grenzflächenbereich als vergleichbare Glycerophospholipide, zum anderen enthält es sowohl Gruppen die als Wasserstoffbrückendonoren wie auch als Akzeptoren fungieren können. Dies führt zu einer ausgeprägt hohen Phasenübergangstemperatur, die in der Nähe der physiologischen Temperatur von 37 °C liegt. Wie direkt in den Ergebnissen von Abschnitt 3.1.1 und Abb. 3-15 zu sehen ist, wird der

Phasenübergang von l_d zu s_o durch stufenweise Zugabe von Cholesterin sukzessive unterdrückt. Dies erfolgt effektiv schon ab einem Cholesterinmolenbruch von $X_{\text{Chol}} = 0.2$, wobei zwar der Phasenübergang von l_d zu s_o komplett unterdrückt wird, ein Phasenübergang von der Mischung von l_d und l_o zu einer reinen l_o Phase jedoch weiterhin von 45-30 °C besteht. Ein Molenbruch von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ ist dann allerdings vollkommen ausreichend, um Sphingomyelin über den gesamten Temperaturbereich in eine l_o Phase zu bringen.

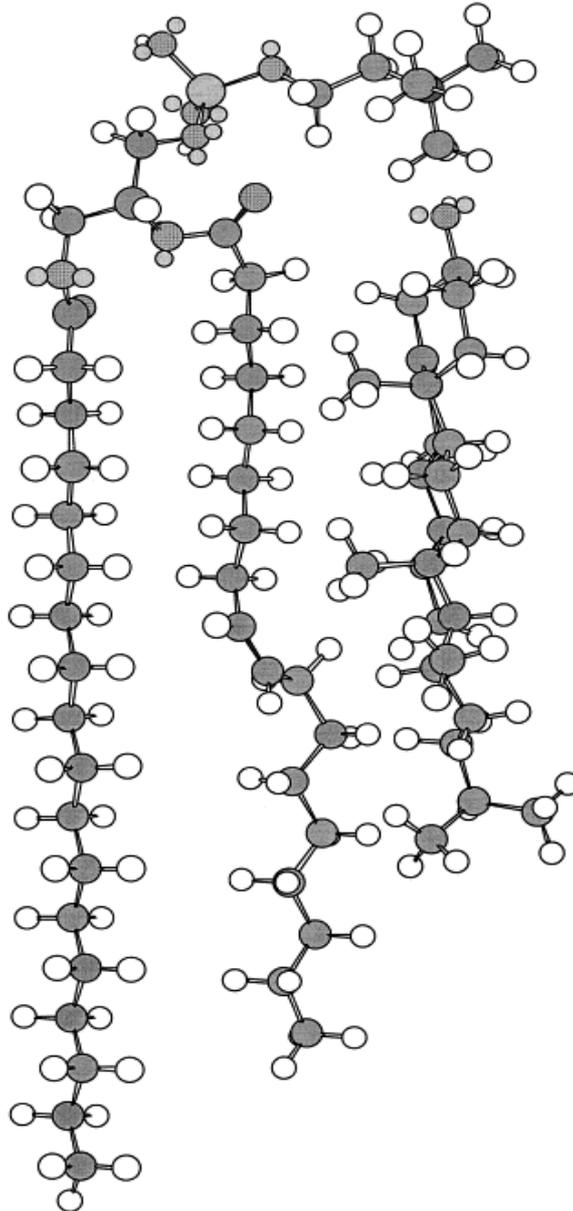


Abb. 3-21 Ein „ball & stick“ Modell von POPC und Cholesterin und deren ungefähre Orientierung in der Membran nach Ohvo-Rekila *et al.* [197]. Die 3β -Hydroxyfunktion wird hierbei als zum Wasser-Interface hin orientiert angenommen, während die bewegliche iso-Oktylkette auf das Membraninnere gerichtet ist.

Schaut man sich die Veränderung der strukturellen Parameter für Sphingomyelin

(Abb. 3-5, Abb. 3-13) an, findet man auch hier, dass Sphingomyelin sehr empfindlich auf die Zugabe von Cholesterin reagiert. So steigt die Kettengesamtprojektionen und die hydrophobe Schichtdicke schon nach Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ auf Werte die mit einer Gelphase vergleichbar sind, zumindest bei Temperaturen unterhalb von 45 °C. Auch das Ordnungsparameterprofil gleicht sich mehr und mehr der Ordnung einer Gelphase an, wobei Cholesterin hier vor allem auf den Interfacebereich wirkt, wo auch seine vornehmliche Position in der Membran vermutet wird [198][199][200], obwohl seine effektive Länge vermutlich vergleichbar mit einer all-*trans* Acylkette von 17 Kohlenstoffatomen ist [201]. Da jedoch die flexible Sterinseitenkette, die auf Grund der Orientierung der 3 β -Hydroxylgruppe zu der polaren Kopfgruppe der Lipide in die Richtung der Membranmitte orientiert ist (Abb. 3-21), wird das Methylende der Phospholipide nicht so stark geordnet wie die ersten 8-10 Kohlenstoffatome der Kette [202]. Zusätzlich führt die Zugabe von Cholesterin zu einer dichteren Packung der Lipide und einer Erhöhung der Schichtdicke (Tab. 3-15) was zusammen mit Unterdrückung des Phasenüberganges zu einer deutlichen geringeren Permeabilität der Membran führt. Dieser Effekt ist bei Sphingomyelin im Gegensatz zu anderen Lipiden [203] extrem stark ausgeprägt, vergleichbar höchstens mit Glycerophospholipiden mit langen, gesättigten Acylketten [204].

Der Einfluss von Cholesterin auf POPC

Der Einfluss von Cholesterin auf POPC zeigte sich in den Experimenten als stärker konzentrationsabhängig als im Falle von PSM. Dies äussert sich als schwächere Acylkettenordnung und geringerem Kondensationseffekt bei Zugabe einer mittleren Cholesterinkonzentration $X_{\text{Chol}} = 0.2$. Während in Sphingomyelin bei dieser Cholesterinkonzentration bereits eine l_o Phase induziert wurde, scheint in POPC zwar eine geordnetere Phase ausgebildet worden zu sein, diese entspricht allerdings nicht vollständig den Charakteristiken einer l_o Phase. Erst eine höhere Konzentration von Cholesterin bringt POPC in eine l_o Phase (Abb. 3-23). Dies könnte mehrere Ursachen haben. Ein Effekt der den schwächeren Ordnungseffekt erklären könnte, ist die aus MD-Simulationen bestimmte präferentielle Wechselwirkung der Cholesterinhydroxylgruppe mit dem Carbonylsauerstoff der Esterbindung der Oleylkette. Diese führt zu einer mittleren Neigung des Cholesteringerüsts von 34 ° gegenüber der Membranflächennormalen wenn es Wasserstoffbrücken mit POPC ausbildet. Dies steht im Gegensatz zu den 28 ° die für die Assoziation von Cholesterin mit Sphingomyelin errechnet wurden [205], was zu einer grösseren benötigten Fläche des POPC-Cholesterinkomplexes führen würde. Da damit ausserdem das steife Steringerüst des Cholesterins von den Acylketten des POPC weiter entfernt ist, wäre ein geringerer Ordnungseffekt des Cholesterins auf die Palmitinkette leicht zu erklären. Die durch die herausstehenden Methylgruppen „rauhe“ β -Seite des Cholesterins wäre in diesem Fall über die Wasserstoffbrücke mit der Oleylkette assoziiert. Die

„glatte“ α -Seite des Cholesterins, die laut MD-Simulationen bevorzugt mit gesättigten Seitenketten interagiert [46][47], wäre auf Grund der grösseren Neigung nicht mehr in der Lage benachbarte Palmitoylketten über hydrophobe Effekte in eine geordnete Konformation zu zwingen. Bei der höheren Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ scheint der Anteil des Cholesterins allerdings hoch genug zu sein, dass fast dieselbe Ordnung wie in einem PSM/Cholesterin-System eintritt, was auch bereits in anderen Studien beobachtet wurde [206]. Warum die in diesem Fall ganz offensichtlich eine bessere Packung der Lipide, mit stark kondensierter Fläche pro Lipid trotz der oben besprochenen Interaktion ausgebildet werden kann, konnte hier leider nicht geklärt werden.

In ternären Mischungen bietet das First-Order-Mean-Torque-Modell eine gute Möglichkeit Argumente für oder gegen die Mischbarkeit der verschiedenen Lipide zu finden. Wie durch Atomic Force Microscopy (AFM) in vergleichbaren Systemen beobachtet werden konnte [207][208], sollten die aus Sphingomyelin und Cholesterin bestehenden Mikrodomänen leicht durch ihre erhöhte Lipidschichtdicke im Vergleich zur umgebenden fluiden Phase bestimmbar sein. In der ^2H -NMR-Spektroskopie sollte dies direkt durch eine Veränderung des berechneten Parameters D_C , der die hydrophobe Dicke einer einzelnen Lipidschicht wiedergibt, für beide Lipide beob-

Ideale oder nicht-ideale Mischbarkeit von Sphingomyelin, POPC und Cholesterin

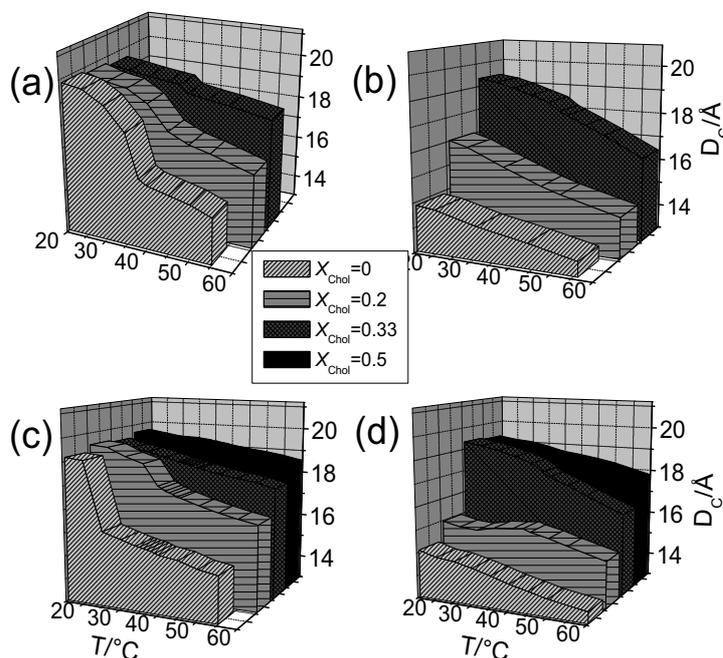


Abb. 3-22 Hydrophobe Schichtdicke als Funktion der Temperatur und des Cholesterinmolenbruchs, berechnet nach dem First-Order-Mean-Torque-Modell. (a) PSM- d_{31} ; (b) POPC- d_{31} ; (c) PSM- d_{31} /POPC; (d) EYSM/POPC- d_{31} .

achtbar sein, sollten sie sich vollständig in unterschiedlichen Phasen befinden. Weiterhin ist natürlich von Interesse, ob sich die Ergebnisse, die in binären Mischungen erhalten wurden, Vorhersagen für das Verhalten von ternären Mischungen erlauben. Dies sollte dann der Fall sein, wenn sich das beteiligte Cholesterin gleichmässig zwischen beiden Lipiden in den ternären Mischungen verteilt. Um diese Fragen zu beantworten, schauen wir noch einmal auf den Verlauf der hydrophoben Schichtdicke mit Temperatur und Cholesterinkonzentrationen für die verschiedenen Mischungen im direkten Vergleich an (Abb. 3-22). Wenn man nun das Verhalten der Lipide in binären Mischungen (Abb. 3-22 (a) und (b)) mit denen in ternären Mischungen (Abb. 3-22 (c) und (d)) vergleicht, fällt sofort auf, dass sich die Mischungen von Sphingomyelin und Cholesterin mit oder ohne POPC sehr ähneln, was für eine Gleichverteilung von Cholesterin zwischen beiden Lipiden spricht. Dies steht in Einklang mit Experimenten in ähnlichen Systemen mit hohem Cholesterinanteil mittels Pulsed-Field-Gradient-NMR, die zwar unterschiedliche laterale Diffusionskoeffizienten für Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) und Sphingomyelin in ternären Mischungen beobachteten, die dritte Komponente Cholesterin jedoch eine mittlere Diffusion zwischen beiden Phasen zeigte [178][209][210]. Ein Unterschied zeigt sich in der Abwesenheit von Cholesterin bei $X_{\text{Chol}} = 0$, bei dem der Phasenübergang von Sphingomyelin von ca. 38 °C auf 25 °C durch den Zusatz von POPC verschoben wurde, POPC hat also einen destabilisierenden Effekt auf die s_0

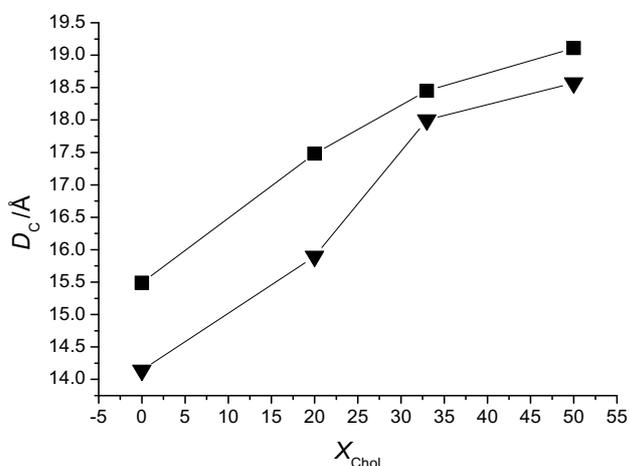


Abb. 3-23 Hydrophobe Schichtdicke gegen Cholesterinmolenbruch bei einer Temperatur von 40 °C für PSM- d_{31} /POPC (■) und EYSM/POPC- d_{31} (▼), berechnet nach dem First-Order-Mean-Torque-Modell. Zu sehen ist der stark unterschiedliche Verlauf des Einflusses von Cholesterin auf die beiden Lipide

Phase von Sphingomyelin. Das gleiche gilt für Mischungen von POPC mit Cholesterin, auch diese verhalten sich in An- oder Abwesenheit von Sphingomyelin sehr ähnlich, mit Ausnahme der binären Mischung von Sphingomyelin und POPC. Hier

hat Sphingomyelin einen ordnenden Effekt auf POPC (Abb. 3-15 vs. Abb. 3-17). Eine weitere wichtige Ausnahme stellt die Mischung von Sphingomyelin und POPC mit einer Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ dar. Oberhalb einer Temperatur von $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ sind die strukturellen Parameter der beiden membranbildenden Lipide in den binären Mischungen mit Cholesterin zwar denen der ternären Mischungen sehr ähnlich (Abb. 3-22), unterhalb von $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ergeben sich jedoch drastische Unterschiede. Die Werte der hydrophoben Dicke entwickeln sich dabei für Sphingomyelin in eine Richtung, die einer Mischung mit höherem Cholesterinanteil entspricht, während sich die Werte für POPC eher einer Mischung ohne Cholesterin annähern. Dies wird auch durch die Detektierbarkeit einer zweiten spektralen Komponente sichtbar, welche die Segregation von geordneten Sphingomyelin-reichen Lipidphasen widerspiegelt (Abb. 3-7). Offensichtlich kommt es in dieser mittleren Cholesterinmischung zu einer Umverteilung von Cholesterin von der POPC-Phase in die Sphingomyelin-Phase bei niedrigen Temperaturen, was die Phasenseparation weiter vorantreibt. Dies kann durch eine leicht höhere Affinität von Cholesterin für das Sphingolipid erklärt werden kann. Unterhalb von $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ reicht die thermale Energie des Systems offensichtlich nicht mehr aus um die niedrigere Bindungsenthalpie von Sphingomyelin und Cholesterin auszugleichen.

Wie bereits besprochen, liefert und die Relaxationsrate R_{1Z} Informationen über die Fluktuationsraten einer Membran, während die Ordnungsparameter eher ein Maß für die Fluktuationsamplituden sind [187][188][173]. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Diagramme von R_{1Z} gegen $|S_{\text{CD}}|^2$ eine sensitive Messung der elastischen Eigenschaften von Membrankomponenten über relativ kurze Zeitskalen erlauben. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen dabei, dass Membranen, in denen Phasenseparation auftritt vollkommen unterschiedliche Biegesteifigkeiten aufweisen. Dies sieht man besonders deutlich in Mischungen mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ (Abb. 3-20 B, E, H) in denen direkt unterschiedliche spektrale Komponenten detektiert werden konnten, was für Domänengrößen im Mikrometerbereich spricht. Die deutlichen Unterschiede in den Steigungen der „square-law“-Diagramme für POPC und Sphingomyelin und die damit stark unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der unterschiedlichen Lipidomänen, rechtfertigen hier das klassische Bild der „Lipid Rafts“ als kleine segregierte Lipidfraktionen von erhöhter Dicke und Steifigkeit die in einer Phase von sehr fluidem und niedrigviskosem Lipid „schwimmen“. Auch liefern die fast identischen Steigungen der Auftragungen von R_{1Z} gegen $|S_{\text{CD}}|^2$ in Mischungen mit einer Zugabe von $X_{\text{Chol}} = 0.33$ (Abb. 3-20 C, F, I) für beide Lipide weitere Unterstützung für die Vermutung, die Lipide seien an diesem Punkt des Phasendiagramms fast ideal gemischt. Da beide Lipide eine extrem hohe Biegesteifigkeit vereint und damit identische mechanische Eigenschaften ihrer direkten

Elastische Eigenschaften der separierten Phasen in einer PSM/POPC/Cholesterin-Membran

Membranumgebung, gibt es keinen Grund laterale Entmischung anzunehmen. Schwieriger wird der Fall erneut für die binäre Mischung von Sphingomyelin und POPC in Abwesenheit von Cholesterin (Abb. 3-20 A, D, G). Hier ähneln sich die mechanischen Eigenschaften stark, bis auf die Membranen bei 20 °C, was an sich für eine homogene Mischung beider Lipide spricht. Vergleicht man jedoch die aus dem Mean-Torque Modell erhaltenen strukturellen Daten beider Lipide, fallen grössere Differenzen in der Streckung der Acylketten beider Lipide auf. Man sollte jedoch bedenken, dass sich die betroffenen Lipide in einem sehr fluiden Zustand befinden, was bedeutet, dass die Acylketten sehr schnellen Isomerisierungsprozessen mit starken longitudinalen Auslenkungen unterliegen und ständig zwischen einer hohen Anzahl an Konformationen wechseln [211][212]. Diese durch die thermische Energie des Systems verursachten Effekte führen zu einer Unebenheit der Membranoberfläche mit einer breiten Wassergrenzfläche die bis zur Hälfte des Membrandurchmessers betragen kann [213]. Es kann so also leicht eingesehen werden, wie sich auch zwei strukturell unterschiedliche Lipide homogen in einer stark fluktuierenden Membran mischen können.

Es muss allerdings auch angemerkt werden, dass in Bereichen von hohen Cholesterinanteilen und niedrigen Temperaturen, Regionen erhöhter Biegesteifigkeit also, die Beziehung von R_{1Z} gegen $|S_{CD}|^2$ nicht mehr streng linear verläuft sondern sich einem bestimmten Wert asymptotisch annähert (Abb. 3-20 F, H und I). Man sollte dabei anmerken, dass für die quadratische Abhängigkeit beider Parameter in einem System verschiedenen Annahmen gerechtfertigt sein müssen [187][188][173]. Darunter sind vorallem: 1.: Die vollständige Trennung der Zeitskalen von relativ schnellen Fluktuationen und kollektiven Bewegungen der Membran. 2.: Eine uniforme Amplitude der relativ langsamen Bewegungen innerhalb der Kohlenwasserstoffregion der Lipiddoppelschicht. Diese Annahmen könnten natürlich für eine Membran, deren Lipide eine nur stark eingeschränkte Beweglichkeit aufweisen nicht zutreffen.

Schlussfolgerung für die Existenz von lateralen Domänen in zellulären Membranen

Obwohl Glycerophospholipide ausreichend für die Ausbildung von Lipiddoppelschichten sind [214], enthalten die meisten eukaryontischen Zellen Sphingolipide und Sterine als zusätzliche Membranbestandteile, jedes bereitgestellt durch aufwendige Biosynthese. Dieser anabole Aufwand wie auch die Häufigkeit dieser Lipidklassen in der Plasmamembran (typischerweise 30-40 mol% Cholesterin und 10-20% Sphingomyelin [182][183]) bringt natürlich die Frage nach dem evolutionären Nutzen und der Funktion dieser Bestandteile in der Membran auf. Die bisherige Annahme, dass der ordnende Effekt des Cholesterins auf Sphingomyelin und andere gesättigte Glycerophospholipide zu lateraler Phasenseparation und der Ausbildung von Mikro-

domänen mit abweichenden Strukturparametern führt, bedarf weiterer Untersuchungen da die Situation *in vivo* mit bis zu 1000 unterschiedlichen Lipidspezies [215] und bis zu 50% Membranproteinanteil weit zu komplex ist um direkt bestimmbar zu sein. Die strukturellen Eigenschaften von Sphingomyelin und die Phasenübergangstemperatur nahe der Körpertemperatur weisen darauf hin, dass sie eine wichtige Rolle in der Bildung funktionell bedeutender Membrandomänen, sogenannter „Lipid-Rafts“ [216], spielen könnten.

Die in dieser Dissertation gesammelten Daten geben einige interessante Informationen über den Effekt von Cholesterin auf die laterale Organisation in einer Membran aus einem partiell ungesättigten Glycerophospholipid und Sphingomyelin. Eine Mischung bestehend aus einem sehr fluiden ungesättigten, einem gesättigten Lipid und Cholesterin ist - trotz der erheblich komplizierteren Zusammensetzung biologischer Membranen - ein gut geeignetes System zur Untersuchung grundlegender biophysikalischer Membraneigenschaften [217]. Interessanterweise hat Cholesterin zwei verschiedene Funktionen in unserer Modellmembran. Bei niedrigen Konzentrationen führt es zu einer grösseren Differenz der hydrophoben Länge der Acylketten der beteiligten Lipide wodurch laterale Phasenseparation gefördert wird. Bei hohen Konzentrationen wirkt das Sterin jedoch als Lösevermittler zwischen den beiden strukturell unterschiedlichen Lipiden und sorgt für eine homogene, stark geordnete Membran deren Ordnung für beide Lipide sich bis zu einem Cholesterinanteil von 50 mol% erhöht. Diese Variation des Cholesterineffektes ist insofern interessant, als andere Sterine, die in niederen Organismen vorkommen, wie Lanosterin oder Ergosterin, nur bis zu einem Sterinanteil von 25 mol% zu einer Steigerung der Acylkettenordnung bei POPC- d_{31} führen [206]. Die Sättigungseigenschaften scheinen daher ein Charakteristikum eines bestimmten Lipids in Wechselwirkung mit einem bestimmten Sterin zu sein. Diese bessere Interaktion von Cholesterin mit ungesättigten Seitenketten wird wahrscheinlich auf Grund seiner etwas flexibleren Seitenkette, im Vergleich zu Ergosterin, oder seine nicht methylierte α -Seite, im Vergleich zu Lanosterin, ermöglicht. Dies wurde bereits für Membranen bestehend aus 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) gezeigt, auf welche, im Gegensatz zu DPPC Membranen, der Zusatz von Cholesterin einen geringere Ordnungseffekt hatte als Ergosterin [218]. Ausserdem wurde für Cholesterin im Vergleich zu Lanosterin und Ergosterin eine weit höhere longitudinale Mobilität zwischen den einzelnen Schichten der Lipiddoppelschicht festgestellt [219], was für eine weitere mögliche Rolle von Cholesterin als Lösevermittler zwischen Lipiden innerhalb und zwischen den Lipideinzelschichten spricht.

Wenn wir die Differenz der hydrophoben Länge der Acylketten als treibende Kraft hinter Phasenseparationsphänomenen ansehen, wird im Normalfall angenommen,

dass sich das Sterin ungleich zwischen den beiden Phasen verteilt. Mit Hilfe der dieser Dissertation zu Grunde liegenden Daten konnte gezeigt werden, dass diese Annahme nicht benötigt wird. Zusätzlich zeigten im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Messungen mit perdeutertem Cholesterin, die bereits publizierte Daten bestätigten [220], dass Cholesterin in SM/POPC/Cholesterin 2:2:1 Mischungen im Gegensatz zu den Acylketten der anderen beiden Lipide eine Ordnung aufweist, die zwischen den gemessenen Daten einer PSM/Cholesterin und einer POPC/Cholesterin Membran liegen. Dies ist in Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten NMR-Messung in vergleichbaren Systemen [178], die mittels Magnetfeldgradienten für Cholesterin einen schnellen Austausch (zumindest auf der NMR-Zeitskala die von Milli- bis Mikrosekunden reicht) zwischen den Domänen feststellen konnten. Es muss hierbei allerdings angemerkt werden, dass die betreffenden Messungen keine Aussage über SM/POPC-Membranen mit mittleren Cholesterinkonzentrationen von $X_{\text{Chol}} = 0.2$ und bei niedrigen Temperaturen machen, die Bereiche also in denen in den hier gezeigten Messungen eine Präferenz von Cholesterin für Sphingomyelin über POPC gezeigt werden konnte.

Nachdem die Phasenseparation, mit deutlich bestimmbar Subspektren innerhalb der NMR-Zeitskala, hauptsächlich in Bereichen von mittleren Cholesterinkonzentrationen beobachtbar war, ist es wahrscheinlich, dass die Domänenausmessungen bei mittleren Cholesterinkonzentrationen am stabilsten und grössten sind. Wenn man diese Ergebnisse nun mit dem hohen Cholesteringehalt von manchen biologischen Membranen vergleicht (bis zu 50 mol%), scheint es unwahrscheinlich, dass in jenen Membranen *in vivo* tatsächlich kleinere Partitionen von l_o Domänen in einer ansonsten komplett segregierten l_d Phase treiben. Dabei wird natürlich der mögliche Einfluss der Diffusionshinderung durch die mit dem Zytoskelett verbundenen Membranproteine sowie die asymmetrische Verteilung der Lipide zwischen den einzelnen Schichten vernachlässigt. Zusätzlich konnte in Modellmembranen gezeigt werden [169][221][222][223][224], dass für solche Domänen Gibbs-Energien, gemessen werden, die sich Bereich von -850 bis +850 J/mol für die einzelnen Wechselwirkungen der Lipide untereinander bewegen. Dies ist sehr viel geringer als die sich im kJ/mol bewegenden Gibbs-Energien die für Protein-Lipid-Wechselwirkungen erhalten werden. Ein bedeutende Rolle in Hinsicht auf Domänenbildung muss daher auch den Membranproteinen zugeschrieben werden, die bei den hier zu Grunde liegenden Betrachtungen vereinfachend weggelassen wurden. Offensichtlich müssen noch weitere, detailliertere Informationen über das komplexe Zusammenspiel von Lipiden und Membranproteinen gesammelt werden, um die Frage nach der lateralen Organisation der Plasmamembran zu beantworten.

3.2 Wechselwirkung von alpha-Synuclein mit Lipidvesikeln

Da in vorhergehenden Arbeiten [136][137] die Bindung von α -Synuclein (α S) an Lipidvesikel und die damit einhergehende α -helikale Faltung und Stabilisierung der Vesikelmembran bestimmt wurde, sollte nun näher bestimmt werden, welche Teile des Proteins für die verschiedenen Lipid-Wechselwirkungen von Bedeutung sind. Dafür wurden zunächst Fragmente von 25 bis 28 Aminosäuren Länge gewählt. Dies schien eine adäquate Grösse darzustellen, um einerseits noch Interaktion mit den Lipiden und detektierbare Faltung erwarten zu können, sowie andererseits eine ungefähre Lokalisierung der Eigenschaften des Vollängenproteins zu ermöglichen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die in der Primärsequenz von α S vorhandenen KTKEGV-Sequenzen (Abb. 3-24) gelegt, da diese mit dem korrekten Ausbilden der α -Helix und damit der Lipidwechselwirkung assoziiert werden.

Allgemeine Bemerkungen

```

      10           20           30           40
MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV
      50           60           70           80
GSKTKEGVVH GVATVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK
      90           100          110          120
TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP
      130          140
DNEAYEMPSE EGYQDYEP EA

```

Abb. 3-24 Aminosäuresequenz von α S. Fett gedruckt sind die sieben unvollkommenen Wiederholungssequenzen, bestehend aus sechs Aminosäuren. In Wechselwirkung mit SDS-Mizellen bildet das normalerweise ungefaltete Protein nach Ulmer *et al.* [134] zwei α -Helices, bestehend aus den Aminosäuren 3-37 („Helix N“) und 45-92 („Helix C“). Die hydrophobe NAC-Domäne (Aminosäuren 60-95) ist vermutlich für die Aggregation des Proteins in Fibrillen verantwortlich [151], was mit einer Faltung der Aminosäuren 36-98 in β -Faltblatt Konformation assoziiert ist [152]. Das negativ geladene Aminosäureende (115-140) ist in allen drei Fällen unstrukturiert.

3.2.1 Die Interaktion von α -Synuclein-Fragmenten mit Detergenzmizellen und Lipidvesikeln

Die zunächst für die Bildung der α -Helix interessanten Fragmente umfassten die Aminosäuren 1-25, was nach Hochauflösungs-NMR-Messungen [134] den Start der ersten α -Helix („Helix N“) und zwei KTKEGV-Sequenzen darstellt und die Aminosäu-

Interaktion der Peptidfragmente mit SDS-Mizellen

ren 31-55, welche das Ende der Helix N, den Start der zweiten Helix („Helix C“) und zwei KTKEGV-Sequenzen beinhaltet. Dazu wurden noch Proteinfragmente der Aminosäuren 41-65, welche eine Sequenz enthält und ein Fragment der hydrophoben NAC-Domäne untersucht. Letzteres stellt vermutlich den Aggregationkern der Fibrillen dar [151][225][226][227] und ist eine Komponente der mit dem Morbus Alzheimer assoziierten amyloiden Plaques (daher der Name, **Non-Amyloid-Component**). Dieses Fragment ist ausserdem ein Teil der Helix C und enthält eine Wiederholungssequenz. Als Vergleich wurde schliesslich noch das hydrophile C-terminale Ende 115-140 verwendet, dass im Volllängenprotein sowohl in den Aggregaten wie auch in Lipid-assoziiierter Form ungefaltet bleibt, sowie ein sechs Aminosäuren langes Fragment, die Wiederholungssequenz KTKEGV.

Peptidsequenz	Strukturelle Motive in α -Synuclein nach Zugabe von SDS-Mizellen	Anzahl der KTKEGV Sequenzen
1-25	Helix N	2
31-55	Ende der Helix N, Linker Region, Start der Helix C	2
41-65	Helix C	1
61-85	Helix C	2
115-140	unstrukturiert	0

Tab. 3-19 Untersuchte Modellpeptide und Lokalisation in den Strukturmotiven des Volllängenproteins nach Ulmer *et al.* [134] und Anzahl der KTKEGV-Sequenzen in deren Aminosäuresequenz.

Eine gute und einfache Möglichkeit den Übergang der Fragmente von random-coil in α -helikale Konformation zu verfolgen ist die CD-Spektroskopie, welche einem für α -helikale Proteine Spektren mit charakteristischer Linienform und einem ausgeprägten Minimum der Elliptizität bei einer Wellenlänge von $\lambda = 222$ nm ausgibt (Abb. 3-25). Durch eine Verringerung des Wertes für die Elliptizität, normiert auf Konzentration und Anzahl der Aminosäurereste (θ_{222} , siehe „CD-, ESR- und Fluoreszenzspektroskopie“ auf Seite 39) lässt sich so leicht der Grad an α -helikaler Faltung bestimmen.

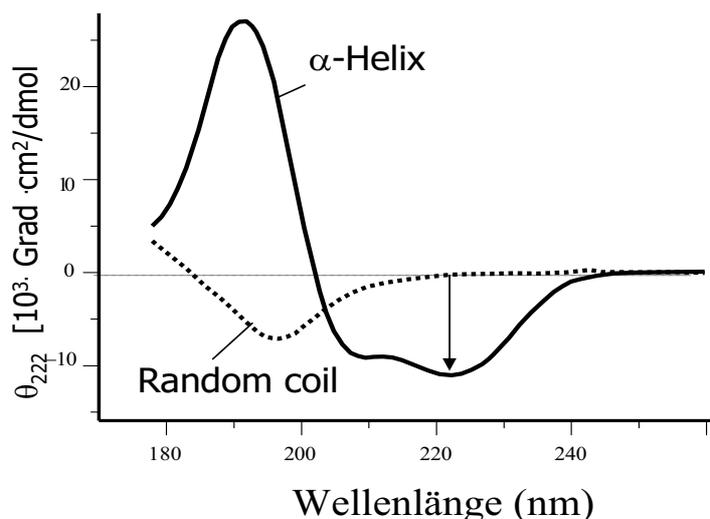


Abb. 3-25 Beispielspektren der CD-Spektroskopie eines Protein in α -helikaler und Random-coil Konformation. Mit dem Pfeil gekennzeichnet ist die Verringerung des θ_{222} -Wertes beim Übergang des Proteins zwischen den Konformationen.

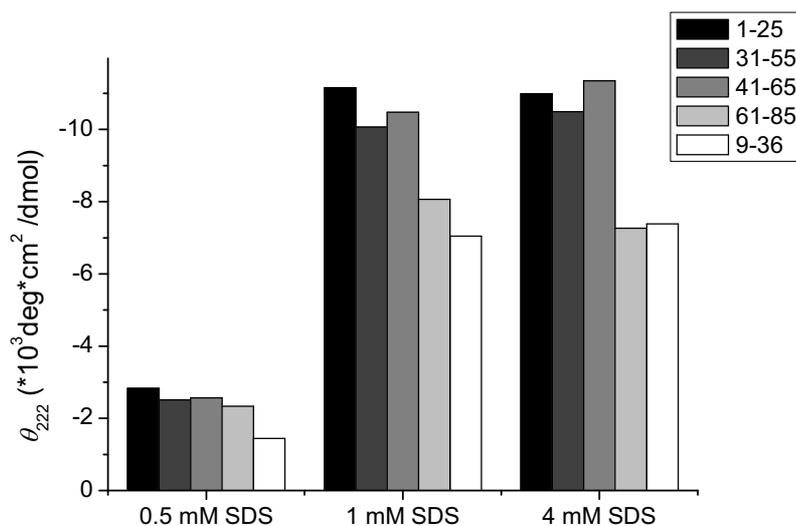


Abb. 3-26 Mean Residue Ellipticity der Peptidfragmente 1-25, 31-55, 41-65, 61-85 und 9-36, gemessen mittels CD-Spektroskopie. Alle Messungen wurden bei 20 °C vorgenommen. Nicht abgebildet sind die Werte für das Fragment 115-140 das unter sämtlichen untersuchten Bedingungen in Random-Coil-Konformation vorlag

Eine Mischung der Fragmente 1-25, 31-55, 41-55 sowie 61-85 mit SDS Mizellen resultierte in CD-Spektren mit stark α -helikalen Anteil und einer damit verbundenen Abnahme der Mean Residue Ellipticity bei 222 nm, während das Fragment des negativ geladenen C-terminus, 115-140 und die Wiederholungssequenz KTKEGV

selbst keinerlei Abweichung von seiner random-coil Konformation zeigte. Diese Wechselwirkung hielt bis zu einer SDS Konzentration von 1 mM an, darunter zeigten sämtliche Peptide random-coil Konformation (Abb. 3-26). Da bei 1 mM schätzungsweise die CMC (Critical Micelle Concentration) von SDS in dem verwendeten Puffer (20 mM NaPO₄, 100 mM KCl, pH 7.4) liegt [228][229] scheinen die Peptide nicht allein auf die Präsenz einzelner SDS-Moleküle zu reagieren, sondern die Mizellen zur Ausbildung von korrekter α -helikaler Faltung zu benötigen. Dies könnte einerseits in der höheren Ladungsdichte in der Nähe von Mizellenoberfläche oder in der Krümmung der negativ geladenen Oberfläche begründet sein.

Berechnet man nun aus den Spektren den Anteil an α -helikaler Faltung im Protein und führt eine temperaturabhängige Messung dieser Interaktion durch, so erhält man eine erstaunliche Thermostabilität der Faltung. Wie in Abb. 3-27 zu sehen ist, behält das Peptid 1-25 den Grossteil seiner α -helikalen Faltung bis zu einer Temperatur von 60 °C und zeigt bis 80 °C immer noch ca. 26% α -Helix-Anteil. Interessanterweise geht die Abnahme der α -helikalen Faltung nur teilweise einher mit einer Entfaltung des Peptids, vielmehr steigt der Anteil der β -Faltblatt Konformation mit der Temperatur. Dies geschieht jedoch zu einem geringeren Ausmaß als der α -helikale Anteil abnimmt, eine komplette Umwandlung der Konformation in β -Faltblatt findet nicht statt. Beide Effekte sind allerdings komplett reversibel, eine schrittweise Abkühlung der Lösung gibt an den einzelnen Temperaturpunkten wieder fast identische Werte mit übereinstimmenden CD-Spektren.

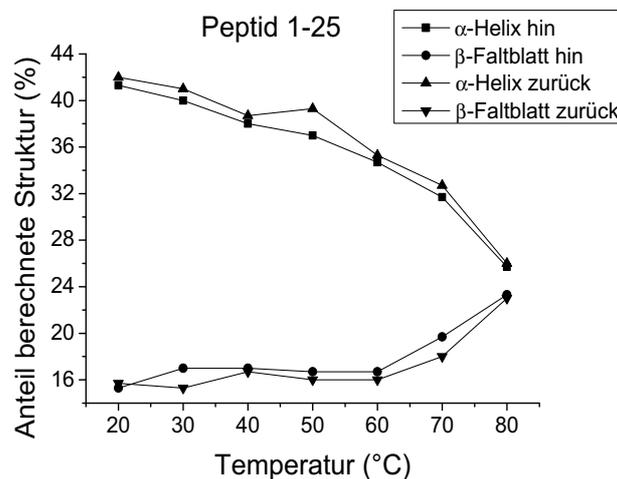


Abb. 3-27 Temperaturabhängigkeit der berechneten Sekundärstrukturanteile von Peptid 1-25 bei Zugabe von 8 mM SDS. Die Proteinkonzentration betrug in allem Versuchsreihen 35 μ M.

Für das Peptid 31-55 ergibt die Temperaturabhängigkeit der Faltung ein anderes Bild (Abb. 3-28). Hier setzt schon bei einer Temperatur von 40 °C eine weitgehende

Konformationsänderung ein, diesmal mit einer fast kompletten Überführung der α -helikalen in eine β -Faltblatt Struktur. Ausserdem zeigt sich eine deutliche Hysterese der Temperaturabhängigkeit, da auch nach Abkühlung der Proteinlösung die Konformationsänderung des Peptids in β -Faltblatt Struktur bestehen bleibt. Offensichtlich

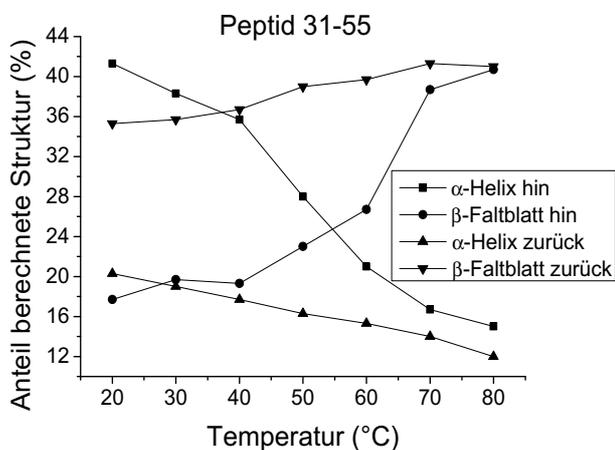


Abb. 3-28 Temperaturabhängigkeit der berechneten Sekundärstrukturanteile von Peptid 31-55 bei Zugabe von 8 mM SDS im Temperaturbereich von 20-80 °C. Die Proteinkonzentration betrug in allem Versuchsreihen 35 μ M.

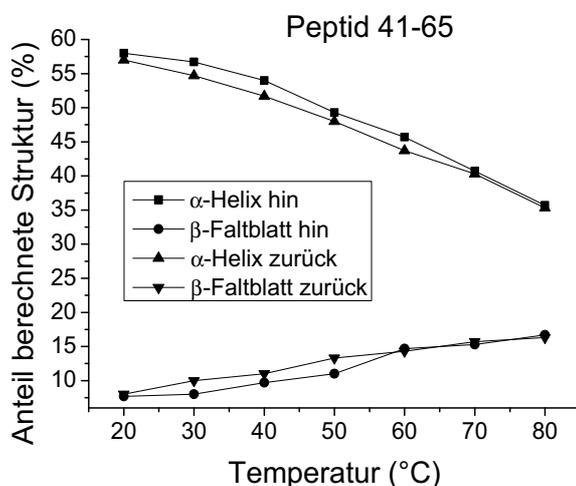


Abb. 3-29 Temperaturabhängigkeit der berechneten Sekundärstrukturanteile von Peptid 41-65 bei Zugabe von 8 mM SDS. Die Proteinkonzentration betrug in allem Versuchsreihen 35 μ M in ITC-Puffer.

ist das β -Faltblatt für das Peptid, wenn erst einmal die thermische Barriere zur Entfaltung aus der α -helikalen Struktur überwunden ist, eine weitgehend stabile Konformation, die auch bei niedrigen Temperaturen nicht durch die hohe Konzentration von SDS (8 mM) wieder rücküberführt werden kann.

Für das Peptid 41-65 (Abb. 3-29) ergibt sich dann wieder das für Peptid 1-25 gesehene Bild. Auch hier ist die α -helikale Faltung des Peptids stabil bis in hohe Temperaturbereiche und begleitet von einer Zunahme in β -Faltblatt Struktur. Beide Temperaturabhängigkeiten sind erneut komplett reversibel. Zu beachten ist allerdings, dass der Strukturanteil für α -Helix mit 56% für das Peptid 41-65 leicht höher liegt als im Fall von 1-25. Da das Peptid 61-86 leider zu hitzeempfindlich war, mit starken Tendenzen zur Aggregation, sowie das Fragment 115-140 keine Faltung zeigte, wurden diese Peptide keinen Test unterzogen.

Interaktion von α -Synuclein mit Lipidvesikeln

Als nächstes wurde die Lipidinteraktion des Vollängenproteins näher untersucht. Da bereits bekannt war, dass α S auf Kontakt mit negativ geladenen Lipidoberflächen [119], sowie auf die Packungsdefekte in kleinen, unilamellaren Vesikeln (Small Unilamellar Vesicles, SUV) unterhalb des Phasenübergangs der beteiligten Lipide mit α -helikaler Faltung reagiert [137] wurde nun versucht, die Kooperativität beider Faltungseinflüsse zu testen. In Abb. 3-30 sind die temperaturabhängigen θ_{222} -Werte, als Maß der Helizität, für das Protein unter Zugabe von verschiedenen Lipid-SUV zu sehen. Auf Grund der spontanen Fusion von SUV zu Vesikeln grösseren Durchmessers unterhalb der Phasenübergangstemperatur der beteiligten Lipide,

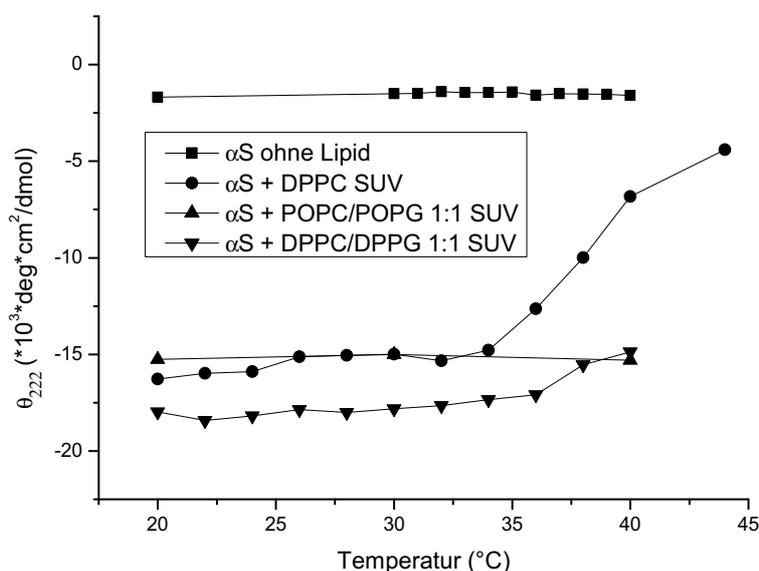


Abb. 3-30 Mean Residue Ellipticity von wt- α S in Wechselwirkung mit Lipid-SUV, gemessen mittels CD-Spektroskopie im Temperaturbereich von 40-20 °C. Abgebildet sind die Daten für DPPC (●), POPC/POPG 1:1 (▲), und DPPC/DPPG 1:1 (▼) SUV. Zum Vergleich sind ausserdem die gemessenen Werte ohne Zugabe von Lipid abgebildet (■). Die Konzentrationen betragen 5 mM für das Lipid und 6 μ M für das Protein.

sowie der Abhängigkeit der Faltung von α S von einer stark negativ gekrümmten Vesikeloberfläche, wurden die Messungen immer als „downscan“, d.h. von einer hohen Temperatur abwärts durchgeführt, um Vesikelfusion zu vermeiden. Nach Zugabe von DPPC-SUV (Abb. 3-30, ●) ist in der Tat eine starke Zunahme der Helikalität von α S mit Beginn des l_d zu s_o Phasenübergangs von DPPC bei ca. 41 °C verbunden. Die erhaltenen Werte bei 20 °C entsprechen dabei interessanterweise den Werten die man für negativ geladene POPC/POPG Mischvesikel über den gesamten Temperaturbereich enthält (Abb. 3-30, ▲). Da weder POPC noch POPG einen Phasenübergang im betrachteten Temperaturbereich aufweisen, blieben die Werte für letztere Vesikelsorte temperaturunabhängig. Die Kombination von negativ geladenen Lipidkopfguppen und einem Phasenübergang im betrachteten Temperaturbereich, wie unter Zugabe von DPPC/DPPG-SUV (Abb. 3-30, ▼) ergab eine interessante Temperaturabhängigkeit. Wie zu erwarten war, entsprechen sich die θ_{222} -Werte für α S in Kontakt mit POPC/POPG- und DPPC/DPPG-SUV bei auf Grund der wahrscheinlich sehr ähnlichen Oberflächenladung und -ladungsdichte. An dem mit Hilfe

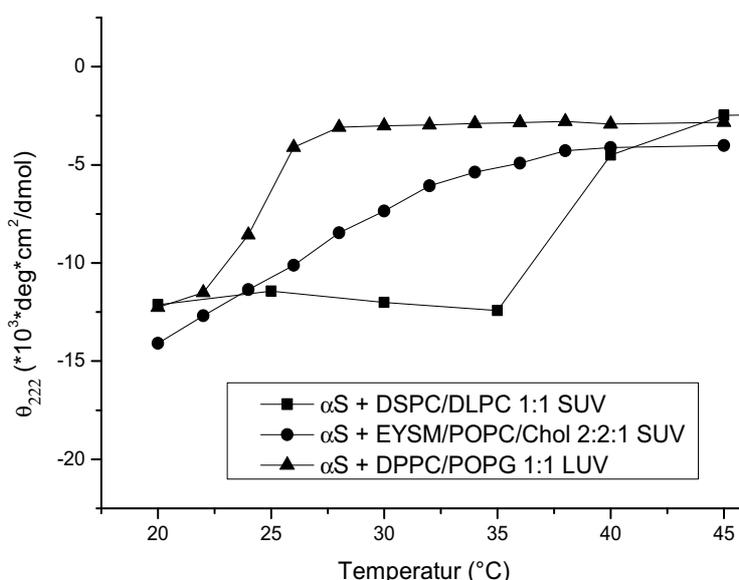


Abb. 3-31 Mean Residue Ellipticity von wt- α S in Wechselwirkung mit Lipid-SUV gemessen mittels CD-Spektroskopie im Temperaturbereich von 45-20 °C. Abgebildet sind die Daten für DSPC/DLPC 1:1 SUV (■), EYSM/POPC 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ SUV (●) und DPPC/POPG 1:1 LUV (▲). Die Konzentrationen betragen 5 mM für das Lipid und 6 μ M für das Protein.

von DSC gemessenen kooperativen Phasenübergang der DPPC/DPPG-Membran ($T_m = 39.3$ °C, $T_{1/2} = 3.2$ °C) zeigt sich jedoch ein zusätzlicher Anstieg der Helizität, offensichtlich als Folge des induzierten Packungsstress innerhalb der Membran. Beide Effekte scheinen sich also kumulativ auf die Stabilität der beiden α -Helices des Proteins auszuwirken.

Als nächstes wurde eine weitere Lipidmischung mit dem Volllängenprotein geprüft. Da es bereits bekannt war, dass α S nicht nur auf Phasenübergänge, sondern auch auf laterale Entmischung von Lipiden innerhalb einer stark gekrümmten Membran reagiert [137], wie zum Beispiel der Sphingomyelin/POPC/Cholesterin-Mischung aus Abschnitt 3.1, wurde nun die Faltung von α S in Kontakt mit SUV bestehend aus dieser Zusammensetzung, sowie zusätzlich einer Mischung von DSPC und DLPC ausprobiert. Diese beiden letztgenannten Lipide weisen in einer gemischten Membran bei einer Temperatur von ca. 49 °C [230] auf Grund ihrer unterschiedlichen Acylkettenlängen eine Koexistenz zweier Phasen auf, wobei die eine hauptsächlich aus DSPC in einer gelartigen, die andere aus DLPC in einer fluiden Phase besteht. Genau dieser Punkt der Phasentrennung spiegelt sich auch in Abb. 3-31 wieder, in dem die Mean Residue Ellipticity von α S in Mischung mit Phasenseparationsvesikeln gegen die Temperatur aufgetragen ist. In der Mischung mit DSPC/DLPC-SUV (Abb. 3-31, ■) beginnt der Wert der molaren Elliptizität für α S bei ca. 40 °C plötzlich zu sinken, ein deutliches Zeichen für Bildung der beiden Helices und Bindung an die Vesikel.

Dies ist genauso in der Mischung EYSM/POPC mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ der Fall (Abb. 3-31, ●). Hier beginnt die Faltung jedoch erst ab ca. 35 °C und setzt weniger plötzlich ein, was jedoch anhand der Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 und der da gezeigten, graduellen Phasenseparation leicht verständlich ist. Da das Protein ausserdem eine starke Krümmung der Vesikel benötigt um zu binden, wie durch Versuche mit reinen DPPC und POPG Vesikeln mit 100 nm Durchmesser (Large Unilamellar Vesicles, LUV) gezeigt werden konnte (Tab. 3-20), wurde nun versucht ob eine Kombination von Phasenseparation und negativer Ladung einer Reaktion des Proteins in LUV auslösen könnte. Die dritte Sorte Vesikel die getestet wurde bestand daher aus einer Mischung von DPPC mit POPG mit einem Durchmesser von 100 nm (Abb. 3-31, ▲). Diese zeigte einen sehr breiten ($T_{1/2} = 9.9$ °C) Phasenübergang im DSC bei 28.7 °C. Die Kombination von negativer Oberflächenladung und Phasenübergang regte hier erneut, im Gegensatz zu den einzelnen Lipidvesikeln, eine Faltung des Proteins aus und zwar wie erwartet knapp unterhalb des mittels DSC gemessenen Phasenübergangs bei ca. 26 °C. Auch hier scheinen kooperative Effekte von hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkung die Helixformation im Protein zu stabilisieren.

Interaktion von Proteinfragment 1-25 mit Lipidvesikeln

Das Proteinfragment 1-25, was den Beginn der Helix N mit zwei Wiederholungssequenzen beinhaltet, zeigt sehr ähnliche Eigenschaften im Vergleich mit dem Volllängenprotein. In Abb. 3-32 ist die Temperaturentwicklung der Mean Residue Ellipticity für das Peptid 1-25 in Wechselwirkung mit verschiedenen Lipid-SUV zu sehen. Zunächst zeigt auch das Fragment 1-25 am Phasenübergang der DPPC-Vesikel (ca.

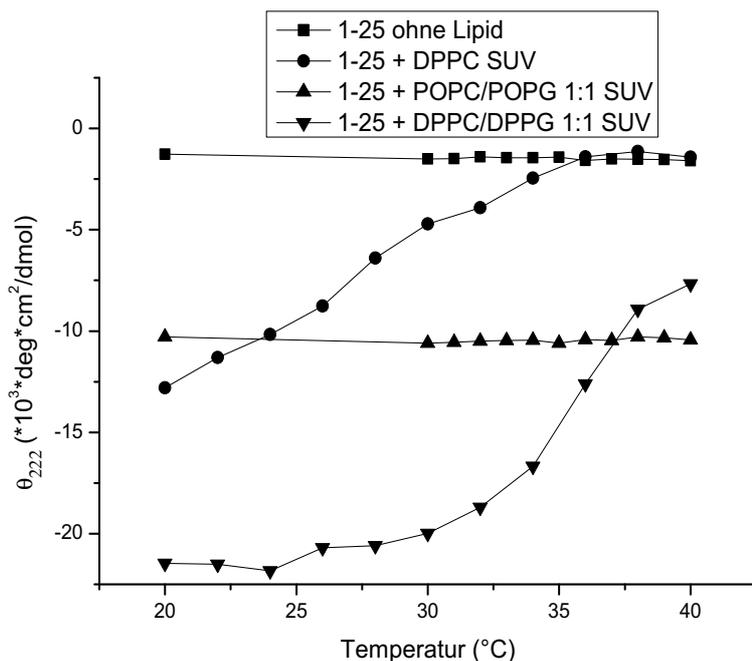


Abb. 3-32 Mean Residue Ellipticity des Peptidfragments 1-25 in Wechselwirkung mit Lipid-SUV gemessen mittels CD-Spektroskopie im Temperaturbereich von 40-20 °C. Abgebildet sind die Daten für DPPC (●), POPC/POPG 1:1 (▲), und DPPC/DPPG 1:1 (▼) SUV. Zum Vergleich sind ausserdem die gemessenen Werte ohne Zugabe von Lipid abgebildet (■). Die Konzentrationen betragen 5 mM für das Lipid und 30 µM für das Peptid.

38 °C, Abb. 3-32 ●) eine deutliche Zunahme an α -helikaler Faltung. Diese ist jedoch gradueller als im Falle des Volllängenproteins und setzt auch erst bei leicht niedrigeren Temperaturen (34 °C) ein. Auch das Fragment reagiert auf negativ geladene POPC/POPG-Vesikel, wie in Abb. 3-32 ▲ zu sehen ist. Anders als beim Volllängenprotein ist diese Wechselwirkung schwächer ausgeprägt im Vergleich mit der hydrophoben Wechselwirkung in Gegenwart von DPPC-SUV, entsprechend der geringeren Elliptizität bei 222 nm - θ_{222} - zu sehen ist. Eine erneute Kombination von negativer Oberflächenladung und Phasenübergang im gemessenen Temperaturbereich in DPPC/DPPG-SUV (Abb. 3-32 ▼), bringt auch hier einen starken Zuwachs in Faltung. Diesmal ist der zusätzliche Effekt aber sehr viel stärker ausgeprägt als bei α S mit einer Steigerung der Faltung die bereits bei 39 °C und nicht erst bei 34 °C beginnt. Der kooperative Effekt scheint hier für eine korrekte Faltung ausserdem notwendiger zu sein als bei α S selbst, denn er führt zu einem Zuwachs des negativen θ_{222} Wertes um ca 50-60% im Vergleich von DPPC/DPPG mit DPPC-SUV. Dieser Wert liegt essentiell höher als der Zuwachs den man für das gesamte Protein erhält (Abb. 3-30, Zuwachs ca. 15%). Ein weiterer Unterschied ergab sich bei der Interak-

tion sowohl mit den Vesikeln die aus einer kanonischen „Lipid-Raft“-Mischung bestanden, also EYSM/POPC mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$, und den Vesikeln bestehend aus einer DSPC/DLPC-Mischung. Beide Vesikelsorten hatten im getesteten Temperaturbereich (60-20 °C) keinen Einfluss auf die Faltung des Peptids 1-25. Offensichtlich unterscheidet sich die Wechselwirkung des Proteins mit SUV die Phasenseparationsphänomene innerhalb der Membran aufweisen, deutlich von der Wechselwirkung mit DPPC-Vesikeln, bei denen ein reiner Phasenübergang der gesamten Membran stattfindet.

Der Einfluss von SUV auf die Faltung von Fragment 31-55

Das Fragment 31-55 mit zwei Wiederholungsmotiven und dem Ende von Helix N sowie dem Start von Helix C hatte einige unerwartete Eigenschaften. Obwohl dieses Peptid eine stabile α -helikale Konformation in Kontakt mit SDS-Mizellen annahm (Abb. 3-26) zeigte es keine Reaktion auf die Zugabe von negativ geladenen POPC/POPG-SUV (Abb. 3-33 ▲), was vielleicht auf die stärkere Ladung sowie Krümmung der SDS-Mizellen zurückzuführen ist. Auf die Zugabe von DPPC-SUV (Abb. 3-33 ●)

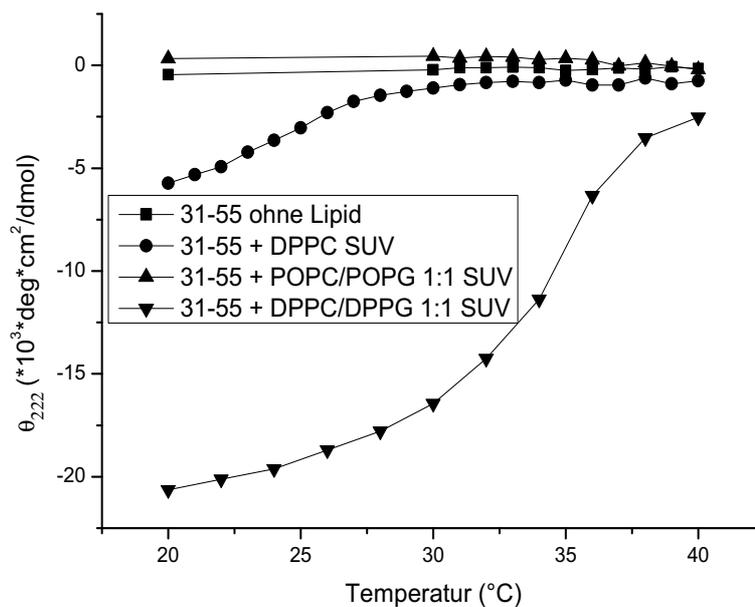


Abb. 3-33 Mean Residue Ellipticity des Peptidfragments 31-55 in Wechselwirkung mit Lipid-SUV, gemessen mittels CD-Spektroskopie im Temperaturbereich von 40-20 °C. Abgebildet sind die Daten für DPPC (●), POPC/POPG 1:1 (▲), und DPPC/DPPG 1:1 (▼) SUV. Zum Vergleich sind außerdem die gemessenen Werte ohne Zugabe von Lipid abgebildet (■). Die Konzentrationen betragen 5 mM für das Lipid und 30 μ M für das Peptid.

reagiert dieses Peptid erneut etwas schwächer und später als es das Peptid 1-25 tat. Offensichtlich sind DPPC-SUV unterhalb des Phasenüberganges besser geeignet

eine α -helikale Faltung zu stabilisieren als dies für die elektrostatische Wechselwirkung mit den POPC/POPG-SUV der Fall ist. Die Mischvesikel bestehend aus DPPC/DPPG (Abb. 3-33 ▼) bringen erneut wieder eine starke Stabilisierung der Faltung in dem kurzen Proteinfragment, was auf die Kooperativität des hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen hinweist. Auch dieses Peptid zeigte keine Faltung auf Zugabe von SUV bestehend aus EYSM/POPC mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ oder DSPC/DLPC 1:1.

Da das Fragment 31-55 als einziges Peptid mit dem Histidin an Position 50 eine Aminosäure in der Sequenz besitzt, die mit einem pK_S von 6.5 einen Umschlagspunkt von geladen zu ungeladen im physiologischen Bereich besitzt, was gerade in der Nähe von hydrophoben Membranen über die Faltung und Bindung entscheiden könnte, wurde nun eine etwaige pH-Abhängigkeit der Bindung an DPPC-SUV untersucht. Hierbei sollte ein niedriger pH-Wert die Histidinseitenkette protonieren, das Peptid dadurch hydrophiler machen und die Bindung an die DPPC-Vesikel behindern. Genau dies war der Fall. Abb. 3-34 zeigt erneut den Temperaturverlauf des

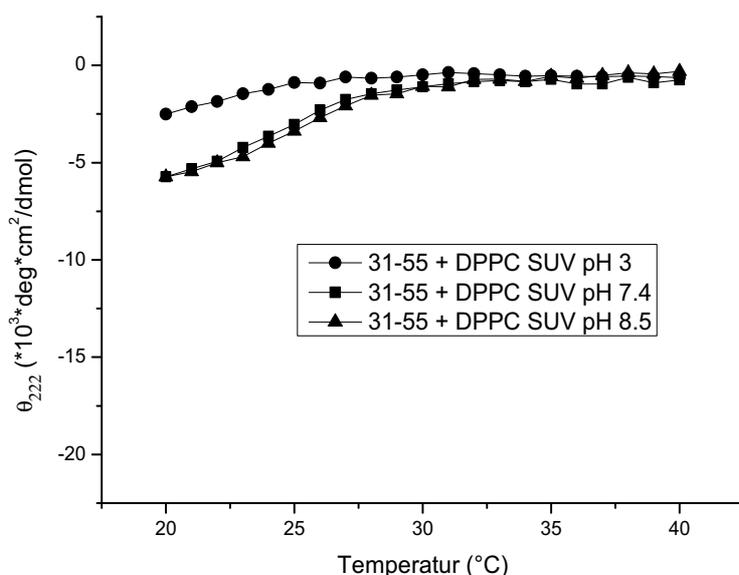


Abb. 3-34 Mean Residue Ellipticity des Peptidfragments 31-55 in Wechselwirkung mit Lipid-SUV, gemessen mittels CD-Spektroskopie im Temperaturbereich von 40-20 °C. Untersucht wurden DPPC SUV bei pH 3 (●), bei pH 7.4 (■), und bei pH 8.5 (▲).

θ_{222} -Wertes für Peptid 31-55 unter Zugabe von DPPC-Vesikeln, diesmal allerdings bei den pH-Werten 8.5, 7.4 und 3. Wie erwartet sind die Werte die bei pH 3 und damit bei geladener Histidinseitenkette erreicht werden (Abb. 3-34 ●) sehr viel niedriger als bei pH 7.4 (Abb. 3-34 ■). Dieser Wert ändert sich allerdings auch nicht durch eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf 8.5, was bedeutet, dass die Histidinseitenkette

bereits bei pH 7.4 komplett deprotoniert ist. Die deprotonierte und nicht die protonierte Form von Histidin fördert offensichtlich die Bindung an DPPC-SUV und stabilisiert die α -helikale Faltung.

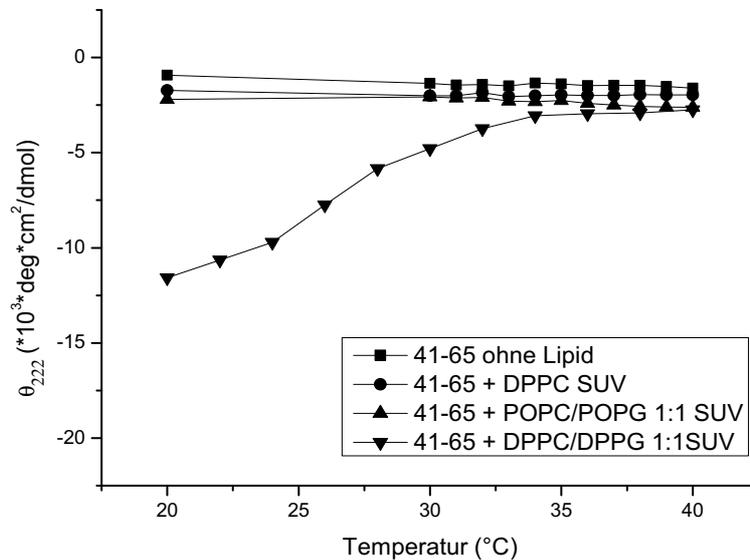


Abb. 3-35 Mean Residue Ellipticity des Peptidfragments 41-65 in Wechselwirkung mit Lipid-SUV, gemessen mittels CD-Spektroskopie im Temperaturbereich von 40-20 °C. Abgebildet sind die Daten für DPPC (●), POPC/POPG 1:1 (▲), und DPPC/DPPG 1:1 (▼) SUV. Zum Vergleich sind ausserdem die gemessenen Werte ohne Zugabe von Lipid abgebildet (■).

Die Interaktion von Peptid 41-65 mit Lipid-SUV

Das nächste Fragment, Peptid 41-65, bestand aus dem Anfang der Helix C mit zwei Wiederholungssequenzen. In diesem Fragment wurde die Lipidinteraktion erneut schwächer, wie in Abb. 3-35 zu sehen ist. Diesmal riefen weder DPPC oder POPC/POPG-SUV über den gesamten gemessenen Temperaturbereich detektierbare Faltung in dem Peptid hervor. Auch hier benötigt es wieder die Kombination von negativer Oberflächenladung und Phasenübergang in einer DPPC/DPPG 1:1 Mischung (Abb. 3-35 ▼) um die Bildung einer α -Helix zu stabilisieren. Die Förderung der Faltung des Peptids wird hier allerdings nicht so stark gefördert, wie im Falle der Peptide 1-25 und 31-55. Auch bei diesem Peptid war keine Faltung in Wechselwirkung mit EYSM/POPC mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ oder DSPC/DLPC 1:1 SUV mittels CD-Spektroskopie detektierbar.

Interaktion des Proteinfragments 61-85, KTKEGV und 115-140 mit Lipidvesikeln

Das Fragment 61-85 war, als Bestandteil der Helix C mit zwei Wiederholungssequenzen, nicht nur auf Grund seiner Eigenschaften als hydrophober Nukleationskeim im Laufe der Proteinaggregation interessant, auf Grund seiner stark hydrophoben Sequenz sollte auch eine starke Interaktion mit Lipidvesikeln zu erwarten

sein. Wie Abb. 3-36 zeigt, ist jedoch das Gegenteil der Fall. Bis auf eine schwache Faltung als Reaktion auf den Phasenübergang in DPPC-SUV (Abb. 3-36 ●) zeigten sämtliche andere Vesikelsorten keinen Effekt (Tab. 3-20). Da dieses Fragment jedoch Verunreinigungen in den Massenspektren der Qualitätskontrolle zeigte, sowie

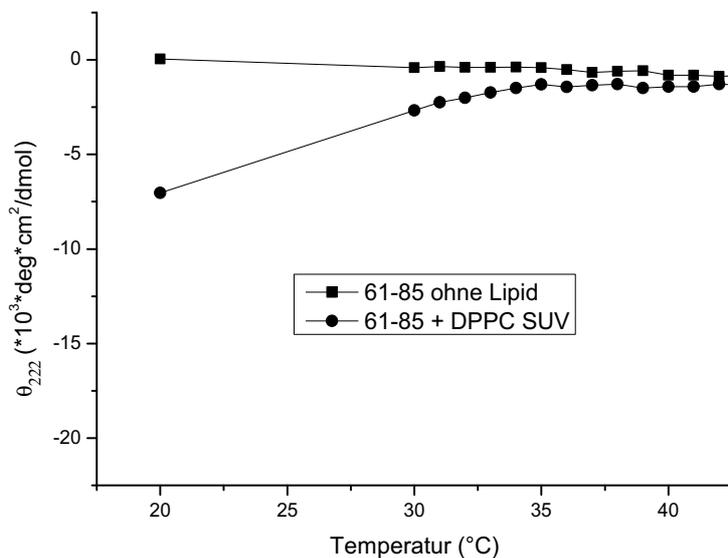


Abb. 3-36 Mean Residue Ellipticity des Peptidfragments 61-85 in Wechselwirkung mit Lipid-SUV im Temperaturbereich von 40-20 °C. Abgebildet sind die Daten für DPPC (●) SUV. Zum Vergleich sind ausserdem die gemessenen Werte ohne Zugabe von Lipid abgebildet (■). Die Konzentrationen betragen 5 mM für das Lipid und 30 µM für das Peptid.

eine starke Tendenz zur Aggregation und Fehlfaltung aufwies, was teilweise auch während der CD-Spektroskopie als entstehendes β -Faltblatt Signal beobachtet werden konnte, kann hieraus nur sehr unzuverlässlich eine Aussage über dessen Befähigung zur α -helikalen Faltung in Kontakt mit Lipid-Vesikeln gemacht werden. Das Peptidfragment 115-140 sowie die Sequenz KTKEGV zeigten bei keiner Vesikelsorte detektierbare Faltung im gesamten Temperaturbereich.

Grad¹ der α -helikalen Faltung der Peptide durch
Vesikel/Mizellen-Wechselwirkung bei 20 °C

Mizellen ² /Vesikel ³ Zusammensetzung	1-25	9-36	31-55	41-65	61-85	115-140	KTKEGV Sequenz	α S
SDS	++	+	++	++	+	-	-	++
POPC/POPG 1:1 SUV	++	-	-	-	-	-	-	++
DPPC SUV	++	-	+	-	+	-	-	++
DPPC/DPPG 1:1	+++	+	+++	++	+	-	-	+++
“Lipid raft” ⁴ SUV	-	-	-	-	-	-	-	++
DPPC/POPC/Chol 2:2:1 SUV	-	-	-	-	-	-	-	++
DSPC/DLPC 1:1 SUV	-	-	-	-	-	-	-	++
DPPC LUV	-	-	-	-	-	-	-	-
POPC/POPG 1:1 LUV	-	-	-	-	-	-	-	-
DPPC/POPG 1:1 LUV	-	-	-	-	-	-	-	++

Tab. 3-20 Tabellarische Zusammenfassung der Faltung der einzelnen Peptidfragmente sowie wt α -Synuclein in Interaktion mit Detergenzmizellen bzw. Lipidvesikeln. ¹Grad = -: Keine α -Helix Bildung, +: θ_{222} zwischen -5000 und -8000 deg*cm²/dmol, ++: θ_{222} zwischen -10000 und -16000 deg*cm²/dmol, +++: θ_{222} unter -16000 deg*cm²/dmol; ² für SDS Konzentration von 4 mM; ³ für Gesamtlipidkonzentration von 5 mM; ⁴SUV bestehend aus EYSM/POPC 1:1 mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$

3.2.2 Stabilisierung der Vesikelmembran durch α -Synucleinfragmente

Weitergehend wurde untersucht, ob die einzelnen Fragmente in der Lage sind wie α -Synuclein [137] eine geordnetere Packung der Lipide in DPPC-Membranen zu unterstützen. Dazu wurde die Bindung der Fragmente an DPPC-SUV mittels ESR-Spektroskopie verfolgt. Hierzu wurden Phosphatidylcholinmoleküle mit einer Doxylgruppe an C-14 (14-PCSL) in die Membran inkorporiert um über das ungepaarte Elektron der Doxylgruppe die Änderung innerhalb des hydrophoben Kerns der Lipide mittels ESR-Spektroskopie zu erfassen. Anhand der Linienform und Hyperfeinaufspaltung nach Zugabe von 1 mol% 14-PCSL konnte hier, analog der bereits besprochenen ^2H -NMR-Spektroskopie, die Ordnung der Lipide untersucht werden. Der Vorteil der ESR-Spektroskopie liegt im anderen Zeitfenster (ESR: 10^{-10} - 10^{-3} s, ^2H -NMR: 10^{-6} - 10^{-4} s) dieser Technik, das den Zeitbereich der Isomerisierung der Acylketten abdeckt. Für die langsame Rotationsdiffusion der SUV ist die Spin-Label-Technik jedoch unempfindlich, was eine selektive Messung der Lipidbeweglichkeit in SUV ermöglicht. Um die Temperaturabhängigkeit zu bestimmen wurden die Messungen bei 43, 33, 23 und 13 °C durchgeführt. Die Messungen bei 43 °C (Abb. 3-37), d.h.

ESR-Spektroskopie von DPPC-SUV in Interaktion mit Peptidfragmenten

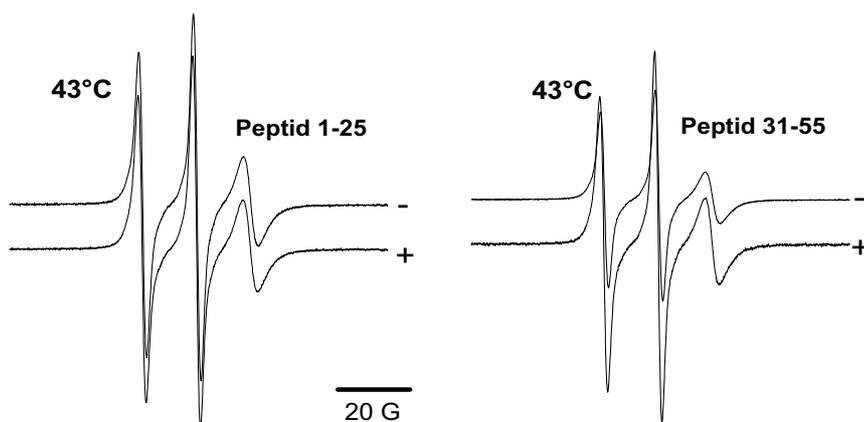


Abb. 3-37 ESR-Spektren von DPPC-SUV mit oder ohne Zugabe von Peptid. Abgebildet sind die Spektren von DPPC-SUV mit 1% mol 14-PCSL ([Lipid] = 25 mM) die in gepufferter Lösung (pH 7.4) bei 43 °C mit den einzelnen Proteinfragmenten (Lipid/Protein 50:1) inkubiert wurden. Die Spektren wurden durch doppelte Integration normiert.

oberhalb der Phasenübergangstemperatur von DPPC, ergaben ESR-Spektren die für eine schnelle axiale Beweglichkeit der Acylketten der Phospholipide in einer flüssig-kristallinen Phase der Membran sprechen. Die Zugabe der Peptide ergab hierbei

keinerlei Veränderung der ESR-Spektren, was zusammen mit der bei dieser Temperatur mittels CD-Spektroskopie nicht detektierbaren Faltung dafür spricht, dass die Peptide nicht gebunden sind

Unterhalb von T_m ergibt sich ein etwas anderes Bild. Die Zugabe der Peptide 41-65, 61-85 und 115-140 hat über den gesamten Temperaturbereich einen geringen Effekt auf die betrachteten Spektren. Nach Zugabe der Peptide 1-25 und 31-55 macht sich jedoch eine Verbreiterung des $m_1 = +/- 1$ Übergangs bemerkbar, besonders bei 13 °C (Abb. 3-38). In diesem Bereich ist die Linienform allgemein auf Grund der Verlangsamung der Kettenisomerisierungsgeschwindigkeit bereits stark verbreitert. Offensichtlich bewirkt die Zugabe der Peptide bei dieser Temperatur eine noch stärkere Ordnung der Membran und erhöht die Ordnung der Acylketten, auch wenn dieser Effekt lange nicht so ausgeprägt ist wie bei dem Volllängenprotein [137].

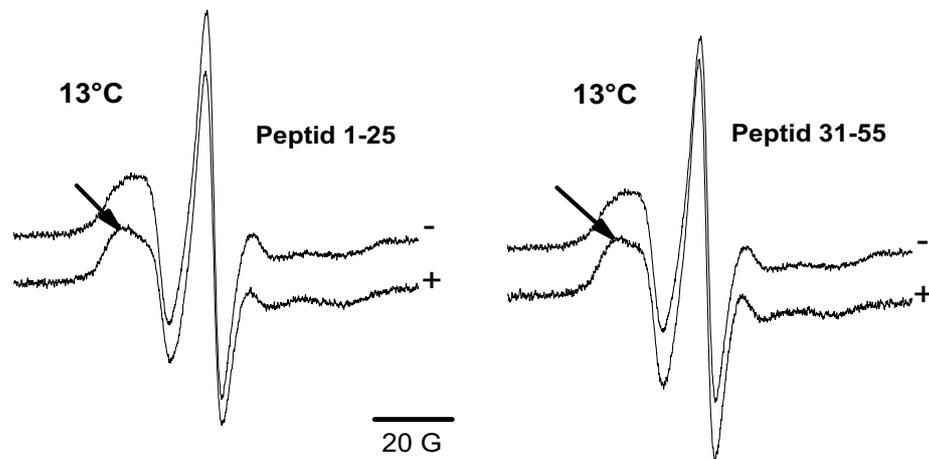


Abb. 3-38 ESR-Spektren DPPC-SUV mit oder ohne Zugabe von Peptid. Abgebildet sind die Spektren von DPPC-SUV mit 1% mol 14-PCSL ([Lipid] = 25 mM) die in gepufferter Lösung (pH 7.4) bei 13 °C mit den einzelnen Proteinfragmenten (Lipid/Protein 50:1) inkubiert wurden. Die Spektren wurden durch doppelte Integration normiert.

Der Einfluss der Proteinfragmente auf die Kinetik von Vesikelfusion im Vergleich zu α -Synuclein

Die Faltung des Proteins als Reaktion auf Einflüsse wie Temperaturniedrigung oder Erhöhung des Cholesterinanteils, beides Faktoren die zu einer erhöhten Steifigkeit der Membran führen, wirft natürlich die Frage nach einer möglichen physiologischen Funktion auf. Da für die Faltung des Proteins ausserdem eine stark positive Krümmung der Membran Bedingung ist und durch ESR-Spektroskopie in unserem Labor gezeigt werden konnte, dass das Protein offensichtlich Packungsstörungen in stark gekrümmten Vesikelmembranen beseitigen kann, liegt die Vermutung nahe, dass α S *in vivo* eine Stabilisierung kleiner geladener Vesikel bewirkt. Dies könnte *in vivo* z.B. auf ER- Golgi- und synaptische Vesikel zutreffen. Um dieses weiter zu

untersuchen, wurden in unserem Labor die Fusionskinetiken verschiedene Vesikel-sorten gemessen. Es zeigte sich dabei, dass die Zugabe von α S zu einer Hemmung der Vesikelfusion sowohl von geladenen POPC/POPG wie auch zwitterionischen DPPC-Vesikeln führt. Da deren spontane Fusionskinetiken zu langsam waren um diese in einem vernünftigen Zeitrahmen nachzuverfolgen, wurde im Falle der negativ geladenen POPC/POPG-SUV die Vesikelfusion mittels Zugabe von Ca^{2+} -Ionen beschleunigt. Im Fall der Zwitterionischen DPPC-SUV wurde das nichtionische Detergenz C_{12}E_8 benutzt. Um die Vesikelfusion zu detektieren wurden zwei verschiedene Versuchsanordnungen verwendet. Zum einen wurde der mit der Fusion verbundene Zuwachs von Partikeldurchmesser mittels statischer Lichtstreuung verfolgt, zum anderen wurde ein Fluoreszenz-Dequenching-Ansatz verwendet. Hierbei wurden zwei mit sich gegenseitig auslöschenden Fluoreszenzfarbstoffen (NBD und Rhodamin) markierte Lipide in die Membranen von 10% der Lipidvesikel eingebaut. Fusionieren diese markierten Vesikel nun mit den restlichen in Lösung vorhandenen unmarkierten Vesikeln, wird die Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe in der Membran erniedrigt und die Auslöschung vermindert. Eine Fusion der Vesikel führt somit zu einem leicht zu verfolgenden Anstieg in Fluoreszenz. Dieser Ansatz hat gegenüber der statischen Lichtstreuung den Vorteil, dass nur ein Anstieg in Fluoreszenz stattfindet, wenn die betrachteten Vesikel tatsächlich fusionieren und sich deren Membranlipide vermischen. Eine einfache Aggregation der Vesikel, die auch in der statischen Lichtstreuung als Fusion detektiert werden würde, führt in diesem Fall nicht zu einem Anstieg des Signals. Von Nachteil ist der höhere Aufwand für die Präparation der Vesikel, die erst mittels Chromatographie von dem nicht in die Membran eingebauten Fluoreszenzfarbstoff getrennt werden müssen. Dies war bei stark fusionogenen Vesikelsorten, wie DSPC/DLPC 1:1, leider nicht möglich.

Zunächst wurde der Einfluss der Peptide auf geladene POPC/POPG-SUV untersucht (Abb. 3-39, obere Abbildung). Es zeigte sich hierbei überraschenderweise, dass die Peptide, auch wenn sie auf die negativ geladenen Vesikel mit α -helikaler Faltung reagierten, die Fusion der POPC/POPG-SUV im Vergleich mit dem Kontroll-experiment ohne Zugabe von Protein nicht signifikant verlangsamen. Einzig das Peptid 1-25 zeigte einen mit dem Volllängenprotein vergleichbaren Einfluss auf die Fusionkinetik, wenn auch nur unter Zugabe der zehnfachen Menge des Peptids im Vergleich zum wt-Protein (Abb. 3-39, obere Abbildung). Für die Experimente mit DPPC-SUV ergab sich ein etwas anderes Bild. Auch hier war die Fusionshemmung des Peptids 1-25 im Vergleich mit den anderen Peptiden am stärksten ausgeprägt. Die Peptide, die in den Experimenten mittels CD-Spektroskopie eine Faltung als Reaktion auf den Phasenübergang in den DPPC-SUV aufwiesen, verlangsamen

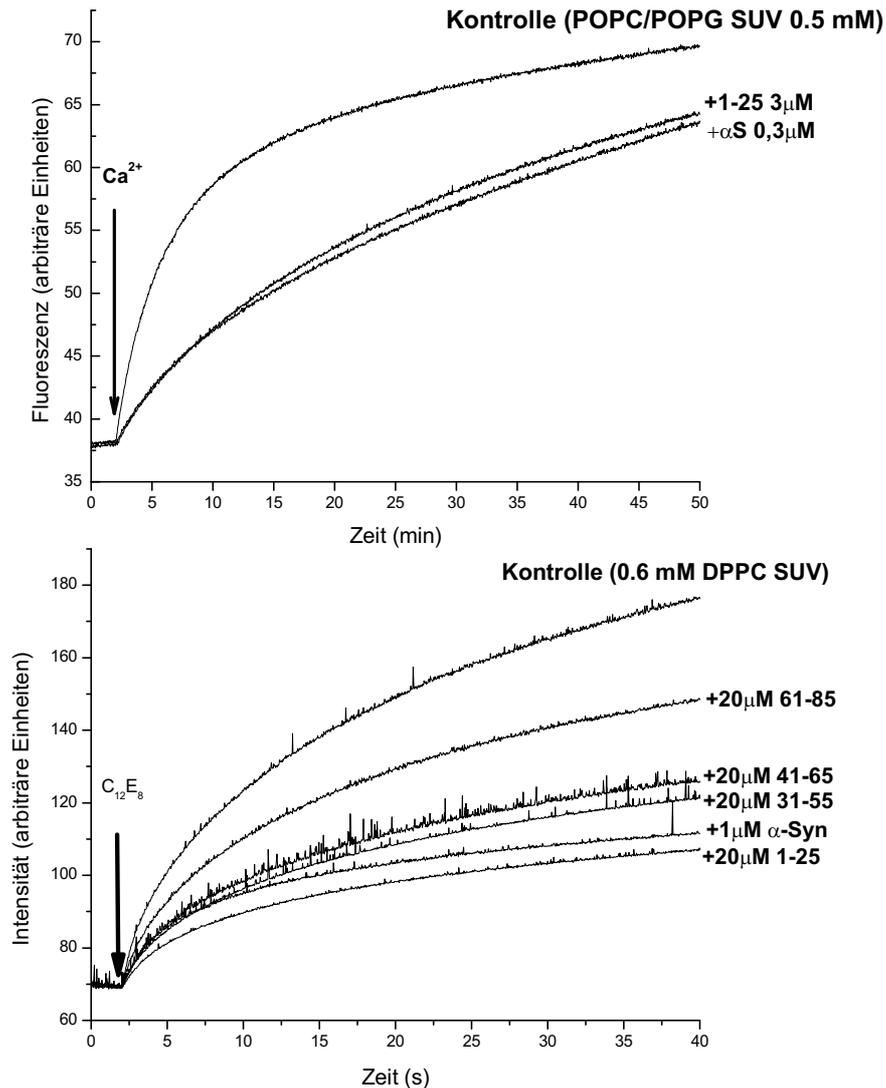


Abb. 3-39 Hemmung der Lipidvesikelfusion durch Zugabe von wt- α S und Peptidfragment 1-25 bei 20 °C. *Obere Abbildung:* Vesikelfusion wurde mittels De-quenching eines in Donorvesikel inkorporierten Fluoreszenzfarbstoffs gemessen. Ausgelöst wurde die Fusion der POPC/POPG 1:1 ([Lipid] = 0.5 mM) SUV durch Zugabe von 20 mM $CaCl_2$. Gemessen wurde die Zunahme der Intensität der Lichtstreuung auf Grund der Zunahme der Vesikeldurchmesser in Lösung. *Untere Abbildung:* Gemessen wurde die Zunahme der Intensität der Lichtstreuung auf Grund der Zunahme der Vesikeldurchmesser in Lösung. Ausgelöst wurde die Fusion der DPPC ([Lipid] = 0.6 mM) SUV durch Zugabe von 12 μ M $C_{12}E_8$.

auch deren Fusion unterhalb des Phasenübergangs. Es zeigte sich sogar eine Korrelation zwischen Fusionshemmung und α -helikaler Faltung (vgl. Abb. 3-39 und Tab.

3-20), wie an der absteigenden Reihenfolge der Fähigkeit zur Fusionshemmung der Peptidfragmente 1-25, 31-55, 41-65 und 61-85 zu entnehmen ist. Das Fragment 115-140 zeigte keinerlei Wirkung auf die Fusionskinetik der Vesikel. Auch war der Einfluss der Fragmente auf die Fusionskinetik erneut ungleich schwächer als der des Vollängenproteins. Das am stärksten wirksame Fragment 1-25 musste in zwanzigfacher Konzentration zugegeben werden um mit α -Synuclein vergleichbare Resultate zu erzielen.

Da bereits in den CD-Spektroskopieexperimenten bemerkt wurde, dass α -Synuclein auf die Phasenseparation in DSPC/DLPC-SUV mit Faltung reagiert und diese Vesikel auf Grund ihrer starken Fusionsneigung keinerlei Detergenzzugabe benötigten um innerhalb experimentell vertretbarer Zeiträumen zu fusionieren, wurde nun der Einfluss des Proteins auf die Fusionsneigung DSPC/DLPC-SUV untersucht. In diesen Versuchen musste mit statischer Lichtstreuung gearbeitet werden, da die schnelle Fusion der DSPC/DLPC-SUV die etwas aufwendigere Präparation der fluoreszenzmarkierten Membranen zu instabil machte. Abb. 3-40 zeigt den Einfluss von α S auf die Fusion von DSPC/DLPC-SUV. Es ist deutlich zu sehen, dass auch hier die helikale Faltung des Proteins mit einer drastischen Verlangsamung der Fusionkinetik einhergeht. Hierfür reicht eine α S-Konzentration entsprechend eines Lipid/Protein Verhältnisses von 500/1 aus. Keines der Peptidfragmente führte zu einer Verlangsamung der Fusionskinetik, was vermutlich auf die bereits in der CD-Spektroskopie sichtbare mangelnde Interaktion mit dieser Art von Mischvesikeln zurückzuführen ist.

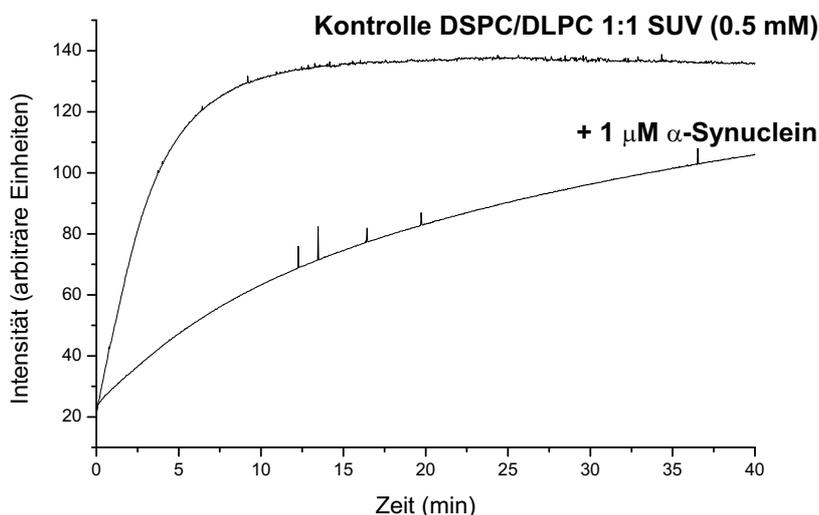


Abb. 3-40 Hemmung von spontaner Lipidvesikelfusion ($[\text{Lipid}] = 0.5 \text{ mM}$) durch Zugabe von wt α S ($[\alpha\text{S}] = 1 \text{ }\mu\text{M}$) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Gemessen wurde die Zunahme der Intensität der Lichtstreuung auf Grund der Zunahme der Vesikeldurchmesser in Lösung.

Der Einfluss des C-Terminus von α -Synuclein auf die Kinetik der Vesikelfusion

Um nun festzustellen, ob die Hemmung der Vesikelfusion allein auf die Stabilisierung der Vesikelmembran und die Faltung des N-Terminus von α S zurückzuführen ist oder auf die elektrostatische Abstoßung des negativ geladenen C-Terminus mehrerer an Vesikel gebundener Proteine, wurden Versuche mit einer C-terminal trunkierten Variante von α S durchgeführt. Hierzu wurde eine C-terminale Deletionsmutante konstruiert, der die letzten 24 Aminosäuren des negativ geladenen Proteins fehlten. Abb. 3-41 zeigt die Fusionskinetik von DPPC-SUV in Abwesenheit und unter Zugabe von Protein. Offenbar hat die Entfernung des negativ geladenen, ungefalteten Teils des Proteins keinerlei Auswirkung auf die Fusionskinetik der DPPC-SUV. Erstaunlicherweise sind die Kinetiken für das Vollängenprotein sowie für die C-terminale Deletionsmutante quasi identisch, was für eine starke Rolle des gefalteten N-Terminus in der Fusionshemmung spricht.

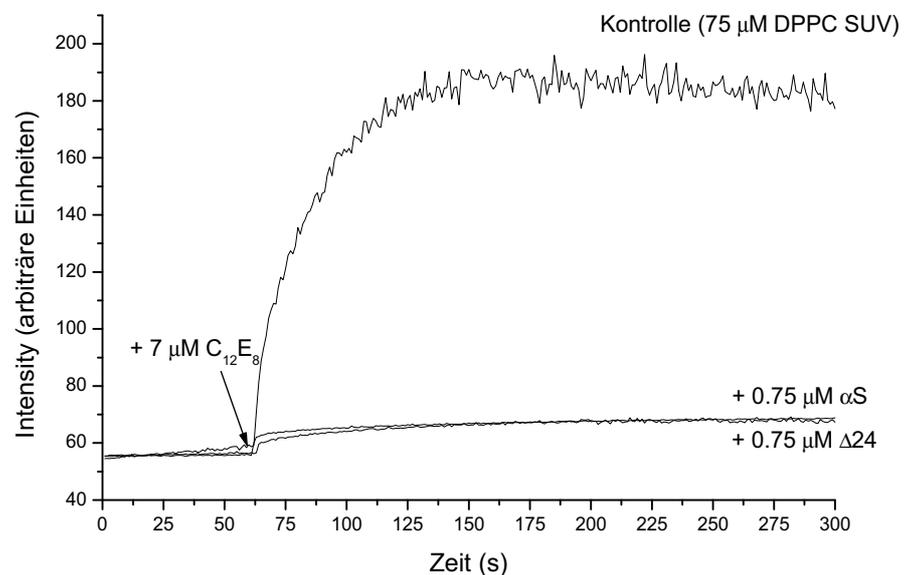


Abb. 3-41 Hemmung von Lipidvesikelfusion durch Zugabe von wt- α S und der C-terminalen Deletionsmutante Δ 24 bei 20 °C. Gemessen wurde die Zunahme der Intensität der Lichtstreuung auf Grund der Zunahme der Vesikeldurchmesser in Lösung. Ausgelöst wurde die Fusion der DPPC ([Lipid] = 75 μ M) SUV durch Zugabe von 7 μ M $C_{12}E_8$.

3.2.3 Der Einfluss des N-Terminus von α -Synuclein auf Faltung und Lipid-Interaktion

Da die in dem Lipid-bindenden N-Terminus von α S vorhandenen Wiederholungssequenzen (Abb. 3-24) scheinbar eine wichtige Rolle für Lipidbindung und korrekte α -helikale Faltung des gebundenen Proteins spielten, wurde nun ein Fragment untersucht, dass mit 28 Aminosäuren eine vergleichbare Länge zu den bisher untersuchten Peptiden aufwies, allerdings drei statt bisher zwei Wiederholungssequenzen beinhaltete. Auch dieses Fragment wurde mittels CD-Spektroskopie auf mögliche Faltung in Wechselwirkung mit Detergenzmizellen und Lipidvesikeln untersucht. Getestet wurde dabei die Interaktion mit SDS-Mizellen, DPPC, POPC/POPG, DPPC/DPPG, EYSM/POPC/Cholesterin und DSPC/DLPC-SUV im Temperaturbereich von 60-20 °C. Das Ergebnis war jedoch nicht eine Zunahme an Faltung und Lipidinteraktion, wie man es auf Grund der zusätzlichen Wiederholungssequenz erwarten könnte, sondern vielmehr eine drastische Reduktion. Abb. 3-42 vergleicht die Mean Residue Ellipticities von α S, Peptid 1-25 und Peptid 9-36 gemessen mittels CD-

Die Lipidinteraktion des Fragments 9-36 im Vergleich mit 1-25

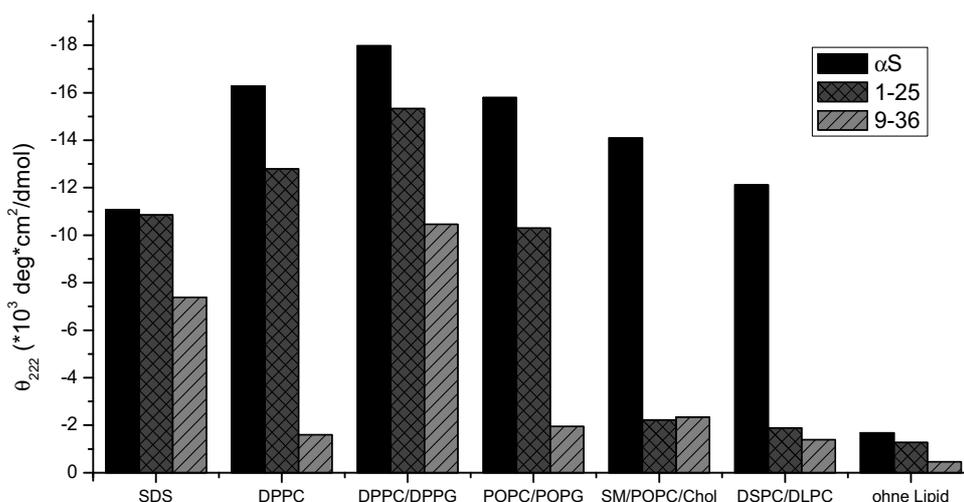


Abb. 3-42 Vergleich der Mean Residue Ellipticities für wt- α S sowie der Fragmente 1-25 und 9-36 bei 20 °C in Interaktion mit Lipid-SUV. Die Proteinkonzentration betrug 6 μ M für wt- α S sowie 30 μ M für die Peptidfragmente. Die Lipidkonzentration war in allen Fällen 5 mM, die SDS-Konzentration 4 mM.

Spektroskopie bei 20 °C unter Zugabe von SDS und verschiedenen Vesikelsorten. Das Fragment 1-25 verhält sich wie das Volllängenprotein was Faltung angeht. Eine Ausnahme bildet die Interaktion mit „Lipid-Raft“ und DSPC/DLPC-SUV, die auch bei dem Fragment 9-36 keine Faltung auslösen. Das Fragment 9-36 zeigt ausserdem

nur eine schwache α -helikale Faltung in Gegenwart von SDS-Mizellen und DPPC/DPPG-SUV. Beide θ_{222} -Werte reichen bemerkenswerterweise nicht an das 3 Aminosäuren kürzere Fragment 1-25 heran, welches eine Wiederholungssequenz weniger besitzt. Gleichzeitig zeigt das Fragment 9-36, im Gegensatz zu Fragment 1-25, keinerlei Faltung nach Zugabe von DPPC und POPC/POPG-SUV. Offensichtlich ist für die korrekte Lipidbindung und Faltung nicht die Anzahl der Wiederholungssequenzen, sondern die Lokalisierung des Peptidfragments in der Sequenz der beiden Helices verantwortlich, wie der Vergleich der Lipidinteraktion von 1-25 mit 9-36 verdeutlicht.

Die Lipidinteraktion einer chemisch trun-kierten Variante von α -Synuclein

Als nächstes schien die Frage von Interesse, ob die verminderte α -helikale Faltung des Fragments 9-36 im Vergleich zu dem Fragment 1-25 auf das Fehlen der ersten acht N-terminalen Aminosäuren zurückzuführen sei. Um diese Hypothese zu testen wurde das Voll-längenprotein mit Bromcyan behandelt, einer Chemikalie die Peptidbindungen selektiv hinter Methionin spaltet und den Vorteil hatte die verkürzte Variante durch Aufreinigung innerhalb von drei Tagen ohne aufwendige Mutagenese zu liefern. Da in der Aminosäuresequenz von α S Methionine nur an den Positionen 1, 5 und 116 vorhanden sind, ergibt eine chemische Spaltung auf diese Weise die

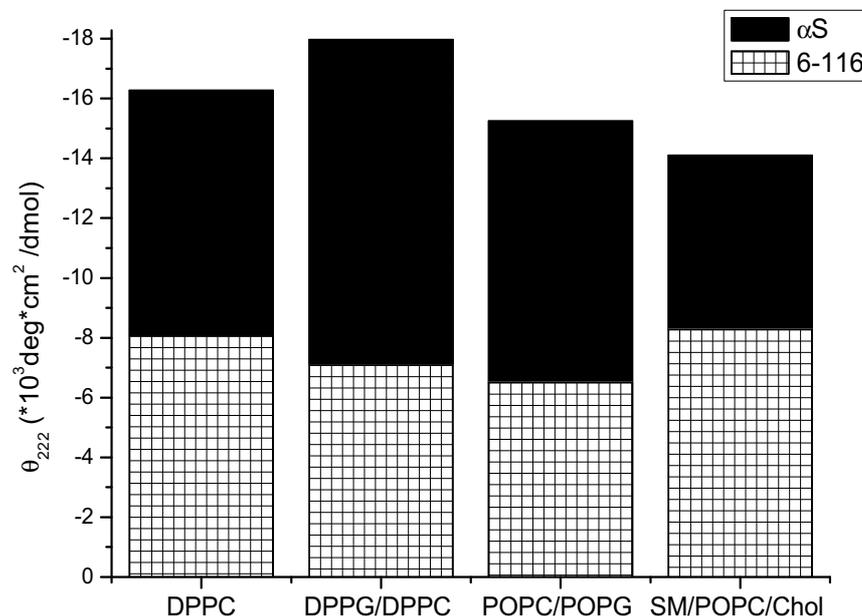


Abb. 3-43 Mean Residue Ellipticity für wt- α S sowie des N- und C-terminal trun-kierten Fragments 6-116 bei 20 °C in Interaktion mit Lipid-SUV gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 6 μ M für wt- α S sowie 8.5 μ M für das Fragment 6-116. Die Lipidkonzentration war in allen Fällen 5 mM.

Sequenzfragmente 1, 2-5, 6-116 und 117-140. Da dem Fragment 6-116 die ersten fünf N-terminalen Aminosäuren fehlen und dem fast vollständig abgetrennten negativ geladene C-Terminus bisher keinerlei Rolle in der Lipidinteraktion zugeordnet werden konnte, schien dieses ein einfaches Modell zu sein, die Rolle der ersten N-terminalen Aminosäuren in der Lipidinteraktion und Faltung des Vollängenproteins zu untersuchen. Abb. 3-43 zeigt die Mean Residue Ellipticity von α S, und Fragment 6-116 gemessen mittels CD-Spektroskopie bei 20 °C unter Zugabe von verschiedenen Vesikelsorten. Offenbar ist auch bei diesem Fragment die Faltung im Vergleich zum wt-Protein drastisch reduziert, der Wert der Mean Residue Ellipticity beträgt ca. die Hälfte des Vollängenproteins.

Diese Ergebnisse sowie die Experimente mit dem Fragment 9-36 lassen sich leicht erklären, wenn man annimmt, dass die ersten fünf Aminosäuren für die korrekte Faltung der kompletten Helix N notwendig sind. In diesem Fall würde das Fragment 9-36 überhaupt nicht falten und sich bei dem Fragment 6-116 nur die Helix C ausbilden, was zu einer Halbierung des CD-Signals führen würde. Da nun aber aus den CD-Spektroskopiemessungen nicht hervorging, ob die Halbierung der Mean Residue Ellipticity aus einer reduzierten Faltung der komplett gebundenen Proteine oder einer kompletten Faltung mit einem verminderten Anteil an gebundenem Protein herrührt, war eine detailliertere thermodynamische Analyse der Bindung des Fragments 6-116 mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) angebracht. Hierbei wurde zu einer 9 μ M Lösung des Fragments 6-116 schrittweise je 7 μ l einer 40 mM Stammlösung von DPPC-SUV gegeben, deren Lipide bei der Temperatur von 20 °C in einer Gelphase vorliegen. Die Integration der detektierbaren Bindungswärmen wurden nun auf die Molarität der Lipide normiert und aus deren sigmoidem Verlauf (Abb. 3-44) die Gleichgewichtskonstante K_a ($2.22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$), die Anzahl der gebundenen Lipide pro Protein ($N = 122.7$) sowie die Bindungsenthalpie ($\Delta H^0 = 35.56 \text{ kcal/mol}$) der Assoziation des Fragments 6-116 mit den SUV bestimmt (siehe "Kalorimetrie" auf Seite 41). Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes für die Assoziation von α -Synuclein mit Lipid (Glg 3.1)

$$K_a = \frac{[\alpha S_0] - [\alpha S_{\text{ungebunden}}]}{[\alpha S_{\text{ungebunden}}] \cdot [\text{Lipidbindestelle}]} \quad \text{Glg. 3.1}$$

$[\alpha S_0]$: Anfangskonzentration des Protein ohne Lipidzugabe; $[\alpha S_{\text{ungebunden}}]$: Konzentration des freien Proteins; $[\alpha S_0] - [\alpha S_{\text{ungebunden}}]$: Konzentration des Proteins gebunden an Lipidbindestelle; $[\text{Lipidbindestelle}]$: Konzentration der freien Bindestellen für das Protein an der SUV-Oberfläche

kann nun der Anteil des an Vesikel gebundenen Proteins bestimmt werden. Hierzu

wird aus Glg 3.1 die Konzentration des ungebundenen Proteins bestimmt und daraus das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenen Protein berechnet. Als Konzentration der Lipidbindestellen wird die Gesamtkonzentration der eingesetzten Lipide durch die Anzahl der pro Protein gebundenen Lipide ($N = 122.7$) geteilt und mit

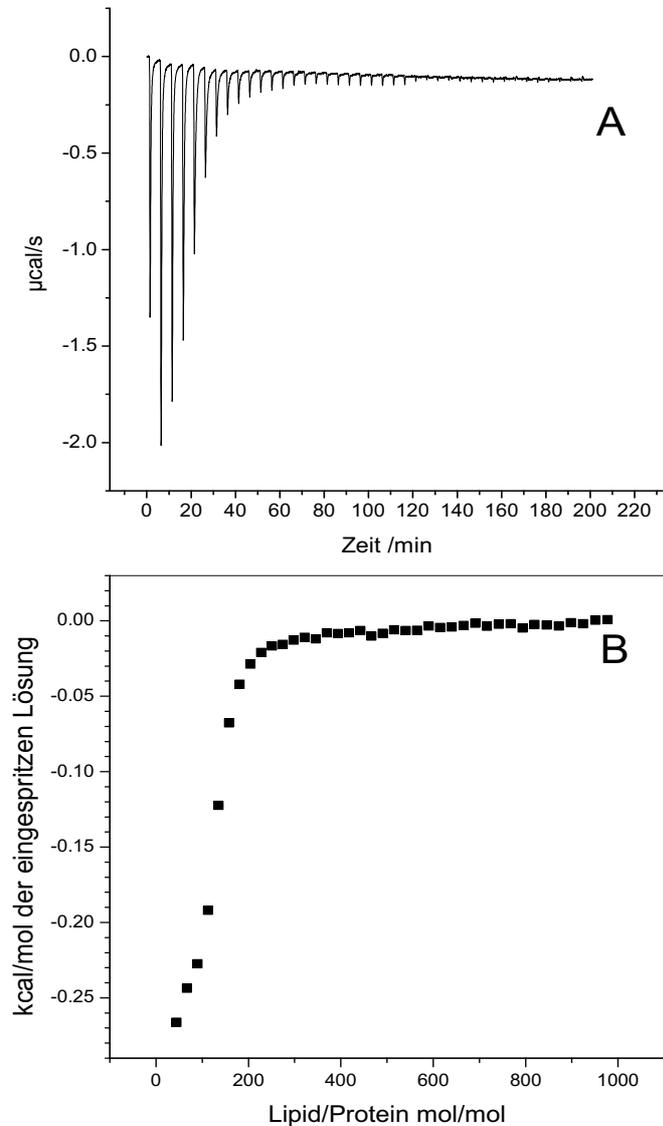


Abb. 3-44 Isotherme Titrationskalorimetrie von Fragment 6-116 unter Zugabe von DPPC-SUV. A: Wärmefluss durch Titration von Aliquoten einer DPPC-SUV-Lösung ($[DPPC] = 40 \text{ mM}$) in eine Lösung von Fragment 6-116 in Puffer ($9 \mu\text{M}$ in eine Volumen von 1.41 ml) bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$. B: Molare Wärmen berechnet aus der Integration der individuellen Wärmefluss-signale gegen das molare Verhältnis von Lipid zu Protein in der Messzelle.

0.6 multipliziert. Dieser letzte Schritt trägt der Tatsache Rechnung, dass wahrscheinlich nur die äussere Membranschicht des Vesikels an der Bindung teilnimmt. Im Falle

von kleinen Schallvesikeln wird dies mit 60% der Gesamtlipide angenommen [231]. Unter den experimentellen Bedingungen die während der CD-Spektroskopie ([6-116] = 8.5 μ M, [DPPC] = 5 mM) angewandt wurden ergibt sich daraus ein Anteil von an Vesikel gebundenem Fragment 6-116 von 98%, was klar für eine annähernd komplette Lipidassoziation des Proteins spricht. Die beobachtete Halbierung des detektierbaren CD-Spektroskopiesignals bei 222 nm kann daher nur erklärt werden, wenn man annimmt, dass in dem Lipid-assoziierten Fragment 6-116 die α -helikale Faltung im Vergleich mit α S halbiert ist.

Eine zielgerichtete Mutagenese zur Bestimmung der genauen Anzahl der für die Bildung der Helix N benötigten N-terminalen Aminosäuren schien nun sinnvoll. Hierzu wurden drei Deletionsmutanten konstruiert, bei denen schrittweise eine N-terminale Aminosäure fehlte. Da für die Expression in *E. coli* die Aminosäure Methionin als erste Aminosäure benötigt wird (da sie gleichzeitig das Startcodon der ribosomalen Translation darstellt), konnten allerdings nur Mutanten konstruiert werden, die aus den Aminosäuren 3-140, 4-140 und 5-140 der Sequenz von α S bestanden. Diese wurden nun erneut mittels CD-Spektroskopie unter Zugabe von

Die α -helikale Faltung von N-terminaler Deletionsmutanten von α -Synuclein

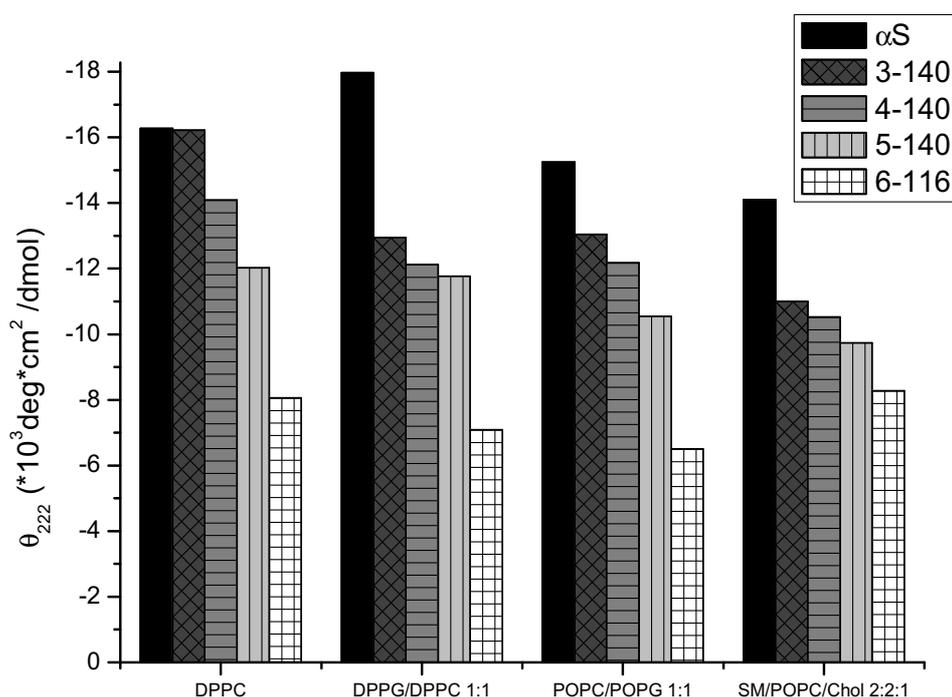


Abb. 3-45 Mean Residue Ellipticity für wt- α S, der N-terminalen Deletionsmutaten sowie des N- und C-terminal trunkierten Fragments 6-116 bei 20 $^{\circ}$ C in Interaktion mit Lipid-SUV. Die Proteinkonzentration betrug 6 μ M für wt- α S sowie 8.5 μ M für die trunkierten Varianten. Die Lipidkonzentration war in allen Fällen 5 mM.

verschiedenen Vesikelsorten untersucht. In Abb. 3-45 sind die gemessenen Mean Residue Ellipticities der Deletionsmutanten unter Zugabe verschiedener Vesikel-sorten zu sehen. Die stufenweise Deletion einzelner Aminosäuren hat eine stufenweise Abnahme der helikalen Faltung zur Folge, die bei der bereits besprochenen Halbierung der Faltung im Falle des Fragments 6-116 endet. Dies erstaunt insofern, als das plötzliche Zusammenbrechen der α -helikalen Faltung als Reaktion auf die Deletion einer bestimmten Aminosäure erwartet wurde. Eine schrittweise Abnahme lässt sich nur durch eine schrittweise Destabilisierung der Helix N erklären, die erst bei dem Fragment 6-116 komplett ist. Bemerkenswerterweise folgen allerdings weder die Deletionmutanten noch die chemisch trunkierte Variante 6-116 der bei den Peptiden und dem Volllängenprotein gefundenen Tendenz, in Gegenwart von DPPC/DPPG-SUV die am stärksten ausgeprägte Faltung zu zeigen. Vielmehr reagieren diese Varianten auf die Interaktion mit DPPC-SUV unterhalb der Phasenübergangstemperatur mit der stabilsten α -Helix Bildung. Im Gegensatz zu den Fragmenten reagieren die Deletionsmutanten allerdings mit Vesikeln deren Membranen laterale Phasenseparation aufweisen, wie im Fall der Mischung EYSM/POPC mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ gezeigt werden kann. Die Bildung von nur einer Helix scheint genug zu sein um diese spezielle Interaktion zu ermöglichen.

3.2.4 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht festzustellen, wie die in der Aminosäuresequenz vorkommenden KTKEGV-Wiederholungssequenzen Einfluss auf die Wechselwirkung des Proteins mit Lipidmembranen hat. Die genauere Lokalisation der für die dreidimensionale Struktur des Lipid-gebundenen Proteins benötigten Motive ist insofern wichtig, als die konformationelle Stabilität sowohl für die physiologische Funktion wie auch die pathologische Rolle von α S in dem Morbus Parkinson von Bedeutung zu sein scheint. Die helikale Faltung hat dabei eine spezielle Bedeutung, wie durch die Lage aller drei familiärer, einen frühen Ausbruch der Krankheit verursachenden α S-Mutanten innerhalb der N-terminalen Lipidbindungsdomäne impliziert wird. So könnte die Lipidbindung der Aggregation des Proteins durch Stabilisierung der Faltung und Verringerung der zytosolischen Konzentration entgegenwirken.

Bestimmung der verschiedenen Bindungsarten der Peptide

Als das interessanteste der untersuchten Fragmente von 25 Aminosäuren Länge zeigte sich das Peptid 1-25, da es die meisten Charakteristika des Volllängenproteins beinhaltet. So stimulieren sowohl negativ geladenen Vesikel wie auch thermotrope Phasenübergänge bei $T < T_m$ in gekrümmten Membranen eine stabile α -helikale

Konformation in dem Peptid. Dies ist ausserdem begleitet von einer Stabilisierung der sich im Phasenübergang befindlichen Membranen sowie einer Fusionshemmung der betroffenen Vesikelarten, wie durch die Versuche zur Fusionskinetik wie auch durch die ESR-Experimente demonstriert werden konnte. Ähnliche Eigenschaften zeigte das Peptid 31-55, welches auch eine Stabilisierung von DPPC-Membranen in den ESR-Experimenten bewirkte. Dieses Fragment zeigte jedoch keinerlei Faltung auf Zugabe von negativ geladenen Vesikeln. Dies zeigt eindrucksvoll, dass die Faltung von α S nicht allein durch eine elektrostatische Wechselwirkung der positiv geladenen Aminosäureseitenketten, die sich durch die Faltung hauptsächlich auf einer Seite der amphipatischen Helix befinden, und eventuell vorhandenen negativen Lipidkopfgruppen zustande kommt, sondern dass auch Ladungsunabhängige Bindung stattfindet, was bereits *in vivo* gezeigt werden konnte [232]. Da dieses Fragment, wie auch das Fragment 41-65, ausserdem α -helikale Faltung im Zusammenspiel mit SDS-Mizellen zeigte, scheint es ausgeprägte Unterschiede der Wechselwirkung der Peptide, und damit auch des Volllängenproteins, mit negativ geladenen Vesikeln und negativ geladenen Detergenzmizellen zu geben. Dies sollte in Hinsicht auf die Popularität solcher Mizellen als Vesikelmimetika bei zukünftigen Experimenten beachtet werden.

Erstaunlicherweise ergab sich ausserdem ein Unterschied in der Wechselwirkung der Peptide mit zwitterionischen Lipidvesikeln. So reagierten die Peptide 1-25 und 31-55 auf den thermotropen Phasenübergang in DPPC-SUV, nicht jedoch auf die Phasenseparation die in Vesikeln bestehend aus DSPC/DLPC und EYSM/POPC/Cholesterin auftreten. Da im Falle des Volllängenproteins die Beseitigung von Packungsstörstellen als mögliche Ursache für die Faltung von α S unter Zugabe von beiden Arten von Vesikel diskutiert wird [137], verwundert dies etwas. Die Packungsstörstellen, die sich in einer stark gekrümmten Membran auf Grund der Ausbildung einer Gelphase ausbilden, sollten sich nicht elementar von denen unterscheiden, deren Bildung durch Ausbildung einer geordneten Phase neben einer fluiden Phasen ausgelöst werden. Offensichtlich sind im letzteren Fall längere Fragmente des Proteins notwendig um die Störstellen zu beseitigen, da sowohl das Volllängenprotein wie auch die N-terminal verkürzten Varianten in der Lage waren diese Membranen unter Ausbildung von α -Helices zu stabilisieren, wie an den betreffenden CD-Spektren (Abb. 3-45) und Vesikelfusionskinetiken (Abb. 3-40) zu sehen war. Eine alternative Erklärung, nach der das Zusammenwirken beider Helices für die Stabilisierung phasenseparierender Membranen von Nöten ist, steht hierbei im Widerspruch mit der Beobachtung, dass die chemisch trunkierte α -Synucleinvariante 6-116 sowohl α -helikale Faltung unter Zugabe von DSPC/DLPC ausbildet (Abb. 3-45), wie auch die Vesikelfusion dieser Art von SUV mit ähnlicher Effizienz wie das

Volllängenprotein hemmt. Da dieses Fragment laut CD- und ITC-Experimenten jedoch nur über *eine* intakte α -Helix verfügen sollte, kann ein kooperativer Effekt beider Helices als Ursache für die Stabilisierung von phasenseparierenden Vesikeln ausgeschlossen werden.

Ein weiterer interessanter Effekt wurde unter Zugabe der DPPC/DPPG-SUV gefunden, einem System, dass nicht nur eine negative Oberflächenladung, sondern ausserdem einen kooperativen thermotropen Phasenübergang aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination beider Effekte zu einer starken Stabilisierung der α -Helices des gebundenen Proteins führte, bzw. als einzige Vesikelsorte Faltung in bestimmten Peptiden auslösen konnte. Dies wird bei Peptid 31-55 deutlich, bei dem fast keine helikale Faltung unter Zugabe von DPPC-SUV bzw. gar keine Faltung unter Zugabe von POPC/POPG-SUV detektierbar ist (Tab. 3-20). Gleiches gilt für das Fragment 41-65, in welchem keinerlei helikale Faltung durch Kontakt mit beiden Vesikelarten ausgelöst wird. Zusätzlich konnte in wt α S, Peptide 1-25 sowie den N-terminal trunkierten Varianten ein additiver Effekt beider Vesikeleigenschaften festgestellt werden (Abb. 3-30, Abb. 3-32). Daher sollten beide Effekte nicht als getrennt betrachtet werden, da sie offensichtlich kooperativ sind. Man könnte sich dies durch vollkommen unterschiedliche Bindungsmodi des Proteins an die gekrümmte Membran vorstellen (Abb. 3-46). In dem ersten Bindungsmodus, in Kontakt mit negativ geladenen Vesikeln, wären die positiv geladenen Seitenketten des Proteins direkt mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Phospholipide assoziiert,

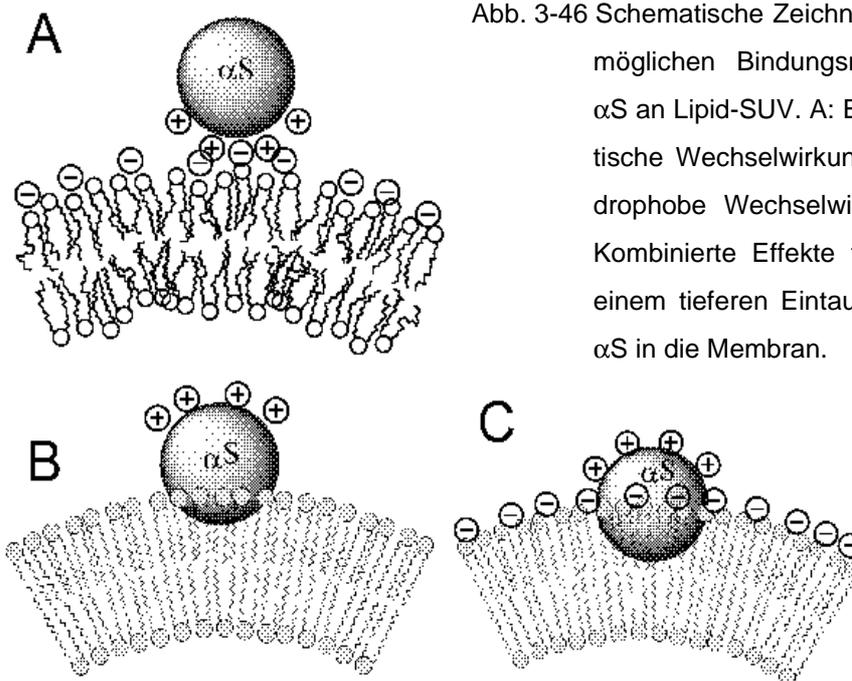


Abb. 3-46 Schematische Zeichnung der 3 möglichen Bindungsmodi von α S an Lipid-SUV. A: Elektrostatische Wechselwirkung; B: Hydrophobe Wechselwirkung; C: Kombinierte Effekte führen zu einem tieferen Eintauchen von α S in die Membran.

während der Rest des Proteins nicht in die Membran integriert ist (Abb. 3-46 A). Im zweiten Modus, in Assoziation mit zwitterionischen Vesikeln unterhalb deren Phasenübergangstemperatur, wäre die Seite der amphipatischen Helices ohne positive Überschussladung in die Membran integriert und baut die ungeladenen Seitenketten in die Packungsstörstellen ein, während die geladene Seite den Kontakt mit der Wassergrenzfläche sucht (Abb. 3-46 B). Im dritten Modus schliesslich, bei Kontakt mit einer Membran die beide Charakteristika vereinigt, ist die positiv geladene Seite der amphipatischen Helices in Kontakt mit der negativ geladenen Kopfgruppe, während der Rest des Proteins tief in die Membran eintaucht. Dies sollte, wie beobachtet, zu einer starken Stabilisierung der dreidimensionalen Proteinstruktur führen (Abb. 3-46 C). Da jedoch keine ausreichenden Experimente durchgeführt wurden, um dieses Modell zu stützen, bleibt es eine Arbeitshypothese. Möglich wäre eine Überprüfung dieser Bindungsmodi über die Bestimmung der Eindringtiefe einer mit einem Radikal markierten Seitenkette in eine Membran mit ebenfalls paramagnetisch markierten Lipiden mittels ESR. Diese Experimente wurden im Ansatz durchgeführt, konnten jedoch leider auf Grund von Zeitmangel nicht mehr zuende geführt werden.

Die Kooperativität dieser drei Faktoren für die Faltung von α S durch Assoziation mit Lipid-SUV, negative Oberflächenladung, Ausbildung von Packungsstörstellen, sowie eine stark positiv gekrümmte Membranfläche (da ein grösserer Vesikeldurchmesser mit verminderter Faltung einherging, Tab. 3-20) hat bedeutende Implikationen für die Funktion von α S. So sollte das Protein mit Vorliebe an kleine, negativ geladene Lipidvesikel mit hohem Sphingomyelin und Cholesterinanteil binden und deren Membranen stabilisieren. Ein hoher Sphingomyelin- und Cholesteringehalt ist typisch für synaptische Vesikel [135]. Da das Protein ausserdem hauptsächlich in präsynaptischen Endköpfchen exprimiert wird [233][234][235][236], wo es offensichtlich wichtige Funktionen die Plastizität des synaptischen Vesikel Pools betreffend wahrnimmt [130][141], ist es wahrscheinlich, dass die physiologische Funktion von α S in der Stabilisierung von synaptischen Vesikeln liegt, um vorzeitige Fusion untereinander oder dieser mit der präsynaptischen Membran zu verhindern. Interessanterweise ist die antifusionogene Wirkung des Proteins auf kleine Vesikel bereits *in vivo* nachgewiesen worden [139][140], hier wurde die vermutlich physiologische Funktion des Proteins allerdings als möglicher pathogener Mechanismus interpretiert, da sich die Überexpression von α S für den verwendete Modellorganismus, *Saccharomyces cerevisiae*, als lethal erwies. Da dies jedoch durch Blockierung des vesikulären Transports durch das normalerweise in diesem Organismus nicht exprimierte α S vermittelt wurde, ist anzuzweifeln, ob dies das tatsächlich einen Vergleich mit neuronalem Zelltod erlaubt.

**Vesikelfusions-
hemmung von α -
Synuclein und
dessen Frag-
menten**

Da nun vermutet wurde, dass eine mögliche physiologische Funktion von α S in der Plastizitätserhaltung der synaptischen Vesikel [141][237][238][239], sollte dies näher *in vitro* untersucht werden. Es galt herauszufinden, ob die N-terminale Faltung wirklich über Insertion der ungeladenen Aminosäuren in die Packungsstörstellen der Lipidmembran eine Fusion der gekrümmten Vesikel hemmt (Abb. 3-47 A). Eine alternative Erklärung wäre dadurch gegeben, dass der N-Terminus nur die Bindung des

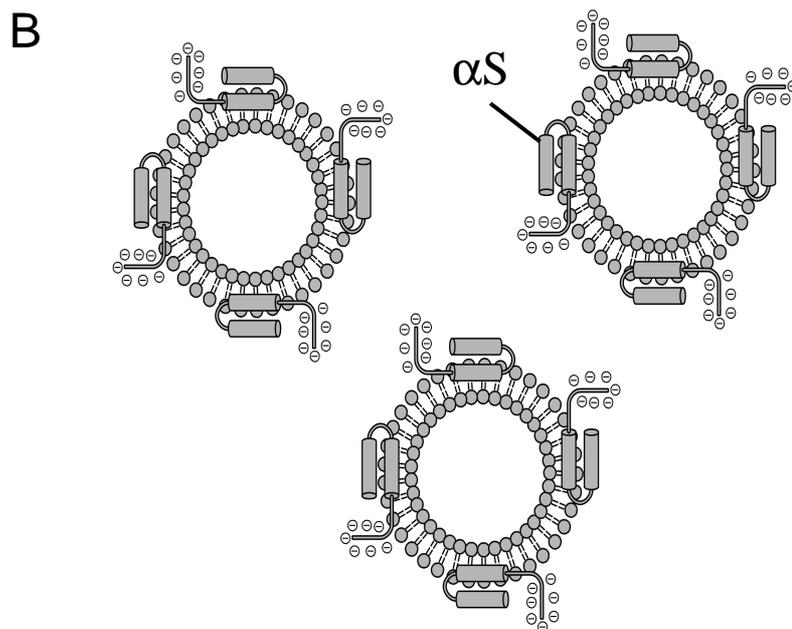
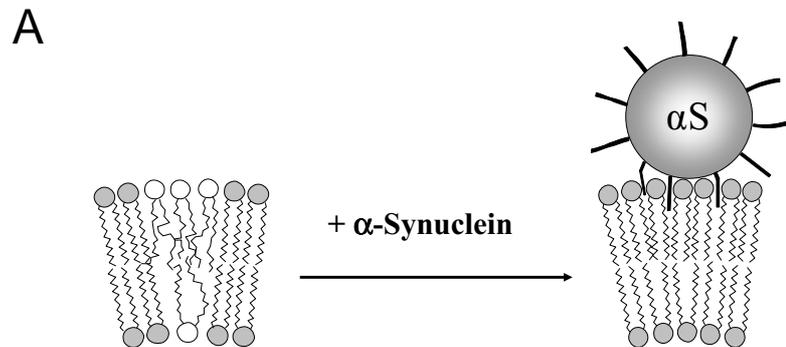


Abb. 3-47 Schematische Zeichnungen zur Darstellung verschiedener Modelle zur Hemmung der Fusion von SUV durch das Protein α S. A: Entfernung der Packungsstörstellen in Vesikeln mit Lipiden in der Gelphase durch Insertion der hydrophoben Seitenketten [164]. B: Elektrostatische Repulsion der negativ geladenen C-Termini von an Vesikel gebundenen α -Synucleinen

Proteins an die Vesikel vermittelt und der nicht gefaltete negativ geladenen C-Terminus durch elektrostatische Abstoßung die Fusion mehrerer Vesikel mit gebundenem Protein verhindert (Abb. 3-47 B). Da das C-terminal trunkierte Fragment Δ 24

in demselben Maße Vesikelfusion hemmte, wie es das Volllängenprotein tat (Abb. 3-41), ist diese Möglichkeit jedoch leicht auszuschliessen. Das stimmt mit der Beobachtung überein, dass das Fragment 1-25 auch eine fusionshemmende Wirkung (Abb. 3-39), sowie eine Stabilisierung der DPPC-Membranen in der Gelphase (Abb. 3-38) zeigt. Auch dieses Peptid verfügt nicht über die negativ geladene C-terminale Domäne des Volllängenproteins. Da es ausserdem nur die Vesikelfusion von SUV verlangsamt, auf deren Kontakt es mit α -helikaler Faltung reagiert, also die Faltung eine notwendige Bedingung für Beeinflussung der Vesikelfusion ist, scheint dies der hauptsächliche stabilisierende Faktor zu sein. Deutlich wird dies auch in Abb. 3-39, in dem es eine Korrelation zwischen dem Maß an Fusionshemmung der einzelnen Peptide mit deren Fähigkeit zur α -helikaler Faltung (Tab. 3-20) zu geben scheint.

Als dem Volllängenprotein in seinen Lipidwechselwirkungen am nächsten zeigte sich wie bereits erwähnt das Peptid 1-25, sowie das Fragment 31-55. Auffällig ist dabei, dass diese Fragmente die ersten Aminosäuren einer der beiden amphipatischen Helices beinhalten. Dies scheint für die korrekte helikale Faltung sehr entscheidend sein. Dies ist insofern interessant, als das ähnliche Ergebnisse für Apo AI existieren, ein Apolipoprotein, dass wegen seiner Lipidinteraktion und Ausbildung von amphipatischen Helices aus Wiederholungssequenzen mit gleichzeitiger Stabilisierung der gebundenen Membranen [240][241][242] grosse Ähnlichkeiten zu α -Synuclein aufweist. Auch bei diesem Protein zeigt sich keine direkte Abhängigkeit der Faltung von der Anzahl der Wiederholungssequenzen [243] aber starke konformationelle Änderungen sobald der N-Terminus trunziert wurde [244][245].

Lokalisation der für die Lipidwechselwirkung wichtigen Domänen

Die Wiederholungssequenz KTKEGV der Lipid-bindenden N-terminalen Domäne scheint dabei eine geringere Rolle zu spielen als durch bisherige Literatur suggeriert wurde [246][247][248]. In dem Fragment 9-36, das 3 Aminosäuren länger ist und 3 statt nur im Vergleich zu Peptid 1-25 2 KTKEGV Sequenzen beinhaltet, konnte fast keine α -helikale Faltung durch Zugabe von Lipid-SUV beobachtet werden. Im Vergleich zum Volllängenprotein scheint ausserdem die Entfernung der ersten 5 Aminosäuren sehr einschneidende Folgen für die Bildung der Helix N zu haben. Überraschenderweise konnte allerdings bei der darauf folgenden schrittweisen Deletion der N-terminalen Aminosäuren keine bestimmte Schwelle festgestellt werden, ab derer die Faltung der Helix N zusammenbricht. Die sukzessive Entfernung der N-terminalen Aminosäuren war von einer schrittweisen Verringerung der α -helikalen Faltung bis zum Lysin an der Position 6 begleitet (Abb. 3-46). Ein näherer Blick auf die Aminosäuresequenz von α S (Abb. 3-24) verrät keinerlei spezielle Anhäufung einer bestimmten Art von Aminosäure. Eine mögliche elektrostatische Wechselwir-

kung der Aminosäuren Aspartat an der Position 2 und Lysin und der Position 6 könnte jedoch die helikale Sekundärstruktur stabilisieren, da vereinzelte Punktmutationen in geladenen Aminosäuren teilweise dramatische Strukturänderungen zur Folge haben [249][250][251] und ausserdem beide Helices laut Literatur eine Steigung von ca. 3.7 Aminosäuren pro Windung besitzen [252][253], was zu einer räumlichen Annäherung der beiden geladenen Aminosäurereste führen würde. Zusätzlich könnten die folgenden 2 Aminosäuren, Valin und Alanin mit dem hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht wechselwirken oder die freie Gibbs-Energie der Faltung durch paarweise, hydrophobe Zusammenballung minimieren, obwohl solche Effekte schwer zu quantifizieren sind und üblicherweise als schwach angesehen werden [254][255]. Auch wenn man diese energetischen Beiträge berücksichtigt, ist die schrittweise Destabilisierung der α -Helix erstaunlich und sollte näher mit strukturellen Methoden welche die direkte Wechselwirkung des Proteins mit der Membran detektieren können, wie ESR oder zweidimensionale NMR-Spektroskopie untersucht werden. Auch wäre zu überlegen, ob diese ersten 5 Aminosäuren eine allgemein stabilisierende Wirkung auf amphipatische Helices haben, was durch Verknüpfung dieser kurzen Sequenz mit anderen Fragmenten untersucht werden könnte.

3.3 Wechselwirkung von alpha-Synuclein mit planaren Membranen

Allgemeine Bemerkungen

Eines der hauptsächlichen pathologischen Kennzeichen einer Erkrankung an Morbus Parkinson sind intrazelluläre, fibrilläre Proteinablagerung, die sog. „Lewy-Bodies“ in der Pars compacta der Substantia nigra der betroffenen Patienten [74][96][256]. Diese Ablagerungen scheinen allerdings eher in einem qualitativen als quantitative Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Krankheitsentwicklung zu stehen, da es keine direkte Korrelation zwischen Zahl und Grösse dieser Ablagerungen und Neurotoxizität zu geben scheint [257][258][259][260]. Nach heutigem Stand der Forschung wird vielmehr angenommen, dass nicht die fibrillären Aggregate, sondern sog. Oligomere, Zwischenstufen auf dem Weg von dem monomeren zum fibrillären Protein, die neurotoxischen Partikel darstellen [85][86][87]. Die Wirkungsweise dieser Oligomere wird immer noch debattiert, auf Grund ihrer porenförmigen Gestalt und ihrer Hydrophobizität scheint eine Permeabilisierung der zellulären Membran als pathogener Mechanismus wahrscheinlich [261][262]. Diese mögliche Lipidinteraktion der Aggregate von α S festzustellen war Ziel der folgenden Experimente. Da die Oligomere eine sehr dynamische und schwer zu isolierende Aggregationspezies darstellen, wurden zunächst Experimente zur Aggregation von

α S durchgeführt, um das Finden einer Methodik zur Oligomerendarstellung zu erleichtern.

3.3.1 Aggregationsstudien von α -Synuclein und dessen Fragmenten

Zunächst wurde die Kinetik der Aggregation von dem α S-Monomer zu den Fibrillen mittels Fluoreszenz-Spektroskopie verfolgt. Als Sonde wurde hierbei Thioflavin T benutzt, ein Fluoreszenzfarbstoff dessen Anregungs- und Emissionsmaximum von der Bindung an fibrilläre Proteinstrukturen moduliert wird und daher als Marker für die Entstehung von amyloiden Ablagerungen Verbreitung findet [263][264][265]. Mit Hilfe einer Fluoreszenzzunahme bei 485 nm kann somit leicht die Entstehung von amyloiden Fibrillen über längere Zeiträume verfolgt werden. Abb. 3-48 zeigt die Zunahme einer 300 μ M α S-Lösung die über einen Zeitraum von einer Woche bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert wurde. Deutlich zu sehen ist eine Verzögerung des Anstieges der Thioflavin T Fluoreszenz bis zum zweiten Tag, bis zu dem sich anscheinend keine detektierbare Fibrillen gebildet haben. Das Fibrillenwachstum, das anschliessend detektiert wird, folgt einem klassischen sigmoiden Verlauf, den man für ein keimbildungsabhängiges Wachstum erwarten würde.

Aggregationskinetiken von α -Synuclein

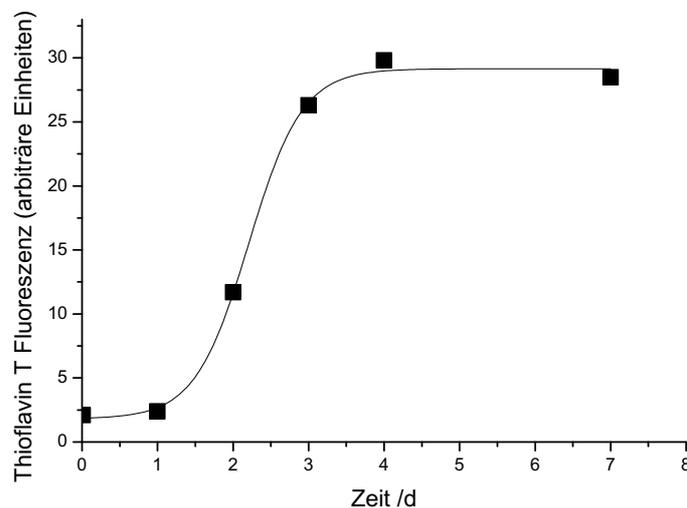


Abb. 3-48 Bestimmung der α S-Aggregationskinetik mittels Thioflavin T Fluoreszenz. Die Zunahme in Fluoreszenz wird ausgelöst durch Bindung an entstehende Proteinfibrillen von α S ($[\alpha$ S] = 300 μ M). Die Proteinproben wurden über 1 Woche bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert.

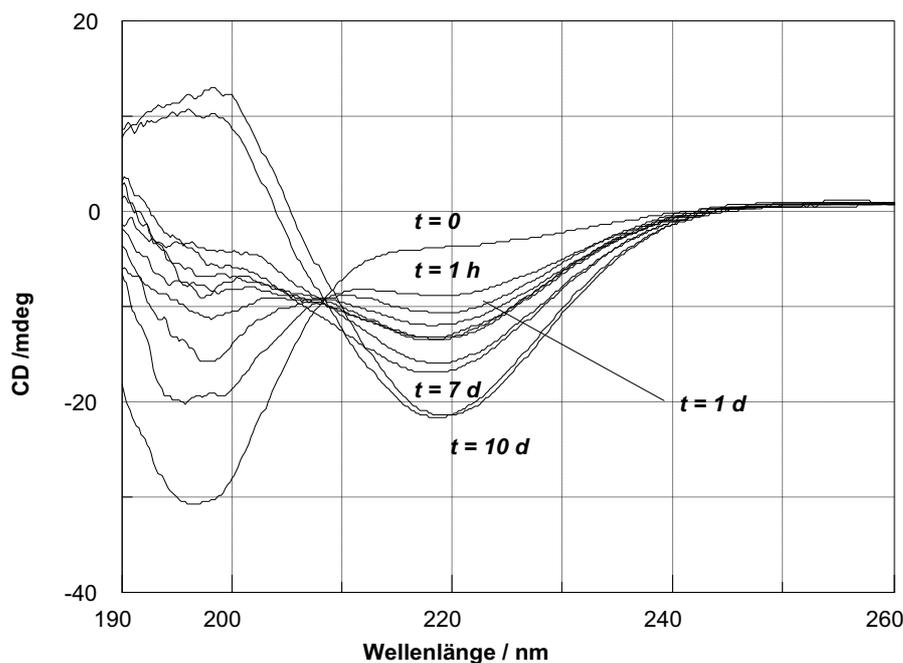


Abb. 3-49 CD-Spektren von α S ($[\alpha$ S] = 300 μ M) während eines Aggregationsansatzes. Die Proteinprobe wurde 10 Tage bei 37 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen gemessen. Abgebildet sind die Spektren bei $t = 0$, $t = 1$ h, $t = 1$ d, $t = 2$ d, $t = 3$ d, $t = 4$ d, $t = 5$ d, $t = 6$ d, $t = 7$ d, $t = 10$ d.

Interessanterweise zeigen die über denselben Zeitraum aufgenommenen CD-Spektren ein etwas differenzierteres Bild. Hier ist eine starke Veränderung der Sekundärstruktur von α S von der ersten Stunde an zu sehen (Abb. 3-49). Offensichtlich kommt es bereits ab der ersten Stunde zu einem Übergang der Faltung von Random-coil zu einer nicht näher definierbaren Struktur, die allerdings nach 7 Tagen die Charakteristiken einer β -Faltblattstruktur aufweist. Die fehlende Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin in den ersten Tagen deutet ausserdem auf eine strukturell anders geartete Aggregationspezies hin. Bei dieser handelt es sich wahrscheinlich um kleinere Aggregate mit leicht von der Sekundärstruktur der Fibrillen abweichender Konformation. Es handelt sich hierbei vermutlich um die bereits besprochenen Oligomere.

Um eine nähere Charakterisierung der Struktur der vermeintlichen Oligomere vornehmen zu können, wurden nun Transmissionselektronenmikroskopiebilder (TEM) der einzelnen Aggregate angefertigt. Die Proteinfibrillen, Abb. 3-50, zeigen dabei die typische langgestreckte Form mit einem Durchmesser von ca. 15 nm. Der Versuch ähnliche elektronenmikroskopische Bilder der Spezies, die während der ersten beiden Tagen die vorherrschende Klasse an α -Synucleinaggregaten

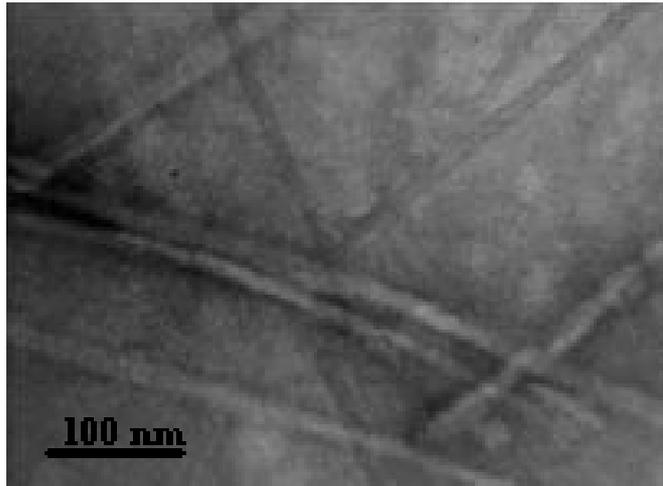


Abb. 3-50 Transmissions-Elektronenmikroskopiebild von mit Uranylacetat angefärbten α S-Fibrillen. Die Fibrillen wurden 10 Tage bei 37 °C inkubiert.

darstellte anzufertigen, scheiterten leider an der Menge des isolierbaren Proteins. Nach intensiver methodischer Studien, wurde jedoch ein Protokoll (siehe "Präparation der α -Synuclein Oligomere" auf Seite 29) gefunden, welches die Isolierung und Aufreinigung grösserer Mengen von frühen Aggregatspezies von α S erlaubte. Dazu wurden Oberflächen, mit denen das Protein in Kontakt kam, grundsätzlich silanisiert, um Verluste durch Assoziation der Aggregate mit Gefäßoberflächen zu vermeiden. Ausserdem erwies sich eine Reduktion der Inkubationstemperatur von 37 auf 0 °C als hilfreich. Dies führte zu einer starken Beschleunigung der Bildung von Aggregaten mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 34 nm (ermittelt mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung). Hierbei handelte es sich vermutlich um Oligomere. Die TEM-Aufnahmen in Abb. 3-51 zeigen kleine punktförmige Aggregate, die einen ungefähren Durchmesser von ca. 15-20 nm aufweisen. Die Auflösung des mit 100 kV Beschleunigungsspannung betriebenen Elektronenmikroskops reichten allerdings leider nicht aus, um nähere Details zur Struktur dieser Aggregate, wie z.B. Ähnlichkeit zu einem porenbildenden Protein [261], festzustellen

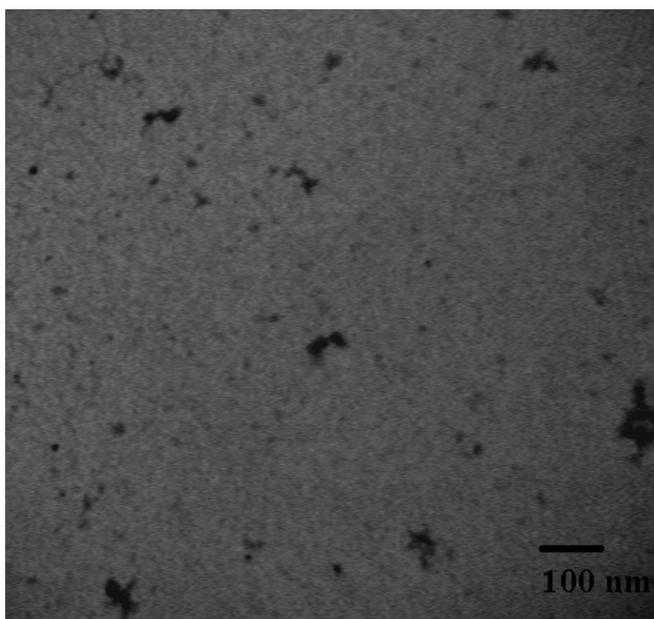


Abb. 3-51 Transmissions-Elektronenmikroskopiebild von mit Uranylacetat angefärbten α S-Oligomeren. Die Oligomere wurden 1 Stunde bei 0 °C inkubiert und säulenchromatographisch gereinigt.

Aggregationskinetiken der Peptidfragmente

Als nächstes stellte sich die Frage nach der Aggregationsfähigkeit und Geschwindigkeit der einzelnen Peptidfragmente. Getestet wurden hierbei die Fragmente 1-25, 31-55, 41-65, und 115-140. Hierzu wurden jeweils Lösungen von 500 μ M Peptid in ITC-Puffer hergestellt. Diese wurde aufgeteilt in je 6 Aliquote, wobei jeweils 3 in Glasküvetten zur späteren DLS-Analyse gegeben wurden, sowie die restlichen in Plastikreaktionsgefäßen aufbewahrt wurden, um anhand von Thioflavin T Fluoreszenz den Aggregationsstatus festzustellen. Die jeweils 3 gewählten Proben unterschieden sich dabei in ihrem pH-Wert, es wurden pH-Werte von jeweils pH 5.5, 7 und 8.5 gewählt. Ausserdem wurde hier ein von der Arbeitsgruppe von Armin Giese an dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München bereits an dem Volllängeprotein getesteter Aggregationshemmer mit der Bezeichnung 10293G02 an dem Peptid 61-85 bei pH 7 getestet. Die insgesamt 31 Proben wurden nun bei 37 °C inkubiert und in regelmässigen Zeitabständen mittels DLS und Fluoreszenzspektroskopie vermessen. Leider stellten sich dabei für die DLS-Messungen verwendeten Glasküvetten schon nach kurzer Zeit als ungeeignetes Inkubationsgefäße heraus, da in die Glasoberfläche die Proteinaggregation stark beschleunigte, wie die schon nach einer Stunde gebildeten, mit blossen Auge erkennbaren Proteinniederschläge zeigten. Die Aggregation der restlichen 15 Proben konnte jedoch ohne Probleme über 3 Wochen verfolgt werden. Abb. 3-52 zeigt die mittels Thioflavin T Fluoreszenz

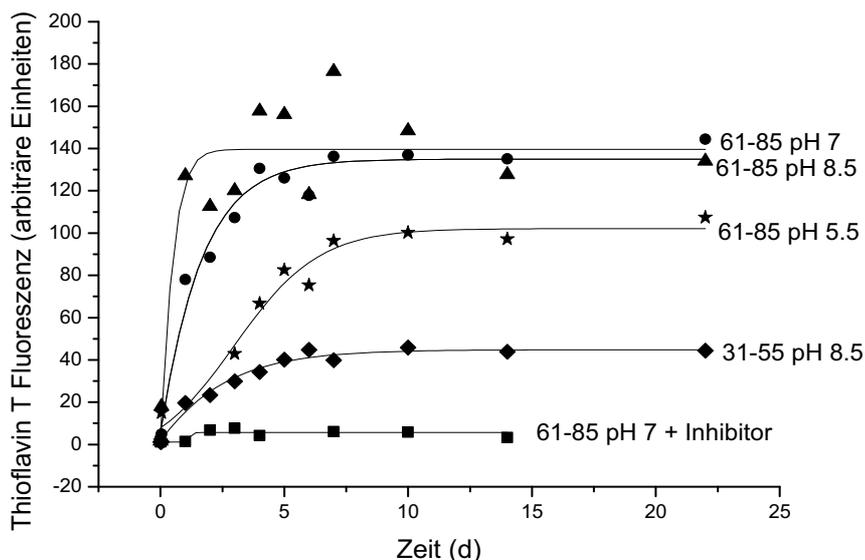


Abb. 3-52 Zunahme der Thioflavin T Fluoreszenz durch Bindung an entstehende Proteinfibrillen der Peptide 31-55 sowie 61-85 (beide 500 μ M). Die Proteinproben wurden über 3 Wochen bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Abgebildet sind die Daten für das Fragment 61-85 bei pH 7 (●), pH 8.5 (▲), pH 5.5 (★) und pH 7 unter Zugabe des Inhibitors 10293G02 (10 μ M) (■) sowie für Fragment 31-55 bei pH 8.5 (◆). Alle anderen Peptidfragmente sowie 31-55 bei pH-Werten unter 8.5 zeigten auch nach 3 Wochen Inkubationszeit keine Fibrillenbildung.

verfolgte Aggregation der Peptide 31-55 bei pH 8.5 und 61-85 bei den pH-Werten 5.5, 7 und 8.5. Die Peptide 1-25, 41-65 und 115-140, sowie das Peptid 31-55 bei den pH-Werten 5.5 und 8.5 zeigten über den gesamten gemessenen Zeitrahmen keine detektierbare Thioflavin T Fluoreszenz. Wie bereits erwartet, zeigte das Peptid 61-85, welches den vermutlichen Aggregationskern des Volllängenproteins darstellt [151][225][226][227], die stärkste Aggregationstendenz. Hierbei zeigt sich, dass die Aggregationstendenz von niedrigen pH-Werten verringert wird, wie der Verlauf der Aggregation bei pH 5.5 (Abb. 3-52, ★) im Vergleich mit den pH-Werten 7 und 8.5 (Abb. 3-52, ●, ▲) anzeigt. Für das Peptid 31-55 ist der Zusammenhang zwischen Aggregationstendenz und pH-Wert genau entgegengesetzt. So zeigte nur die Probe bei pH 8.5, wie bereits erwähnt, als einziges die Bildung von Thioflavin T bindenden Fibrillen und dieses sehr viel später und schwächer (Abb. 3-52, ◆) als dies bei dem Fragment 61-85 der Fall ist. Eine Erklärung liefert wahrscheinlich erneut das in der Sequenz enthaltene Histidin, welches bei diesem pH deprotoniert und damit ungeladen vorliegt. Dies sollte die Hydrophobizität und damit die Aggregationstendenz steigern. Als letztes ist ausserdem noch der Aggregationsverlauf der Probe von 61-

85 bei pH 7 zu sehen, die mit dem Aggregationshemmer versetzt wurde (Abb. 3-52, ■). Dieser Wirkstoff hemmt auch die Aggregation des hydrophoben Peptidfragments 61-85 über den gesamten Zeitraum, zumindest die Aggregation zu Fibrillen. Ob auch die Bildung von kleineren Aggregationspezies gehemmt wurde ist nicht untersucht worden.

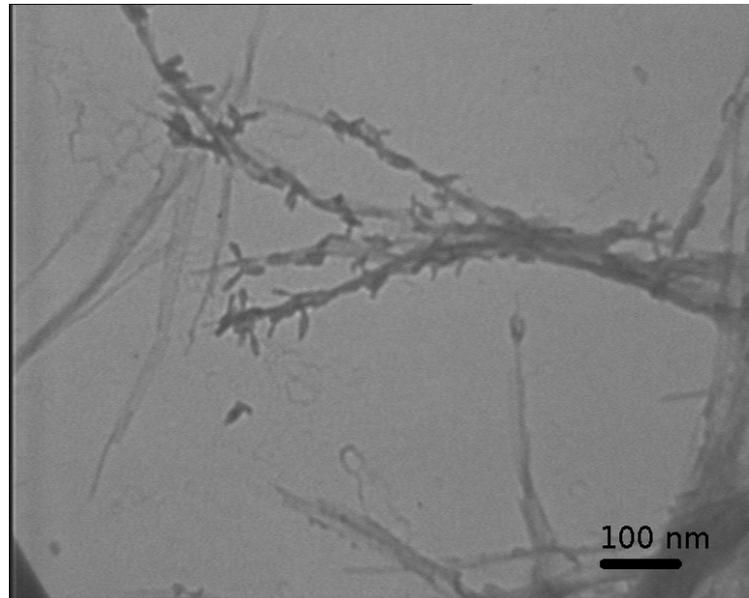


Abb. 3-53 Transmissions-Elektronenmikroskopiebild von mit Uranylacetat angefärbten Proteinfragment 61-85. Die Fibrillen wurden 10 Tage bei 37 °C inkubiert.

Auch hier gelang es leider nicht kleinere Aggregationspezies in ausreichender Menge zu isolieren um Elektronenmikroskopische Aufnahmen anzufertigen, auch nicht unter Verwendung des verbesserten Protokolls. Die Aufnahmen der Fibrillen des Peptids 31-55 zeigten sich jedoch als strukturell identisch zu denen des Volllängenproteins, zumindest unter der verwendeten Auflösung. Die Fibrillen des Fragments 61-85 zeigten einige Auffälligkeiten (Abb. 3-53), die allerdings unabhängig von dem bei der Inkubation vorherrschenden pH-Wert waren, da sämtliche Präparation des Peptids 61-85 das gleiche Erscheinungsbild teilten. So schienen sich die einzelnen Fibrillen zu verzweigen, bzw. mit kleineren ellipsoiden Aggregaten assoziiert zu sein. Inwiefern dies allerdings auf die bereits besprochenen Verunreinigung des Peptids in Verbindung gebracht werden muss blieb ungeklärt.

3.3.2 Bindungsstudien von α -Synuclein-Aggregaten an planaren Membranen mittels PWR-Spektroskopie

Um die spontane und freiwillige Bindung der Oligomere an planaren Membranen, im Unterschied zu monomeren und fibrillärem α S, untersuchen zu können, musste zunächst ein geeignetes Messsystem gefunden werden. Hierzu bot sich die in den folgenden Experimenten verwendete Plasmon-Waveguide-Resonanz (PWR) Spektroskopie an, deren Messaufbau im weiteren etwas näher erläutert werden soll. Abb. 3-54 zeigt schematisch den Aufbau des PWR-Spektrometers. Primär detektiert wird bei dieser Messmethode die Anregung der sogenannten Oberflächenplasmonen, welche die resonante Anregung kollektiver Schwingungen der freien Elektronen (Plasmonen) an der Oberfläche von Metallen darstellt. Diese Schwingungen können nur unter zwei Bedingungen angeregt werden. Zunächst muss das Medium, in welchem die Plasmonen generiert werden, eine negative dielektrische Konstante besitzen. Als zweites muss der zur Grenzfläche parallele Anteil des Wellenvektors des anregenden Lichts genau mit dem Vektor der sich ausbreitenden Schwingung übereinstimmen, was eine direkte Anregung der Schwingungen mit Licht verbietet. Vielmehr kann nur Licht, welches an der Grenzfläche des Plasmonen generierenden Mediums totalreflektiert wird diese Bedingung erfüllen. Um nun den genauen Wert des Wellenvektors der Oberflächenplasmonen zu erreichen kann nun sowohl die Wellenlänge wie auch der Einfallswinkel des anregenden Lichts variiert werden, wobei im hier verwendeten Aufbau letzteres angewandt wurde.

PWR-Spektroskopie

Die so entstehenden Plasmonen erzeugen wiederum an der Grenzfläche des Metalls mit einem dielektrischen Medium eine elektromagnetische Welle, deren elektrisches Feld normal zur Grenzfläche steht und sich in das darunter liegende Medium ausbreitet, dabei allerdings exponentiell mit der Entfernung abschwächt. Ein dünner Film (in unserem Messaufbau eine Lipiddoppelschicht) in Kontakt mit dem dielektrischen Medium ändert dabei die optischen Eigenschaften der Grenzfläche des dielektrischen Mediums und dadurch insgesamt die Resonanzbedingungen der Plasmonanregung, wodurch Eigenschaften des dünnen Films über eine Veränderung des Resonanzwinkels detektierbar werden.

Abb. 3-55 zeigt die typische Resonanzwinkelverschiebung auf Grund der Fusion von zugegebenen EYPC-SUV mit dem dielektrischen Medium unter Ausbildung einer planaren Membran auf der Grenzfläche. Da die Reichweite der elektromagnetischen Welle nur ca. 100 nm ausserhalb des dielektrischen Mediums beträgt, werden hierbei nur Veränderungen in und in der direkten Umgebung der Lipiddoppelschicht detektiert. Füllt man nun also die Probenkammer unterhalb der Lipiddoppelschicht mit

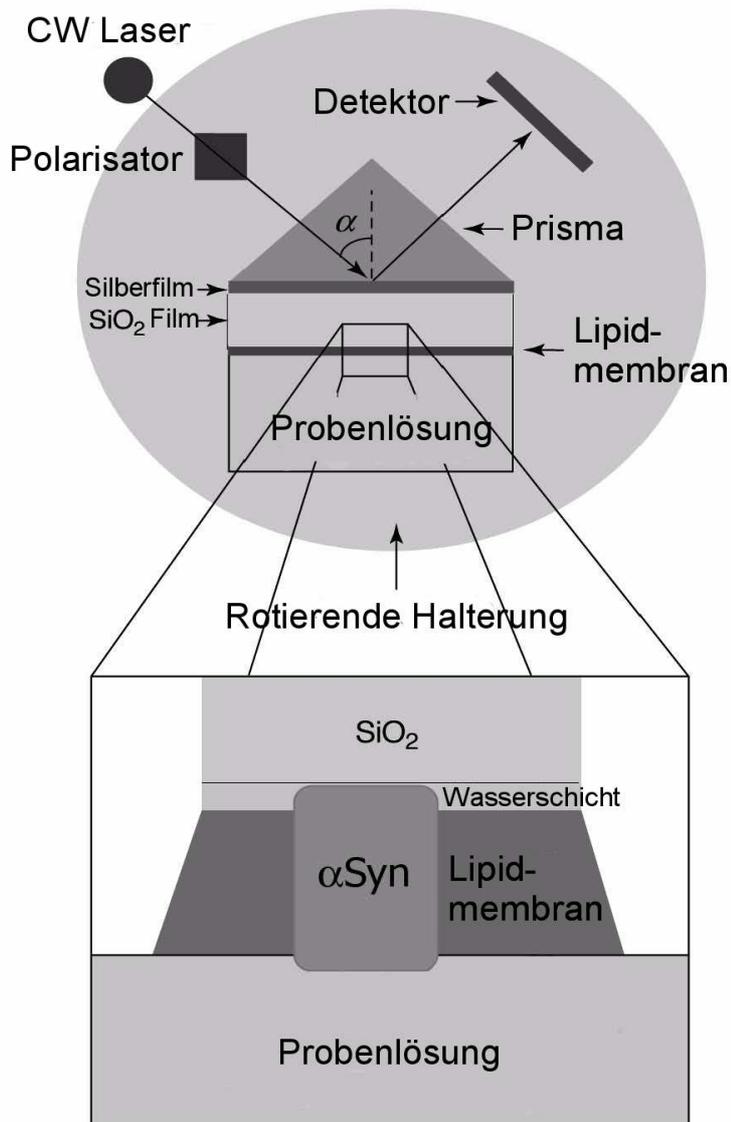


Abb. 3-54 Schematische Abbildung des Messaufbaus eines Plasmon-Waveguide Spektrometers nach [263]. Trifft das Laserlicht in einem Winkel kleiner als dem kritische Winkel auf die SiO₂-Schicht (dielektrisches Medium), wirkt diese wie ein Single-Mode-Waveguide. Dies führt zu einer Abnahme der Intensität des reflektierten Lichts. Der exakte Winkel, bei dem das Licht in den Waveguide gekoppelt wird, hängt von den optischen Eigenschaften des Substrats und der Probe in direktem Kontakt ab (die Reichweite beträgt etwa 100 nm). Veränderungen der Probe (in diesem Fall die Insertion der Oligomere in die Lipidmembran) führen zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels, die mit der Menge an insertiertem Protein korreliert.

Proteinlösung, wird nur derjenige Teil der Lösung detektiert, der an die Membran bindet oder in die Membran einbaut. Dies ermöglicht natürlich in unserem Beispiel

sehr einfach die Detektion der Fähigkeit zur Bindung von α S an planare Membranen in Abhängigkeit seines Aggregationszustands.

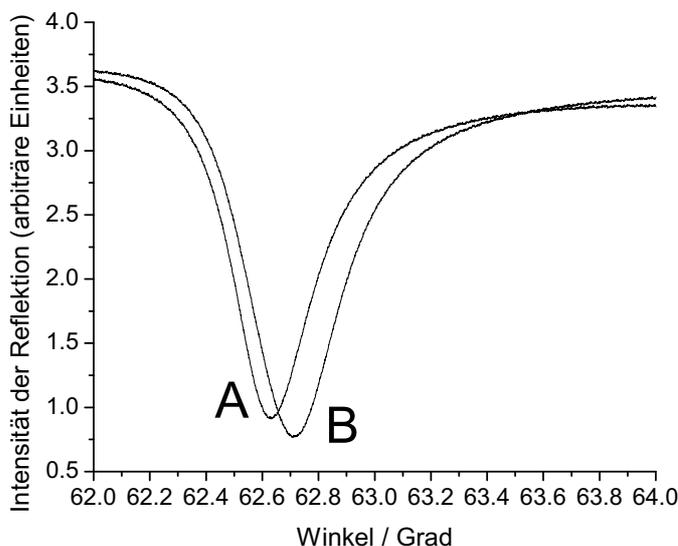


Abb. 3-55 Resonanzwinkelverschiebung auf Grund der Ausbildung einer planaren EYPC-Membran an der Grenzfläche zum dielektrischen Medium bei 20 °C. Gezeigt ist das Plasmon-Waveguide-Resonanz-Spektrum des Messaufbaus ohne (A) und mit einer EYPC-Membran (B).

Zunächst wurde die Bindung der α S Oligomere an EYPC-Membranen untersucht. Hierzu wurden zunächst EYPC-SUV mit der SiO_2 -Schicht des Messaufbaus fusioniert um eine homogene, planare Membran zu erhalten. Als nächstes wurde eine Lösung von 8 μM α S Oligomere in die Probekammer gegeben. Abb. 3-56 zeigt die nach einer Minute gemessene Resonanzwinkelverschiebung unter Zugabe von α S-Oligomer. Deutlich zu erkennen ist die Verschiebung des PWR-Spektrums um ca. 13.5 mGrad. Dies wird offensichtlich verursacht durch die Bindung des Oligomers an, oder Insertion in die EYPC-Membran, wobei die Assoziation schon bei der ersten Messung komplett zu sein schien, da weitere Messungen über die nächsten 20 Minuten keinen Zuwachs an Resonanzwinkelverschiebung brachten. Als nächstes wurde versucht, das Dissoziationsgleichgewicht der Oligomere durch Austausch des Mediums in der Probenzelle zu bestimmen. Hierzu wurde die Probenzelle für 45 Minuten mit ITC-Puffer gespült (355 $\mu\text{l}/\text{min}$) und alle 5 Minuten die Resonanzwinkelverschiebung gemessen. Es konnte hierbei jedoch keinerlei Dissoziation des Oligomers von der Membran festgestellt werden, da auch nach 45 Minuten Spülens mit Puffer immer noch eine Verschiebung von 13.5 mGrad detektiert wurde.

Bindung von α -Synuclein an planare Membranen

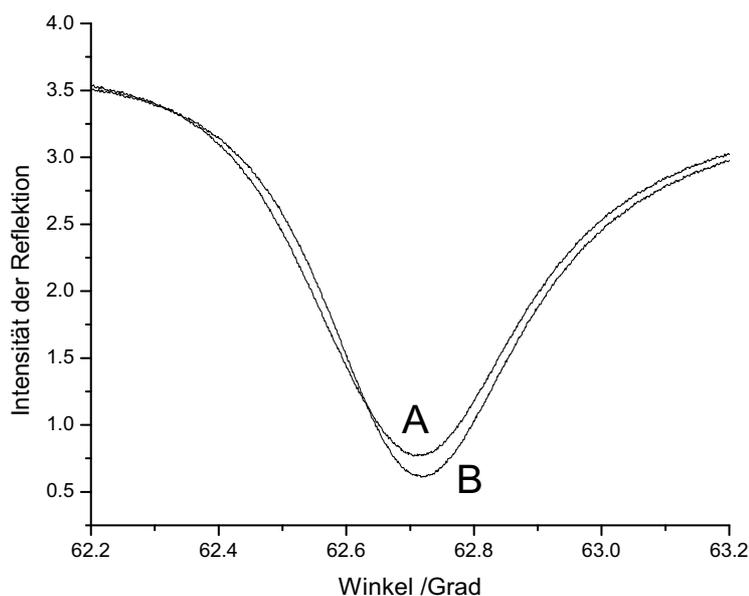


Abb. 3-56 Bindung von α S-Oligomeren (8 μ M) an eine planare EYPC-Membran bei 20 °C. Gezeigt ist das Plasmon-Waveguide-Resonanz-Spektrum von einer EYPC-Membran ohne (A) und mit (B) Zugabe von α S-Oligomeren.

Abhängigkeit der Membranbindung von α -Synuclein von Lipidzusammensetzung und Aggregationsstatus

Als nächstes wurde die Bindung von α S-Oligomeren an EYPC-Membranen mit denen von monomeren und fibrillären α -Synuclein verglichen. Hierzu wurde für jede Messung die SiO₂-Schicht des Messaufbaus mit EYPC-SUV fusioniert und die Resonanzwinkelverschiebung auf Zugabe von Fibrillen und Monomer gemessen. Als Proteinkonzentration wurde erneut für alle Proben 8 μ M gewählt. Da wie bereits Eingangs erwähnt die zellulären Membranen von Neuronen einen besonders hohen Anteil an Sphingomyelin und Cholesterin zu haben scheinen [135][165][166], wurde ausserdem der Einfluss dieser beiden Lipide auf die Membranassoziation der Oligomere bestimmt, um eine mögliche Erklärung für die besondere Empfindlichkeit von Neuronen für die Toxizität von Proteinaggregaten zu liefern. Als alternative Lipidmischung wurde dafür erneut die Phasenseparation zeigende „Lipid-Raft“-Mischung von EYPC/EYSM/Cholesterin 2:2:1, die Verwendung des Naturextrakts EYPC (Egg Yolk Phosphatidylcholine, aus Ei-Dotter extrahiertes PC) statt des Lipids POPC erschien hierbei wegen der ähnlichen Zusammensetzung (siehe “Material und Methoden” auf Seite 23) beider Lipide als unproblematisch.

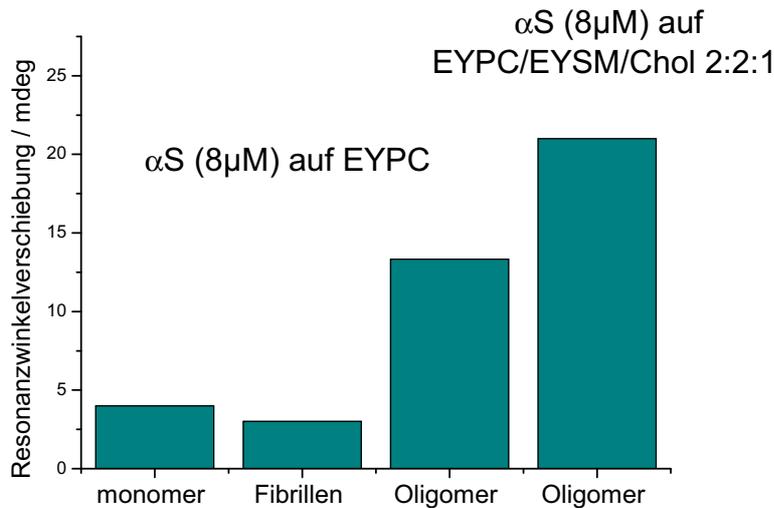


Abb. 3-57 Bindung von α S Aggregaten an eine planare Membranen detektiert mittels Plasmon-Waveguide-Resonanz-Spektroskopie bei 20 °C. Gezeigt ist die Verschiebung des Resonanzwinkels unter Zugabe der verschiedenen Spezies zu einer EYPC-Membran. Die Proteinkonzentration betrug jedesmal 8 μ M. Für den letzten Versuch wurde die EYPC-Membran gegen eine „Lipid-Raft“-Mischung (EYPC/EYSM mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$) ausgetauscht.

In Abb. 3-57 sind Werte der Verschiebungen für die verschiedenen Aggregationspezies aufgetragen. Die Zugabe von Monomer (Verschiebung ca. 4 mGrad) oder Fibrillen (Verschiebung ca. 3.4 mGrad) hat einen sehr viel geringeren Effekt auf die Membran als die Zugabe von Oligomer. Im Vergleich mit den Werten des Oligomers scheint nur ein Viertel bis ein Drittel der Proteinmenge an die Membran zu binden. Der Austausch der EYPC-Membran gegen die EYPC/EYSM/Cholesterin 2:2:1 Mischung schien die Bindung des Oligomers an die Membran um über 30% zu verstärken, wie der Zuwachs an Resonanzwinkelverschiebung von Oligomer an die „Lipid-Raft“-Mischung (21.8 mGrad vs. 13.4 mGrad für EYPC) zeigte.

Nun wurde versucht anhand der Resonanzwinkelverschiebung in Abhängigkeit von der zugegebenen Proteinmenge eine Sättigungskurve der Oligomerenbindung zu erstellen und aus dieser Bindungsisotherme die Dissoziationskonstante (K_D) der Membranbindung zu berechnen. Hierzu wurde angenommen, dass für die Reaktion der freien Membranbindungsstellen (MB) mit den Oligomeren (O) $\text{MB} + \text{O} \rightleftharpoons \text{MBO}$ gilt, so dass:

Quantifizierung der Bindung von α -Synuclein Oligomeren an eine EYPC/EYSM/Cholesterin 2:2:1 Membran

$$K_D = \frac{[MB]_f [O]_f}{[MBO]} \quad \text{Glg. 3.2}$$

Wobei der Index f die betreffende Konzentration der jeweils ungebundenen Oligomere oder Lipidbindungsstellen angibt. Der Sättigungsgrad Y des Oligomers mit Lipidbindungsstellen ist gegeben durch:

$$Y = \frac{[MBO]}{[O]_0} \quad \text{Glg. 3.3}$$

mit $[O]_0$ als die eingesetzte Oligomerenkonzentration und $0 \leq Y \leq 1$. Da ausserdem $[O]_0 = [O]_f + [MBO]$ kann man Glg 3.3 umformen zu:

$$Y = \frac{[MBO]}{[O]_f + [MBO]} \quad \text{Glg. 3.4}$$

Unter Auflösung von Glg 3.2 nach $[MBO]$ und einsetzen in Glg 3.4 erhält man:

$$Y = \frac{[O]_f}{K_D + [O]_f} \quad \text{Glg. 3.5}$$

Unter der Annahme das die freien Oligomere im starken Überschuss zu den gebundenen Oligomeren sind gilt: $[O]_f \approx [O]_0$ und damit $K_D = [O]_0$ bei $Y = \frac{1}{2}$. Es wurde nun mit zwei unabhängigen Oligomerproben die Resonanzwinkelverschiebung, die mit dem Grad an gebundenen Oligomer korreliert, in Abhängigkeit der zugegebenen Oligomerenkonzentration gemessen. Aus dieser Bindungsisotherme (Abb. 3-58) konnte nun bei der halbmaximalen Resonanzwinkelverschiebung (entspricht $Y = \frac{1}{2}$) die gemittelte $K_D = 9.8 \cdot 10^{-7}$ M der Dissoziation von Oligomeren von einer EYPC/EYSM/Cholesterin 2:2:1 Membran abgelesen werden. Mit $K_B = 1/K_D$ errechnet sich ausserdem die zugehörige Bindungskonstante als $K_B = 1.02 \cdot 10^6$ M⁻¹.

Rückführung der α -Synuclein Fibrillen in Oligomere durch Präsenz einer Lipidmembran

Eine weitere in der Literatur häufig diskutierte Frage betraf die mögliche neuroprotektive Funktion von α S Fibrillen. Da bisher angenommen wurde, dass die Fibrillen den thermodynamisch stabilen Endpunkt der α S Aggregation einnahmen [266] und bekannt war, dass durch die Anwesenheit von Fibrillen die Monomeraggregation stark beschleunigt wurde, mit einer Minimierung der dazwischen auftretenden Oligo-

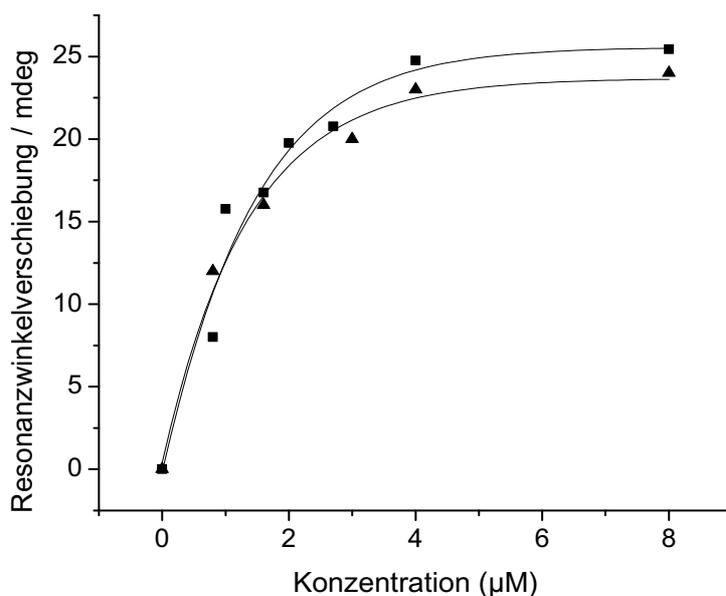


Abb. 3-58 Bindungsisotherme der α S-Oligomerbindung an eine planare Membran, gemessen mit Plasmon-Waveguide-Resonanz-Spektroskopie. Abgebildet ist die detektierte Verschiebung des Resonanzwinkels unter Zugabe von zwei unabhängigen α S-Oligomerproben zu einer EYPC/EYSM/Cholesterin 2:2:1 Membran in Abhängigkeit der Konzentration bei 20 °C.

merpopulation, konnte davon ausgegangen werden, dass die *in vivo* vorkommenden Fibrillen eher als „Oligomerfänger“ fungierten.

Ende 2007 wurde jedoch eine erste Studie von *Martins et al.* [267] veröffentlicht, in der erstmals die Rückführung von Fibrillen in neurotoxische Oligomere in Anwesenheit von DOPC-Vesikeln beschrieben wurde. Um diese Funktion der Fibrillen als Reservoir für toxische Oligomere in Anwesenheit von Membranen zu bestätigen, wurde eine Langzeitmessung der Bindung von Protein an Membranen durchgeführt. Hierzu wurde die Resonanzwinkelverschiebung auf Zugabe von 8 μ M α S Fibrillen zu einer EYPC/EYSM/Cholesterin 2:2:1 Membran über den Zeitraum von 24 Stunden beobachtet. In Abb. 3-59 sind die detektierten Verschiebungen gegen die Zeit aufgetragen. Überraschender Weise verändern sich die Werte für die Plasmonenresonanzwinkel mit der Zeit deutlich, so ist bei $t = 0$ h wie in vorherigen Versuchen kaum Proteinbindung an die Membranen detektierbar, steigt dann aber linear mit der Zeit an und erreicht Werte die mit der Zugabe von äquimolaren Mengen an Oligomer vergleichbar sind. Dies ist ein deutliches Zeichen für eine Auflösung der Fibrillen in Oligomere.

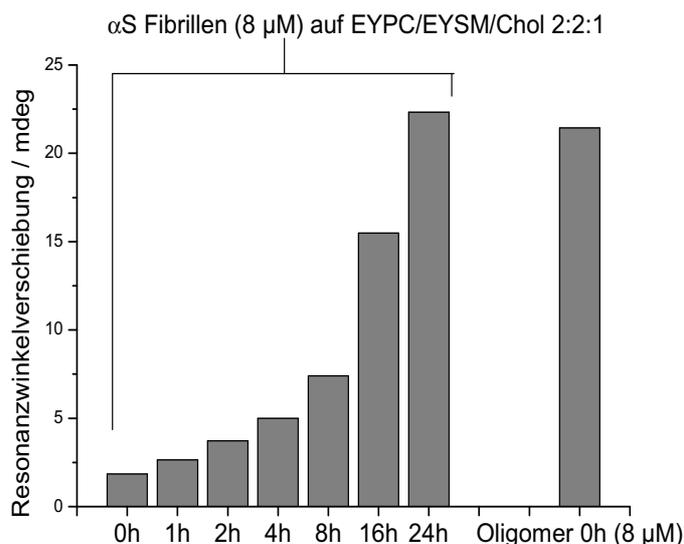


Abb. 3-59 Mittels Plasmon-Waveguide-Resonanz-Spektroskopie detektierte Verschiebung des Resonanzwinkels unter Zugabe von α S Fibrillen (8 μ M) zu einer EYPC/EYSM-Membran mit $X_{\text{Chol}} = 0.2$ aufgetragen gegen die Zeit bei 20 $^{\circ}\text{C}$. Zum Vergleich wurde nochmals der Wert der Resonanzwinkelverschiebung durch Zugabe von 8 μ M Oligomeren auf dieselbe Membran aufgetragen.

3.3.3 Diskussion der Ergebnisse

Aggregationsverhalten von α -Synuclein und dessen Fragmenten

Die mittels Thioflavin T gemessenen Aggregationskinetiken von α S verliefen weitgehend wie in der Literatur beschrieben [268][269], mit einer Verzögerungszeit von mehreren Tagen, nach der es zu einem sprunghaften Anstieg der Fibrillenpopulation kommt. Die Entstehung von aggregativen Zwischenstufen waren dabei direkt in einer deutlichen Änderung der während der Verzögerungszeit aufgenommenen CD-Spektren zu erkennen. Diese zeigten ausgeprägte strukturelle Unterschiede von Fibrillen im Endstadium der Aggregation und den Zwischenstufen, bei denen es sich vermutlich um sogenannte Protofibrillen oder Oligomere (für eine kürzlich erschienene Übersicht der verschiedenen Aggregatspezies in neurodegenerativen Krankheiten siehe [88]), bzw. einer sich dynamisch verändernden Mischung beider Spezies handelt. Bei der Variation der Aggregationsbedingungen zur Steigerung der Ausbeute an oligomeren α -Synucleinspezies ergab sich jedoch eine Überraschung. So hatte ein Herabsenken der Inkubationstemperatur eine starke Beschleunigung der Aggregation der Monomere in Oligomere zur Folge, die Entstehung von gereiften

Fibrillen wurde davon jedoch nur wenig beeinflusst. Ein Vergleich der in der Literatur verwendeten Methodik zur Oligomerengewinnung brachte dabei eine breite Diskrepanz der dafür benötigten Inkubationszeiten und Temperaturen zu Tage. So wurde in manchen Veröffentlichungen mit der hier verwendeten Methodik, bei der ca. 1 Stunde auf Eis inkubiert wird, eine hohe Ausbeute an Oligomeren erhalten [261][118], während bei der Mehrzahl der restlichen Publikationen Temperaturen von 37 °C angegeben wurde; dafür musste jedoch eine Inkubationszeit von mehreren Tagen oder sogar Wochen in Kauf genommen werden. Ein Herabsenken der Temperatur zur Förderung von Fehlfaltung und Aggregation steht ausserdem mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie bei hohen Temperaturen mit den aggregativen Peptiden 31-55 und 61-85 in Konflikt (Abb. 3-28), bei denen hohe Temperaturen die Entstehung von fibrillären Strukturen stark beschleunigten.

Eine mögliche Erklärung für die gegensätzlichen Temperatureinflüsse auf die Bildung von Oligomeren und Fibrillen könnten Studien zu den Phasendiagrammen von Proteinkristallisationen liefern [270]. Diese zeigen bei niedrigen Temperaturen die Stabilisierung einer mit der restlichen Proteinlösung koexistierenden „fluiden Proteinphase“ an, die als ein kleines Aggregat mit einer extrem dynamischen Struktur angesehen werden kann. Dies entspricht einer Beschreibung von Oligomeren. Erst bei höheren Temperaturen und Konzentrationen gehen diese Teilchen schliesslich in einen geordneteren Zustand über (analog der Entstehung von Protofibrillen), der schliesslich als Nukleationskeim für die Kristallisation dient. Diese Interpretation würde ausserdem die Schwierigkeiten der strukturellen Charakterisierung der Oligomere erklären (da eine Phase wie sie dort beschrieben ist keine feste Struktur aufweist). Da in diesem Zusammenhang ausserdem dramatische Verschiebungen dieses Phasendiagramms durch einzelne Punktmutationen in anderen Proteinen gefunden wurden [271] würde dies ausserdem eine mögliche Ursache für die offensichtlich erhöhte Toxizität familiären α S-Mutanten *in vivo* durch die veränderten Phasenbereiche und damit Stabilisierung von oligomeren Strukturen liefern.

Die Messung der Thioflavin T Fluoreszenz für die Peptide zeigt eine beschleunigte Aggregationskinetik des Fragments 31-55 und 61-85. Da das hydrophobe Fragment 61-85 bereits als Aggregationszentrum vermutet wurde [151][225][226][227] ist dies nicht überraschend. Die Fähigkeit des Peptids 31-55 zu Bildung von fibrillären Strukturen, die den entsprechenden für das Vollängenprotein erhaltenen sehr ähneln, steht ausserdem im Einklang mit bereits veröffentlichten Studien zur theoretischen Vorhersage von aggregativen Aminosäuresequenzen in α S [150] sowie den strukturellen Untersuchungen zur Faltung der einzelnen Abschnitte in Fibrillen [152]

Bindung von α -Synuclein an planare Membranen

Neurodegenerative Krankheiten, die mit amyloiden Ablagerungen einhergehen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Lewy-Body-Demenz) teilen eine bemerkenswerte Reihe an pathologischen Charakteristika wie Beschädigung von Membranen, oxidativen Stress und mitochondrialer Dysfunktion. Verschiedene Beobachtungen implizieren dabei, dass amyloide Oligomere, anstelle der in den amyloiden Ablagerungen vorhandenen Proteinfibrillen, die primär toxischen Partikel darstellen [272][273]. Diese amyloide Oligomere teilen verschiedene gemeinsame Struktur motive, die sich stark von denen der Fibrillen unterscheiden, wie durch die Bindung eines konformationsspezifischen Antikörpers an ein gemeinsames Epitop amyloider Oligomere unterschiedlichen Ursprungs, aber nicht an die dazu gehörigen monomeren oder fibrillären Proteine gezeigt werden konnte [274].

Da diese Oligomere mit gemeinsamen Struktur motiven im Allgemeinen toxisch auf Neuronen wirken, drängt sich die Frage nach einem gemeinsamen pathogenen Mechanismus auf. Da nun einige der beteiligten amyloidogenen Proteine zytosolisch, andere wiederum sekretorisch oder extrazellulär vorkommen, bietet sich als gemeinsames Ziel die Plasmamembran an, welche die Grenzfläche zwischen extrazellulären Raum und Zytosol darstellt. Eine Reihe von Studien stellt dabei die Permeabilisation der Membranen durch Porenbildung der Oligomere in den Vordergrund [275][276][277][262], nachdem eine erhöhte Durchlässigkeit der Membran und Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration schon seit längerem mit amyloider Toxizität assoziiert waren, allerdings mit verschiedenen Interpretationen der zugrunde liegenden Mechanismen [278][279][275][85]. Bis vor kurzem [280] gab es jedoch keinerlei Studien, welche die spezifische Bindung der oligomeren Spezies an Membranen, im Vergleich mit der Bindung des Monomers oder der Fibrillen, zeigen konnten.

Die PWR-Spektroskopie lieferte nun erstmalig eine Möglichkeit zur Bestimmung der Bindung von α S an planare Membranen in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung sowie vom Aggregationszustand des Proteins. Ein deutlicher Vorteil des Proteins α S ist hierbei die Nicht-Assoziation des Monomers an Membranen die weder negativ geladen noch eine gekrümmte Membranfläche besitzen. Dies ermöglichte eine direkte Unterscheidung des Oligomers von dem Monomer. Die Ergebnisse waren dabei eindeutig. Weder das Monomer noch die grösseren fibrillären Aggregate zeigten Assoziation mit den angebotenen Membranen. Das Oligomer zeigte jedoch eine sehr starke Assoziation, die interessanter Weise durch Verschiebung der Lipidzusammensetzung zu einer Cholesterin- und Sphingomyelinreicheren Membran enorm verstärkt werden konnte. Dies ist insofern interessant, da gezeigt werden konnte, dass sowohl der Sphingomyelin wie auch der Cholesterinanteil in neuronalen Membranen stark variiert [30]. Dies liefert eine mögliche Ursache

für die besondere Empfindlichkeit bestimmter Arten von Neuronen für die Toxizität von verschiedenen Oligomeren. So sind wahrscheinlich Neuronen der Substantia nigra auf Grund ihrer Membranzusammensetzung besonders empfindlich gegenüber α S, bzw. Neuronen des frontalen Kortex gegenüber dem mit Morbus Alzheimer assoziierten A β -Peptid [281]. Da ausserdem der Sphingomyelin- wie auch der Cholesterinanteil in neuronalen Membranen im Laufe des Alterns steigt [282][29], könnte diese verstärkte Bindung der α S-Oligomere eine direkte Erklärung für die Altersabhängigkeit vieler neurodegenerativer Krankheiten liefern. Interessanterweise wurde eine veränderte Membranzusammensetzung im Fall von Alzheimer Patienten entdeckt [283][284] die sich mit dieser Erklärung decken könnte. Auch steht dies in Einklang mit der Beobachtung, dass die Toxizität bestimmter porenbildender Proteine stark von der Membranzusammensetzung moduliert wird [285][286][287]. Direkte Porenbildung, bzw. Permeabilisation der Membran konnte allerdings leider nicht festgestellt werden. Versuche zur Bestimmung der Membranpermeabilisation wurden zwar anhand veröffentlichter Protokolle [262][276] unternommen, die veröffentlichten Ergebnisse waren jedoch leider nicht reproduzierbar.

Ein weiterer wichtiger Punkt betrifft die in Abb. 3-59 dargestellte Rückführung der α -Synuclein-Fibrillen in membranbindende Oligomere durch Membrankontakt. Wie bereits erwähnt stellt die mögliche neuroprotektive Funktion von α S Fibrillen eine in der Fachliteratur häufig diskutierte Frage dar [76], da hier die Fibrillen entweder über Nukleationsprozesse als Beschleuniger der Aggregation der toxischen Oligomere in inerte Fibrillen. Alternativ könnten die Fibrillen als Reservoir für die Freisetzung der Oligomere dienen, was einer neurotoxischen Rolle gleichkommen würde. Hier konnte gezeigt werden, dass Fibrillen, in Kontakt mit Lipidmembranen, komplett in membranbindende Oligomere zurück überführt werden kann. Es stellt sich nun die Frage, wie die Membran zur Auflösung der ansonsten thermodynamisch stabilen Fibrillen [266] in der Lage ist, nachdem bisher nur Versuche Fibrillen durch angelegten Druck zu destabilisieren erfolgreich waren [288].

Da die Brown'sche Molekularbewegung vermutlich nicht ausreicht, um die Proteinfibrillen auf Grund ihrer Grösse in Lösung zu halten, kann davon ausgegangen werden, dass diese bereits nach kurzer Zeit am Boden der Probenkammer sedimentieren. Daher stellt sich im weiteren die Frage, wie die Lipidmembran an der Auflösung der Fibrillen beteiligt ist, ohne dabei mit diesen in direktem Kontakt zu stehen. Ein möglicher Mechanismus ist in Abb. 3-60 dargestellt. Hiernach stehen die Proteinfibrillen mit den löslichen Oligomerspezies in einem Gleichgewicht, welches durch Diffusion der Oligomere zu der Membran an ein zweites Gleichgewicht von Oligomeren in Lösung und membrangebundenen Oligomeren gekoppelt ist. Da das zweite Gleichgewicht, wie die gemessene Bindungskonstante von $K_B = 1.02 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$

vermuten lässt, stark auf Seite der membrangebundenen Oligomeren verschoben ist, werden beiden Gleichgewichten ständig lösliche Oligomere entzogen, was eine Auflösung der Fibrillen zur Folge hat.

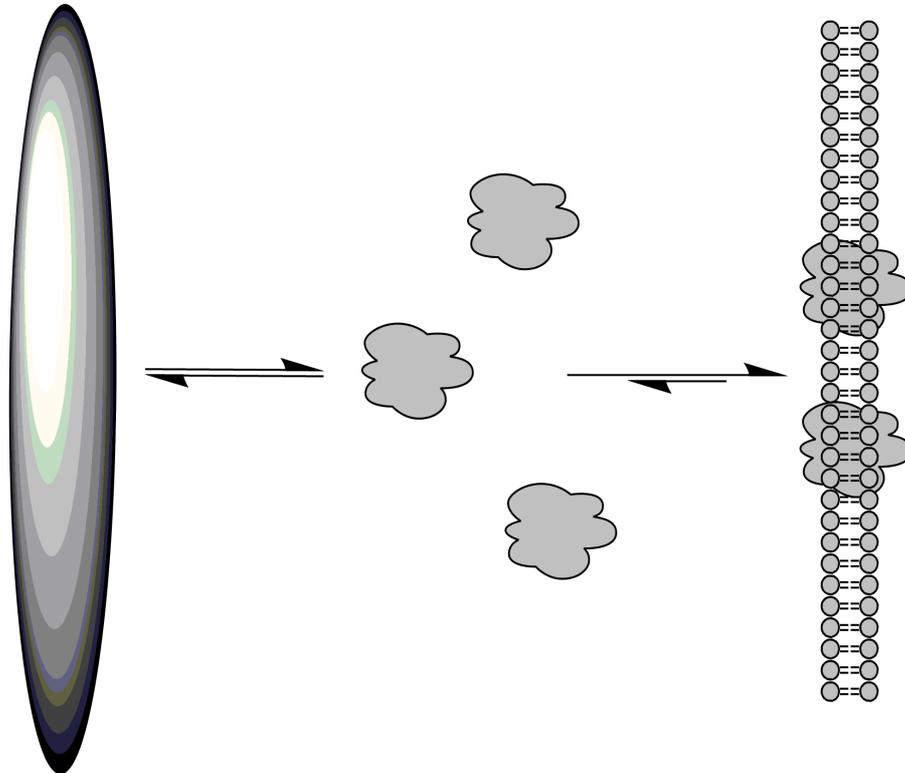


Abb. 3-60 Modell zur Auflösung der α S-Fibrillen durch die Anwesenheit einer Membran. Die Proteinfibrillen stehen in einem Gleichgewicht mit löslichen Oligomeren, die durch die Lösung zu der Membran diffundieren. Die löslichen Oligomere stehen wiederum mit in die Membran insertierten Oligomeren im Gleichgewicht, wobei dieses auf der Seite der letzteren liegt. Durch das zweite Gleichgewicht werden die Fibrillen ohne direkten Membrankontakt aufgelöst.

Durch die hier durchgeführten Versuche wird impliziert, dass die Proteinfibrillen, sowie damit die *in vivo* auftretenden Lewy-Bodies, wahrscheinlich eher als Reservoir für toxische Oligomere fungieren als eine neuroprotektive Funktion für die Patienten darstellen. Auch liefern diese Ergebnisse eine Erklärung für die ersten Erfolge der angewandten Immunotherapie gegen Morbus Alzheimer [289][290], da die dort benutzten Antikörper gegen das A β -Peptid über eine Komplexierung der löslichen Oligomere den beobachteten Rückgang der amyloiden Plaques bewirken könnten. Für weitere Experimente könnte es sich als interessante Methodik erweisen, Oligomere mit Hilfe von Lipidmembranen aus den leicht zu isolierenden Lewy-Bodies aus Gehirnschnitten von Parkinson-Patienten zu erhalten, da die direkte Isolation von *in*

vivo entstandenen α S-Oligomeren aus Gewebeschnitten und Flüssigkeiten bisher noch nicht gelungen ist.

Literaturverzeichnis

- [1] Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr, Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., and Subramaniam, S. (2007) *Nucl. Acids Res.* **35**, D527-532
- [2] Wallin, E., and Von-Heijne, G. (1998) *Protein Sci* **7**, 1029-1038
- [3] Hopkins, A. L., and Groom, C. R. (2002) *Nat Rev Drug Discov* **1**, 727-730
- [4] Rabilloud, T. (2003) *Nat Biotechnol* **21**, 508-510
- [5] Muller, D. J., Wu, N., and Palczewski, K. (2008) *Pharmacol Rev* **60**, 43-78
- [6] Bloom, M., Evans, E., and Mouritsen, O. G. (1991) *Q Rev Biophys* **24**, 293-397
- [7] Nagy, A., Baker, R. R., Morris, S. J., and Whittaker, V. P. (1976) *Brain Res* **109**, 285-309
- [8] Daleke, D. L. (2007) *J Biol Chem* **282**, 821-825
- [9] McIntosh, T. J., and Simon, S. A. (2006) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 177-198
- [10] Yamaji-Hasegawa, A., and Tsujimoto, M. (2006) *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **29**, 1547-1553
- [11] Michell, R. H. (2008) *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 151-161
- [12] Lodish, H. F., Braell, W. A., Schwartz, A. L., Strous, G. J., and Zilberstein, A. (1981) *Int Rev Cytol Suppl* **12**, 247-307
- [13] Maxfield, F. R., and Tabas, I. (2005) *Nature* **438**, 612-621
- [14] Lodish, H. F. (2007) *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman, New York
- [15] McMahon, H. T., and Gallop, J. L. (2005) *Nature* **438**, 590-596
- [16] Hanzal-Bayer, M. F., and Hancock, J. F. (2007) *FEBS Lett* **581**, 2098-2104
- [17] Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972) *Science* **175**, 720-731
- [18] Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569-572
- [19] Brown, D. A., and London, E. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 1-7
- [20] Edidin, M. (2003) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 257-283
- [21] Simons, K., and Vaz, W. L. (2004) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 269-295
- [22] Jacobson, K., Mouritsen, O. G., and Anderson, R. G. (2007) *Nat Cell Biol* **9**, 7-

- [23] Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., and Rasenick, M. M. (2007) *Nat Rev Neurosci* **8**, 128-140
- [24] Wilflingseder, D., and Stoiber, H. (2007) *Front Biosci* **12**, 2124-2135
- [25] Riethmuller, J., Riehle, A., Grassme, H., and Gulbins, E. (2006) *Biochim Biophys Acta* **1758**, 2139-2147
- [26] London, E. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1746**, 203-220
- [27] Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992) *Cell* **68**, 533-544
- [28] Cinek, T., and Horejsi, V. (1992) *J Immunol* **149**, 2262-2270
- [29] Cutler, R. G., and Mattson, M. P. (2001) *Mech Ageing Dev* **122**, 895-908
- [30] Barenholz, Y., and Thompson, T. E. (1980) *Biochim Biophys Acta* **604**, 129-158
- [31] Igbavboa, U., Avdulov, N. A., Schroeder, F., and Wood, W. G. (1996) *J Neurochem* **66**, 1717-1725
- [32] Grimm, M. O., Grimm, H. S., Patzold, A. J., Zinser, E. G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J. A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J., and Hartmann, T. (2005) *Nat Cell Biol* **7**, 1118-1123
- [33] Wood, W. G., Schroeder, F., Igbavboa, U., Avdulov, N. A., and Chochina, S. V. (2002) *Neurobiol Aging* **23**, 685-694
- [34] Bittman, R., Kasireddy, C. R., Mattjus, P., and Slotte, J. P. (1994) *Biochemistry* **33**, 11776-11781
- [35] Lagace, T. A., Storey, M. K., and Ridgway, N. D. (2000) *J Biol Chem* **275**, 14367-14374
- [36] Ridgway, N. D. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1484**, 129-141
- [37] Schroeder, R. J., Ahmed, S. N., Zhu, Y., London, E., and Brown, D. A. (1998) *J Biol Chem* **273**, 1150-1157
- [38] Ilangumaran, S., and Hoessli, D. C. (1998) *Biochem J* **335** (Pt 2), 433-440
- [39] Green, J. M., Zhelesnyak, A., Chung, J., Lindberg, F. P., Sarfati, M., Frazier, W. A., and Brown, E. J. (1999) *J Cell Biol* **146**, 673-682
- [40] Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., and Parton, R. G. (1999) *Nat Cell Biol* **1**, 98-105
- [41] Anderson, H. A., Hiltbold, E. M., and Roche, P. A. (2000) *Nat Immunol* **1**, 156-162
- [42] Cavalier-Smith, T. (1987) *Ann N Y Acad Sci*, **503**, 17-54
- [43] Mouritsen, O. G., and Zuckermann, M. J. (2004) *Lipids* **39**, 1101-1113
- [44] Sagan, L. (1967) *Journal of Theoretical Biology*, **14**, 225-274
- [45] Bloch, K. E. (1983) *CRC Crit Rev Biochem*, **14**, 47-92
- [46] Pitman, M. C., Suits, F., Mackerell, A. D., Jr., and Feller, S. E. (2004) *Biochemistry* **43**, 15318-15328

- [47] Pandit, S. A., Jakobsson, E., and Scott, H. L. (2004) *Biophys J* **87**, 3312-3322
- [48] Miao, L., Nielsen, M., Thewalt, J., Ipsen, J. H., Bloom, M., Zuckermann, M. J., and Mouritsen, O. G. (2002) *Biophys J* **82**, 1429-1444
- [49] Ipsen, J. H., Karlstrom, G., Mouritsen, O. G., Wennerstrom, H., and Zuckermann, M. J. (1987) *Biochim Biophys Acta* **905**, 162-172
- [50] Vist, M. R., and Davis, J. H. (1990) *Biochemistry* **29**, 451-464
- [51] Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G., and Zuckermann, M. J. (1989) *Biophys J* **56**, 661-667
- [52] Sankaram, M. B., and Thompson, T. E. (1990) *Biochemistry* **29**, 10670-10675
- [53] Polozov, I. V., Bezrukov, L., Gawrisch, K., and Zimmerberg, J. (2008) *Nat Chem Biol* **4**, 248-255
- [54] Cantor, R. S. (1999) *Chemistry and Physics of Lipids* **101**, 45-56
- [55] Dumas, F., Lebrun, M. C., and Tocanne, J. F. (1999) *FEBS Lett* **458**, 271-277
- [56] Lee, A. G. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1612**, 1-40
- [57] de Almeida, R. F., Fedorov, A., and Prieto, M. (2003) *Biophys J* **85**, 2406-2411
- [58] Veatch, S. L., and Keller, S. L. (2003) *Biophys J* **85**, 3074-3083
- [59] Veatch, S. L., Leung, S. S., Hancock, R. E., and Thewalt, J. L. (2007) *J Phys Chem B* **111**, 502-504
- [60] Seelig, J. (1977) *Q Rev Biophys* **10**, 353-418
- [61] Brown, M. F., Lope-Piedrafita, S., Martinez, G. V., and Petrache, H. I. (2006) in *Modern Magnetic Resonance*, pp. 1-12
- [62] Brown, M. F., and Chan, S. I. (1996) in *Membrane Structure and Dynamics* (Merz, K. M., and Roux, B., eds), pp. 175-252, Birkhäuser, Boston
- [63] Bittman, R., and Verbicky, C. A. (2000) *J Lipid Res* **41**, 2089-2093
- [64] Davis, J. H. (1983) *Biochim Biophys Acta* **737**, 117-171
- [65] Hoyland, J. R. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2227-2232
- [66] Derbyshire, W., Gorvin, T. C., and Warner, D. (1969) *Molecular Physics* **17**, 401 - 407
- [67] Barnes, R. G., and Bloom, J. W. (1973) *Molecular Physics* **25**, 493 - 494
- [68] Fung, B. M. (1974) in *In Critical Evaluation of Chemical and Physical structural Information* (Lide, D. R., and Paul, M. A., eds), National Academy of Sciences, Washington D.C. Taylor, J. P., Hardy, J., and Fischbeck, K. H. (2002) *Science* **296**, 1991-1995
- [69] Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M., and Lansbury, P. T., Jr. (2001) *Science* **294**, 1346-1349
- [70] Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992) *Science* **256**, 184-185
- [71] Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) *Science* **297**, 353-356
- [72] Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrach, H., and Wanker, E. E.

- (1997) *Cell* **90**, 549-558
- [73] Ross, C. A. (2002) *Neuron* **35**, 819-822
- [74] Lewy, F. H. (1912) *Handbuch der Neurologie*, Springer Verlag, Berlin, 920-933
- [75] Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997) *Nature* **388**, 839-840
- [76] Caughey, B., and Lansbury, P. T. (2003) *Annual Review of Neuroscience* **26**, 267-298
- [77] Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., and Nussbaum, R. L. (1997) *Science* **276**, 2045-2047
- [78] Goedert, M. (2001) *Nat Rev Neurosci* **2**, 492-501
- [79] Jarrett, J. T., and Lansbury, P. T., Jr. (1993) *Cell* **73**, 1055-1058
- [80] Conway, K. A., Harper, J. D., and Lansbury, P. T. (1998) *Nat Med* **4**, 1318-1320
- [81] Wong, P. C., Cai, H., Borchelt, D. R., and Price, D. L. (2002) *Nat Neurosci* **5**, 633-639
- [82] Luheshi, L. M., Tartaglia, G. G., Brorsson, A.-C., Pawar, A. P., Watson, I. E., Chiti, F., Vendruscolo, M., Lomas, D. A., Dobson, C. M., and Crowther, D. C. (2007) *PLoS Biology* **5**, e290
- [83] Perutz, M. F., and Windle, A. H. (2001) *Nature* **412**, 143-144
- [84] Eigen, M. (1996) *Biophys Chem* **63**, A1-18
- [85] Volles, M. J., and Lansbury, P. T., Jr. (2003) *Biochemistry* **42**, 7871-7878
- [86] Lansbury, P. T., and Lashuel, H. A. (2006) *Nature* **443**, 774-779
- [87] Glabe, C. G. (2006) *Neurobiol Aging* **27**, 570-575
- [88] Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-112
- [89] Sokolov, Y., Kozak, J. A., Kaye, R., Chanturiya, A., Glabe, C., and Hall, J. E. (2006) *J. Gen. Physiol.* **128**, 637-647
- [90] Hartmann, T., Kuchenbecker, J., and Grimm, M. O. (2007) *J Neurochem* **103** Suppl 1, 159-170
- [91] Simons, M., Keller, P., Dichgans, J., and Schulz, J. B. (2001) *Neurology* **57**, 1089-1093
- [92] Wolozin, B. (2004) *Neuron* **41**, 7-10
- [93] Parkinson, J. (1817) *An Essay on the Shaking Palsy*, Sherwood, Neely & Jones, London
- [94] Tretiakoff, C. (1919), *Dissertation*, Univ. Paris, Paris
- [95] Hassler, R. (1938) *J. Psychol. Neurol* **48**, 387-486
- [96] Forno, L. S. (1996) *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 259-272
- [97] Gorell, J. M., Johnson, C. C., Rybicki, B. A., Peterson, E. L., and Richardson,

- R. J. (1998) *Neurology* **50**, 1346-1350
- [98] Wastensson, G., Hagberg, S., Andersson, E., Johnels, B., and Barregard, L. (2006) *Parkinsonism Relat Disord* **12**, 29-34
- [99] Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., and Greenamyre, J. T. (2000) *Nat Neurosci* **3**, 1301-1306
- [100] Thiruchelvam, M., Richfield, E. K., Baggs, R. B., Tank, A. W., and Cory-Slechta, D. A. (2000) *J Neurosci* **20**, 9207-9214
- [101] Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., and Irwin, I. (1983) *Science* **219**, 979-980
- [102] Markey, S. P., Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., Burns, R. S., and Herkenham, M. A. (1984) *Nature* **311**, 464-467
- [103] Langston, J. W., Irwin, I., Langston, E. B., and Forno, L. S. (1984) *Neurosci Lett* **48**, 87-92
- [104] Javitch, J. A., Uhl, G. R., and Snyder, S. H. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4591-4595
- [105] Nicklas, W. J., Vyas, I., and Heikkila, R. E. (1985) *Life Sci* **36**, 2503-2508
- [106] Chinta, S. J., and Andersen, J. K. (2006) *Free Radic Biol Med* **41**, 1442-1448
- [107] Thomas Gasser. (2007) *Movement Disorders* **22**, S343-S350
- [108] Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998) *Nature* **392**, 605-608
- [109] Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D., and Polymeropoulos, M. H. (1998) *Nature* **395**, 451-452
- [110] Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G., and Wood, N. W. (2004) *Science* **304**, 1158-1160
- [111] Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J. W., Vanacore, N., van Swieten, J. C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C. M., Oostra, B. A., and Heutink, P. (2003) *Science* **299**, 256-259
- [112] Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., Strom, T. M., Wszolek, Z. K., and Gasser, T. (2004) *Neuron* **44**, 601-607
- [113] Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L., and Riess, O. (1998) *Nat Genet* **18**, 106-108
- [114] Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R.,

- Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D. G., and de Yebenes, J. G. (2004) *Ann Neurol* **55**, 164-173
- [115] Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., and Gwinn-Hardy, K. (2003) *Science* **302**, 841
- [116] Conway, K. A., Harper, J. D., and Lansbury, P. T., Jr. (2000) *Biochemistry* **39**, 2552-2563
- [117] Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., and Lansbury, P. T., Jr. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 571-576
- [118] Fredenburg, R. A., Rospigliosi, C., Meray, R. K., Kessler, J. C., Lashuel, H. A., Eliezer, D., and Lansbury, P. T., Jr. (2007) *Biochemistry* **46**, 7107-7118
- [119] Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., and George, J. M. (1998) *J Biol Chem* **273**, 9443-9449
- [120] Jo, E., Fuller, N., Rand, R. P., St George-Hyslop, P., and Fraser, P. E. (2002) *J Mol Biol* **315**, 799-807
- [121] Chiba-Falek, O., Lopez, G. J., and Nussbaum, R. L. (2006) *Mov Disord* **21**, 1703-1708
- [122] Rockenstein, E., Hansen, L. A., Mallory, M., Trojanowski, J. Q., Galasko, D., and Masliah, E. (2001) *Brain Res* **914**, 48-56
- [123] Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H. A., Kittel, A., and Saitoh, T. (1995) *Neuron* **14**, 467-475
- [124] Totterdell, S., and Meredith, G. E. (2005) *Neuroscience* **135**, 907-913
- [125] Tofaris, G. K., and Spillantini, M. G. (2005) *Mov Disord* **20** Suppl 12, S37-44
- [126] Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., and Lansbury, P. T., Jr. (1996) *Biochemistry* **35**, 13709-13715
- [127] Okochi, M., Walter, J., Koyama, A., Nakajo, S., Baba, M., Iwatsubo, T., Meijer, L., Kahle, P. J., and Haass, C. (2000) *J Biol Chem* **275**, 390-397
- [128] Pronin, A. N., Morris, A. J., Surguchov, A., and Benovic, J. L. (2000) *J Biol Chem* **275**, 26515-26522
- [129] Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., and Rosenthal, A. (2000) *Neuron* **25**, 239-252
- [130] Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2000) *J Neurosci* **20**, 3214-3220
- [131] George, J. M., Jin, H., Woods, W. S., and Clayton, D. F. (1995) *Neuron* **15**, 361-372
- [132] Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O. M., and Sudhof, T. C. (2005) *Cell* **123**, 383-396

- [133] Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H., Brouillette, C. G., Venkatachalapathi, Y. V., and Anantharamaiah, G. M. (1992) *J Lipid Res* **33**, 141-166
- [134] Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., and Nussbaum, R. L. (2005) *J Biol Chem* **280**, 9595-9603
- [135] Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., and Jahn, R. (2006) *Cell* **127**, **831-846**
- [136] Nuscher, B., Kamp, F., Mehnert, T., Odoy, S., Haass, C., Kahle, P. J., and Beyer, K. (2004) *J Biol Chem* **279**, 21966-21975
- [137] Kamp, F., and Beyer, K. (2006) *J Biol Chem* **281**, 9251-9259
- [138] Gai, W. P., Yuan, H. X., Li, X. Q., Power, J. T., Blumbergs, P. C., and Jensen, P. H. (2000) *Exp Neurol* **166**, 324-333
- [139] Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Marsischky, G., Kolodner, R. D., Labaer, J., Rochet, J. C., Bonini, N. M., and Lindquist, S. (2006) *Science* **313**, 324-328
- [140] Gitler, A. D., Bevis, B. J., Shorter, J., Strathearn, K. E., Hamamichi, S., Su, L. J., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Rochet, J.-C., McCaffery, J. M., Barlowe, C., and Lindquist, S. (2007) *Proceedings of the National Academy of Science*, **105**, 145-150
- [141] Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C. E., Paylor, R., Lu, B., and Nussbaum, R. L. (2002) *J Neurosci* **22**, 8797-8807
- [142] Liu, C. W., Giasson, B. I., Lewis, K. A., Lee, V. M., Demartino, G. N., and Thomas, P. J. (2005) *J Biol Chem* **280**, 22670-22678
- [143] Bertoncini, C. W., Jung, Y. S., Fernandez, C. O., Hoyer, W., Griesinger, C., Jovin, T. M., and Zweckstetter, M. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1430-1435
- [144] Li, W., West, N., Colla, E., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Marsh, L., Dawson, T. M., Jakala, P., Hartmann, T., Price, D. L., and Lee, M. K. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2162-2167
- [145] Campbell, B. C., McLean, C. A., Culvenor, J. G., Gai, W. P., Blumbergs, P. C., Jakala, P., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Li, Q. X. (2001) *J Neurochem* **76**, 87-96
- [146] Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., and Iwatsubo, T. (1998) *Am J Pathol* **152**, 879-884
- [147] Tamamizu-Kato, S., Kosaraju, M. G., Kato, H., Raussens, V., Ruysschaert, J. M., and Narayanaswami, V. (2006) *Biochemistry* **45**, 10947-10956
- [148] Takeda, A., Mallory, M., Sundsmo, M., Honer, W., Hansen, L., and Masliah, E. (1998) *Am J Pathol* **152**, 367-372
- [149] Volles, M. J., and Lansbury, P. T., Jr. (2006) *J Mol Biol*

- [150] Pawar, A. P., Dubay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., and Dobson, C. M. (2005) *J Mol Biol* **350**, 379-392
- [151] Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 2380-2386
- [152] Chen, M., Margittai, M., Chen, J., and Langen, R. (2007) *J Biol Chem* **282**, 24970-24979
- [153] Gross, E., and Witkop, B. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, **1856-1860**
- [154] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, **263-273**
- [155] Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Odoy, S., Okamoto, N., Jacobsen, H., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Bogdanovic, N., Riederer, P., Kretschmar, H. A., and Haass, C. (2001) *Am J Pathol* **159**, **2215-2225**
- [156] Kurze, V., Steinbauer, B., Huber, T., and Beyer, K. (2000) *Biophys J* **78**, 2441-2451
- [157] McCabe, M., and Wassail, S. (1997) *Solid State Nucl Magn Reson* **10**, 53-61
- [158] Davis, J. H., Jeffrey, K. R., Bloom, M., Valic, M. I., and Higgs, T. P. (1976) *Chemical Physics Letters* **42**, 390-394
- [159] Engel, A. K., and Cowburn, D. (1981) *FEBS Lett* **126**, 169-171
- [160] Guo, W., Kurze, V., Huber, T., Afdhal, N. H., Beyer, K., and Hamilton, J. A. (2002) *Biophys J* **83**, **1465-1478**
- [161] Mehnert, T., Jacob, K., Bittman, R., and Beyer, K. (2006) *Biophys J* **90**, 939-946
- [162] Petrache, H. I., Tu, K. C., and Nagle, J. F. (1999) *Biophys J* **76**, A57-A57
- [163] Petrache, H. I.; Dodd, S. W.; Brown, M. F. *Biophys J* 2000, **79**, 3172-3192
- [164] Thomas Mehnert (2004), *Dissertation*, Lehrstuhl für Biophysik, Department Physik, Technische Universität München
- [165] Jacobson, K., Mouritsen, O. G., and Anderson, R. G. (2007) *Nat Cell Biol* **9**, 7-14
- [166] Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., and Rasenick, M. M. (2007) *Nat Rev Neurosci* **8**, 128-140
- [167] Niemela, P. S., Ollila, S., Hyvonen, M. T., Karttunen, M., and Vattulainen, I. (2007) *PLoS Comput Biol* **3**, **e34**
- [168] Veatch, S. L., and Keller, S. L. (2005) *Biochim Biophys Acta* 1746, 172-185
- [169] Almeida, P. F., Pokorny, A., and Hinderliter, A. (2005) *Biochim Biophys Acta* 1720, 1-13
- [170] Sternin, E., Bloom, M., and MacKay, A. L. (1983) *J. Magn. Reson.* **55**, 274-282
- [171] Calhoun, W. I., and Shipley, G. G. (1979) *Biochim Biophys Acta* 555, 436-441
- [172] Trouard, T. P., Alam, T. M., Zajicek, J., and Brown, M. F. (1992) *Chemical*

Physics Letters **189**, 67-75

- [173] Martinez, G. V., Dykstra, E. M., Lope-Piedrafita, S., Job, C., and Brown, M. F. (2002) *Phys Rev E Stat Nonlinear Soft Matter Phys* **66**, 050902
- [174] Henriksen, J., Rowat, A. C., Brief, E., Hsueh, Y. W., Thewalt, J. L., Zuckermann, M. J., and Ipsen, J. H. (2006) *Biophys J* **90**, 1639-1649
- [175] Hsueh, Y. W., Chen, M. T., Patty, P. J., Code, C., Cheng, J., Frisken, B. J., Zuckermann, M., and Thewalt, J. (2007) *Biophys J* **92**, 1606-1615
- [176] Tsamaloukas, A., Szadkowska, H., and Heerklotz, H. (2006) *Biophys J* **90**, 4479-87
- [177] Oradd, G., Westerman, P. W., and Lindblom, G. (2005) *Biophys J* **89**, 315-320
- [178] Lindblom, G., Oradd, G., and Filippov, A. (2006) *Chem Phys Lipids*
- [179] Radhakrishnan, A., and McConnell, H. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12662-12666
- [180] Barenholz, Y., and Thompson, T. E. (1980) *Biochim Biophys Acta* **604**, 129-158
- [181] Patton, S. (1970) *J Theor Biol* **29**, 489-491
- [182] Lange, Y., Swaisgood, M. H., Ramos, B. V., and Steck, T. L. (1989) *J Biol Chem* **264**, 3786-3793
- [183] van Meer, G. (1989) *Annu Rev Cell Biol* **5**, 247-275
- [184] Jansson, M., Thurmond, R. L., Trouard, T. P., and Brown, M. F. (1990) *Chem Phys Lipids* **54**, 157-170
- [185] Petrache, H. I.; Salmon, A.; Brown, M. F. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 12611-12622
- [186] Meleard, P., Gerbeaud, C., Pott, T., Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M. D., Dufourcq, J., and Bothorel, P. (1997) *Biophys J* **72**, 2616-2629
- [187] Nevzorov, A. A., Trouard, T. P., and Brown, M. F. (1998) *Phys Rev E* **58**, 2259-2281
- [188] Brown, M. F., Thurmond, R. L., Dodd, S. W., Otten, D., and Beyer, K. (2002) *J Am Chem Soc* **124**, 8471-8484
- [189] Rajamoorthi, K., Petrache, H. I., McIntosh, T. J., and Brown, M. F. (2005) *J Am Chem Soc* **127**, 1576-1588
- [190] Brown, M. F., Ribeiro, A. A., and Williams, G. D. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4325-4329
- [191] Goldfine, H. (1984) *J. Lipid Res.* **25**, 1501-1507
- [192] Lindblom, G., Oradd, G., Rilfors, L., and Morein, S. (2002) *Biochemistry* **41**, 11512-11515
- [193] Beranova, J., Jemiola-Rzeminska, M., Elhottova, D., Strzalka, K., and Konopasek, I. (2008) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 445-453
- [194] Rodriguez-Vargas, S., Sanchez-Garcia, A., Martinez-Rivas, J. M., Prieto, J. A., and Randez-Gil, F. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 110-116

- [195] Almeida, P. F., Vaz, W. L., and Thompson, T. E. (1993) *Biophys J* **64**, 399-412
- [196] Corvera, E., Mouritsen, O. G., Singer, M. A., and Zuckermann, M. J. (1992) *Biochim Biophys Acta* **1107**, 261-270
- [197] Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P., and Slotte, J. P. (2002) *Prog Lipid Res* **41**, 66-97
- [198] Morrow, M. R., Singh, D., Lu, D., and Grant, C. W. (1995) *Biophys J* **68**, 179-186
- [199] Stockton, G. W., and Smith, I. C. (1976) *Chem Phys Lipids* **17**, 251-263
- [200] Davies, M. A., Schuster, H. F., Brauner, J. W., and Mendelsohn, R. (1990) *Biochemistry* **29**, 4368-4373
- [201] Wu, W. G., and Chi, L. M. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4683-4685
- [202] Yeagle, P. L. (1985) *Biochim Biophys Acta* **822**, 267-287
- [203] Kariel, N., Davidson, E., and Keough, K. M. (1991) *Biochim Biophys Acta* **1062**, 70-76
- [204] Mabrey, S., Mateo, P. L., and Sturtevant, J. M. (1978) *Biochemistry* **17**, 2464-2468
- [205] Aittoniemi, J., Niemela, P. S., Hyvonen, M. T., Karttunen, M., and Vattulainen, I. (2007) *Biophys. J.* **92**, 1125-1137
- [206] Hsueh, Y. W., Chen, M. T., Patty, P. J., Code, C., Cheng, J., Frisken, B. J., Zuckermann, M., and Thewalt, J. (2007) *Biophys J* **92**, 1606-1615
- [207] Giocondi, M. C., Boichot, S., Plenat, T., and Le Grimellec, C. C. (2004) *Ultramicroscopy* **100**, 135-143
- [208] Giocondi, M. C., Milhiet, P. E., Dosset, P., and Le Grimellec, C. (2004) *Biophys J* **86**, 861-869
- [209] Oradd, G., Westerman, P. W., and Lindblom, G. (2005) *Biophys J* **89**, 315-320
- [210] Filippov, A., Oradd, G., and Lindblom, G. (2006) *Biophys J* **90**, 2086-2092
- [211] Huster, D., Arnold, K., and Gawrisch, K. (1999) *J. Phys. Chem. B* **103**, 243-251
- [212] Petrache, H. I., Gouliaev, N., Tristram-Nagle, S., Zhang, R., Suter, R. M., and Nagle, J. F. (1998) *Physical Review E* **57**, 7014-7024
- [213] White, S. H., Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., and Hristova, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 32395-32398
- [214] Bretscher, M. S. (1973) *Science* **181**, 622-629
- [215] Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P., and Slotte, J. P. (2002) *Prog Lipid Res* **41**, 66-97
- [216] Barenholz, Y., and Thompson, T. E. (1999) *Chem Phys Lipids* **102**, 29-34
- [217] Feigenson, G. W. (2006) *Nat Chem Biol* **2**, 560-563
- [218] Urbina, J. A., Pekarar, S., Le, H. B., Patterson, J., Montez, B., and Oldfield, E. (1995) *Biochim Biophys Acta* **1238**, 163-176
- [219] Endress, E., Heller, H., Casalta, H., Brown, M. F., and Bayerl, T. M. (2002)

- Biochemistry* **41**, 13078-13086
- [220] Aussenac, F., Tavares, M., and Dufourc, E. J. (2003) *Biochemistry* **42**, 1383-1390
- [221] Sugar, I. P., Thompson, T. E., and Biltonen, R. L. (1999) *Biophys J* **76**, 2099-2110
- [222] Jerala, R., Almeida, P. F., and Biltonen, R. L. (1996) *Biophys J* **71**, 609-615
- [223] Tokutake, N., Jing, B., and Regen, S. L. (2003) *J Am Chem Soc* **125**, 8994-8995
- [224] Huang, J., Swanson, J. E., Dibble, A. R., Hinderliter, A. K., and Feigenson, G. W. (1993) *Biophys J* **64**, 413-425
- [225] Takeda, A., Mallory, M., Sundsmo, M., Honer, W., Hansen, L., and Masliah, E. (1998) *Am J Pathol* **152**, 367-372
- [226] Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2002) *FEBS Lett* **522**, 9-13
- [227] Bisaglia, M., Trolio, A., Bellanda, M., Bergantino, E., Bubacco, L., and Mammi, S. (2006) *Protein Sci* **15**, 1408-1416
- [228] H. Robinson, B., C. White, N., and Mateo, C. (1975) *Advances in Molecular Relaxation Processes* **7**, 321-338
- [229] Newbery, J. E. (1979) *Colloid & Polymer Science* **257**, 773-775
- [230] Ipsen, J. H., and Mouritsen, O. G. (1988) *Biochim Biophys Acta* **944**, 121-134
- [231] Seelig, J. (1997) *Biochim Biophys Acta* **1331**, 103-116
- [232] Kim, Y. S., Laurine, E., Woods, W., and Lee, S. J. (2006) *J Mol Biol* **360**, 386-97
- [233] Maroteaux, L., Campanelli, J. T., and Scheller, R. H. (1988) *J Neurosci* **8**, 2804-2815
- [234] Withers, G. S., George, J. M., Banker, G. A., and Clayton, D. F. (1997) *Brain Res Dev Brain Res* **99**, 87-94
- [235] Irizarry, M. C., Kim, T. W., McNamara, M., Tanzi, R. E., George, J. M., Clayton, D. F., and Hyman, B. T. (1996) *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 889-895
- [236] Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A., Okochi, M., Leimer, U., van Der Putten, H., Probst, A., Kremmer, E., Kretzschmar, H. A., and Haass, C. (2000) *J Neurosci* **20**, 6365-6373
- [237] Jo, E., Darabie, A. A., Han, K., Tandon, A., Fraser, P. E., and McLaurin, J. (2004) *Eur J Biochem* **271**, 3180-3189
- [238] Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H. B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., Hammer, R. E., Battaglia, G., German, D. C., Castillo, P. E., and Sudhof, T. C. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14966-14971
- [239] Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O. M., and Sudhof, T. C. (2005) *Cell* **123**, 383-396
- [240] Arnulphi, C., Sanchez, S. A., Tricerri, M. A., Gratton, E., and Jonas, A. (2005) *Biophys J* **89**, 285-295

- [241] Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Lins, L., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., and Rosseneu, M. (1997) *Eur J Biochem* **243**, 650-659
- [242] Martin, I., Dubois, M. C., Saermark, T., and Ruyschaert, J. M. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 95-101
- [243] Gorshkova, I. N., Liadaki, K., Gursky, O., Atkinson, D., and Zannis, V. I. (2000) *Biochemistry* **39**, 15910-15919
- [244] Zhu, H. L., and Atkinson, D. (2004) *Biochemistry* **43**, 13156-13164
- [245] Fang, Y., Gursky, O., and Atkinson, D. (2003) *Biochemistry* **42**, 6881-6890
- [246] Kessler, J. C., Rochet, J. C., and Lansbury, P. T., Jr. (2003) *Biochemistry* **42**, 672-678
- [247] Perrin, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F., and George, J. M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 34393-34398
- [248] Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., Jr., and Browne, G. (2001) *J Mol Biol* **307**, 1061-1073
- [249] Sanchez-Ruiz, J. M., and Makhatadze, G. I. (2001) *Trends Biotechnol* **19**, 132-135
- [250] Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U., and Schmid, F. X. (2000) *Nat Struct Biol* **7**, 380-383
- [251] Spector, S., Wang, M., Carp, S. A., Robblee, J., Hendsch, Z. S., Fairman, R., Tidor, B., and Raleigh, D. P. (2000) *Biochemistry* **39**, 872-879
- [252] Bussell, R., Jr., and Eliezer, D. (2004) *Biochemistry* **43**, 4810-4818
- [253] Bussell, R., Jr., Ramlall, T. F., and Eliezer, D. (2005) *Protein Sci* **14**, 862-872
- [254] Wilfried Blokzijl, J. B. F. N. E. (1993) *Angewandte Chemie International Edition in English* **32**, 1545-1579
- [255] Baldwin, R. L. (2007) *J Mol Biol* **371**, 283-301
- [256] Pollanen, M. S., Dickson, D. W., and Bergeron, C. (1993) *J Neuropathol Exp Neurol* **52**, 183-191
- [257] Gertz, H. J., Siegers, A., and Kuchinke, J. (1994) *Brain Res* **637**, 339-341
- [258] Kastner, A., Hirsch, E. C., Herrero, M. T., Javoy-Agid, F., and Agid, Y. (1993) *J Neurochem* **61**, 1024-1034
- [259] Bergeron, C., Petrunka, C., Weyer, L., and Pollanen, M. S. (1996) *Am J Pathol* **148**, 267-272
- [260] Tompkins, M. M., and Hill, W. D. (1997) *Brain Res* **775**, 24-29
- [261] Lashuel, H. A., Petre, B. M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R. J., Walz, T., and Lansbury, P. T., Jr. (2002) *J Mol Biol* **322**, 1089-1102
- [262] Volles, M. J., Lee, S. J., Rochet, J. C., Shtilerman, M. D., Ding, T. T., Kessler, J. C., and Lansbury, P. T., Jr. (2001) *Biochemistry* **40**, 7812-7819
- [263] Salamon, Z., Brown, M. F., and Tollin, G. (1999) *Trends Biochem Sci* **24**, 213-

- [264] Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989) *Anal Biochem* **177**, 244-249
- [265] Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., and Singh, S. (2005) *J Struct Biol* **151**, 229-238
- [266] Perczel, A., Hudaky, P., and Palfi, V. K. (2007) *J Am Chem Soc* **48**, 14959-65
- [267] Martins, I. C., Kuperstein, I., Wilkinson, H., Maes, E., Vanbrabant, M., Jonckheere, W., Van Gelder, P., Hartmann, D., D'Hooge, R., De Strooper, B., Schymkowitz, J., and Rousseau, F. (2007) *Embo J* **27**, 224-33
- [268] Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M., and Biere, A. L. (1999) *J Biol Chem* **274**, 19509-19512
- [269] Hoyer, W., Antony, T., Cherny, D., Heim, G., Jovin, T. M., and Subramaniam, V. (2002) *J Mol Biol* **322**, 383-393
- [270] Lomakin, A., Asherie, N., and Benedek, G. B. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10254-10257
- [271] McManus, J. J., Lomakin, A., Ogun, O., Pande, A., Basan, M., Pande, J., and Benedek, G. B. (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 16856-16861
- [272] Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) *Science* **297**, 353-356
- [273] Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6448-6453
- [274] Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003) *Science* **300**, 486-489
- [275] Jang, H., Zheng, J., and Nussinov, R. (2007) *Biophys J* **93**, 1938-49
- [276] Volles, M. J., and Lansbury, P. T., Jr. (2002) *Biochemistry* **41**, 4595-4602
- [277] Ambroggio, E. E., Kim, D. H., Separovic, F., Barrow, C. J., Barnham, K. J., Bagatolli, L. A., and Fidelio, G. D. (2005) *Biophys J* **88**, 2706-2713
- [278] Mattson, M. P. (1994) *Ann N Y Acad Sci* **747**, 50-76
- [279] Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., and Rydel, R. E. (1992) *J Neurosci* **12**, 376-389
- [280] Smith, D. P., Tew, D. J., Hill, A. F., Bottomley, S. P., Masters, C. L., Barnham, K. J., and Cappai, R. (2008) *Biochemistry* **47**, 1425-1434
- [281] Devanathan, S., Salamon, Z., Lindblom, G., Grobner, G., and Tollin, G. (2006) *Febs J* **273**, 1389-1402
- [282] Barenholz, Y., Gatt, S. (1982) in *Phospholipids*, pp. 129-177
- [283] Waschuk, S. A., Elton, E. A., Darabie, A. A., Fraser, P. E., and McLaurin, J. A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 33561-33568
- [284] Lindström, F., Bokvist, M., Sparrman, T., and Gröbner, G. (2002) *Physical*

Chemistry Chemical Physics **4**, 5524-5530

- [285] Yamaji-Hasegawa, A., Makino, A., Baba, T., Senoh, Y., Kimura-Suda, H., Sato, S. B., Terada, N., Ohno, S., Kiyokawa, E., Umeda, M., and Kobayashi, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 22762-22770
- [286] Ishitsuka, R., and Kobayashi, T. (2007) *Biochemistry* **46**, 1495-1502
- [287] Sokolov, Y., Kozak, J. A., Kaye, R., Chanturiya, A., Glabe, C., and Hall, J. E. (2006) *J. Gen. Physiol.* **128**, 637-647
- [288] Foguel, D., Suarez, M. C., Ferrao-Gonzales, A. D., Porto, T. C. R., Palmieri, L., Einsiedler, C. M., Andrade, L. R., Lashuel, H. A., Lansbury, P. T., Kelly, J. W., and Silva, J. L. (2003) *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 9831-9836
- [289] Schenk, D. B., Seubert, P., Grundman, M., and Black, R. (2005) *Neurodegenerative Diseases* **2**, 255-260
- [290] Nitsch, R. M. (2004) *Alzheimer Dis Assoc Disord* **18**, 185-189
- [291] Jansson, M., Thurmond, R. L., Barry, J. A., and Brown, M. F. (1992) *J. Phys. Chem.* **96**, 9532-9544
- [292] Bevington, P. E. (1969) *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, McGraw-Hill, New York
- [293] McCabe, M., and Wassail, S. (1997) *Solid State Nucl Magn Reson* **10**, 53-61
- [294] Nagle, J. F., and Wilkinson, D. A. (1978) *Biophys J* **23**, 159-175
- [295] Petrache, H. I., Feller, S. E., and Nagle, J. F. (1997) *Biophys J* **72**, 2237-2242
- [296] Armen, R. S., Uitto, O. D., and Feller, S. E. (1998) *Biophys J* **75**, 734-744

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, in der Arbeitsgruppe von Professor Doktor Klaus Beyer durchgeführt. Seinen zahlreichen, aus schier unbegrenzten Literaturkenntnissen schöpfenden Anregungen, sowie spontanen und unkomplizierten Hilfestellung verdanke ich es, dass diese Arbeit innerhalb der vorgegebenen drei Jahre mit so gutem Ergebnis fertiggestellt werden konnte. Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich natürlich für die moralische und finanzielle Unterstützung, nicht nur während meiner Promotion, sondern während meines gesamten Chemie-Studiums. Ein herzlicher Dank geht auch an alle weiteren Personen, die mit mir in den letzten 3 Jahren unter die Arme gegriffen haben:

Herrn Prof. Dr. Buchner für seine spontane Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten, zu unterstützen und mich zu prüfen.

Frau Brigitte Nuscher danke ich für die stets bereitwillige Hilfe und labortechnische Unterstützung bei der Präparation oder Analyse vieler Proben, Sabine Odoy für die Bereitstellung von Protein, den Leuten in der Werkstatt für ihre tatkräftige Hilfe, sowie allen Laboranten hier am Lehrstuhl für ihre freundschaftliche Gesellschaft und tatkräftige Unterstützung. Dr. Frits Kamp danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die methodischen Tipps und Tricks.

Vanessa danke ich für ihren Glauben an mich, ihre Ermutigungen und ihre Geduld, wenn ich auf Grund von schiefgelaufenen Experimenten und Schlafmangel etwas übellaunig war.

Lucas und Ulf danke ich für ihre methodischen Hilfestellungen und stetige Bereitschaft interessante naturwissenschaftliche Zusammenhänge auch noch im Biergarten auszudiskutieren. Allen Doktoranden und Post-Docs in unserem SFB danke ich für eine witzige Zeit im Allgemeinen.

Als letztes danke ich natürlich Arne, Hanno, Jochen und Von Hahn dafür, dass sie mit mir seit der Schulzeit gelitten und gefeiert haben.

