

Charakterisierung thiopeptidunterstützter  
Lipidschichten zur Inkorporation von  
Membranproteinen

Von dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Eva-Kathrin Schmidt  
geboren am 09.03.1971 in Wolfsburg

1998

Referent: Prof. Dr. R. Hedrich

Korreferent: Prof. Dr. W. Knoll

Tag der Promotion: 18.12.1998

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
Summary .....	2
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Struktur und Funktion biologischer Membranen.....	5
1.2 Modellsysteme für die biologische Membran .....	7
1.2.1 Klassische Modellsysteme .....	7
1.2.2 Festkörperunterstützte Modellmembranen.....	8
1.3 Die Motivation dieser Arbeit .....	9
<b>2 Thiopeptidunterstützte Lipidschichten .....</b>	<b>10</b>
2.1 Der Aufbau geordneter Schichten.....	10
2.2 Thiopeptidmonoschichten.....	10
2.2.1 Bestimmung des Brechungsindex einer monomolekularen Thiopeptidschicht ..	11
2.3 Kraftmikroskopische Aufnahmen der thiopeptidbeschichteten Oberfläche .....	12
2.3.1 Diskussion der AFM Aufnahmen.....	14
2.4 Untersuchung verschiedener Peptidsequenzen .....	15
2.5 Kopplung von Lipidmolekülen an Thiopeptidschichten .....	16
2.6 Kopplung der karboxyterminalen Gruppen der Thiopeptide mit Lipidmolekülen .	17
2.7 Kopplung der aminoterminalen Gruppe der Thiopeptidmoleküle mit Lipiden .....	17
2.7.1 Nachweis der Kopplungsreaktion .....	18
2.8 Vesikelspreitung.....	19
2.8.1 Temperaturabhängigkeit der Vesikelfusion .....	19
2.8.2 Vergleich der resultierenden optischen Schichtdicken .....	20
2.9 Impedanzmessung und Ergebnisse der zyklischen Voltammetrie der peptid- verankerten Lipiddoppelschicht .....	21
2.10 Diskussion .....	24
<b>3 Untersuchung von RGD-Thiopeptidschichten.....</b>	<b>27</b>
3.1 Theoretische Grundlagen.....	27
3.2 Verwendete RGD Peptidsequenzen.....	30
3.3 Konzentrationsabhängigkeit der Schichtbildung.....	30
3.4 Vergleich zweier unterschiedlicher RGD-Peptide.....	32

3.5 Antikörperbindungen an immobilisierte RGD-Peptidschichten .....	33
3.6 Bindung des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors an eine RGD-Peptid beschichtete Oberfläche.....	34
3.7 Inkorporation des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors in eine peptidunterstützte Lipiddoppelschicht mit anschließender Vitronektinbindung.....	35
3.8 Diskussion.....	36
<b>4 Inkorporation der <math>H^+</math>ATPase (<math>CF_0</math> <math>CF_1</math>), isoliert aus Thylakoid- membranen der Spinatchloroplasten.....</b>	<b>38</b>
4.1 Theoretische Grundlagen.....	38
4.2 Abhängigkeit der Schichtdicke vom Proteingehalt der Vesikel .....	40
4.3 Untersuchung des nachträglichen Einbaus von Cholesterin - bzw. Protein- molekülen in eine thiopeptidunterstützte Lipidschicht .....	42
4.4 Funktionsnachweis der eingebauten $H^+$ -ATPase.....	43
4.5 Diskussion.....	45
<b>5 Inkorporation des nikotinischen Acetylcholinrezeptors in eine thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht .....</b>	<b>49</b>
5.1 Theoretische Grundlagen.....	49
5.1.1 Aufbau des Rezeptors.....	49
5.2 Einbau des Rezeptors durch Vesikelfusion auf einer thiopeptidunterstützten Lipidschicht.....	50
5.3 Antikörperbindung an den inkorporierten Rezeptor .....	51
5.4 Antikörperbindungen, nachgewiesen durch Oberflächenplasmonenfluoreszenz- spektroskopie.....	53
5.5 Bindung des Antagonisten $\alpha$ -Bungarotoxin an den inkorporierten Acetylcholin- rezeptor .....	54
5.6 Diskussion.....	55
<b>6 Inkorporation der Cytochrom c Oxidase, isoliert aus Rinderherz- mitochondrien, in eine thiopeptidunterstützte Lipidschicht .....</b>	<b>58</b>
6.1 Theoretische Grundlagen.....	58
6.2 Spontane Inkorporation der solubilisierten Cytochrom c Oxidase durch Unter- schreiten der kritischen Mizellkonzentration .....	59
6.3 Fluoreszenznachweis der inkorporierten Cytochrom c Oxidase .....	62

6.4 Bindungsassay polyklonaler Antikörper .....	64
6.5 Funktionsnachweis der inkorporierten Cytochrom c Oxidase .....	65
6.5.1 Elektrochemischer Funktionsnachweis der inkorporierten Cytochrom c Oxidase.....	65
6.5.2 Aktivitätsnachweis durch Impedanzspektroskopie .....	67
6.5.3 Abhängigkeit der Aktivität der Cytochrom c Oxidase von der Substratkonzentration .....	72
6.5.4 Inhibition der Cytochrom c Oxidase durch Cyanid .....	72
6.5.5 Simultanmessung der elektrischen und optischen Eigenschaften der Cytochrom c Oxidase .....	73
6.6 Diskussion .....	75
<b>7 Untersuchungsmethoden .....</b>	<b>83</b>
7.1 Oberflächenplasmonenspektroskopie .....	83
7.1.1 Theoretische Grundlagen.....	84
7.1.2 Meßanordnung.....	87
7.1.3 Einfluß von ultradünnen Schichten auf die Dispersion von Plasmonen.....	89
7.1.4 Kinetik-Messungen .....	90
7.1.5 Substratpräparation .....	91
7.2 Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie.....	91
7.2.1 Theoretische Grundlagen.....	91
7.2.2 Meßanordnung.....	92
7.3 Impedanzspektroskopie.....	92
7.3.1 Theoretische Grundlagen.....	93
7.3.2 Impedanzmeßzelle.....	93
7.3.3 Interpretation der Meßergebnisse .....	94
7.3.4 Experimentelle Durchführung.....	97
7.4 Zyklische Voltammetrie.....	97
7.4.1 Theoretische Grundlagen.....	97
7.4.2 Experimentelle Durchführung.....	100
7.5 Rechteckwellenvoltammetrie (‘Square Wave Voltammetrie’ SWV).....	100
7.6 Die Rasterkraftmikroskopie.....	101
<b>8 Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>103</b>

<b>9 Literatur.....</b>	<b>108</b>
<b>10 Anhang.....</b>	<b>116</b>
<b>11 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>118</b>
<b>12 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>119</b>
<b>13 Lebenslauf.....</b>	<b>121</b>
<b>14 Danksagung.....</b>	<b>122</b>

## Zusammenfassung

inkorporierte Membranproteine, thiopeptidunterstützte Membranen, funktionalisierte Oberflächen

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung und Optimierung eines verankerten Schichtsystems beschrieben, das eine natürliche Biomembran in ihren Eigenschaften nachahmt. Dieses System besteht aus einer Lipidschicht, die über eine Thiopeptidschicht kovalent an ein Goldsubstrat gebunden ist.

Die Eigenschaften dieser Architektur werden mit den Methoden der Oberflächenplasmonenspektroskopie, Röntgenreflektometrie, Impedanzspektroskopie, zyklischen Voltammetrie und der Kraftmikroskopie untersucht.

Die Ergebnisse der Kraftmikroskopie zeigen, daß die Peptidschicht die Goldoberfläche homogen bedeckt und so die Oberfläche vor Kontamination schützt. Elektrische Messungen zeigen, daß die Eigenschaften der Oberfläche auch nach längerer Lagerung unverändert bleiben.

Eine Funktionalisierung der Oberfläche mit biologisch aktiven Peptidsequenzen wird anhand der Wechselwirkung mit Zelladhäsionsrezeptoren, bzw. Antikörpern gezeigt.

Durch Vesikelspreitung wird die peptidunterstützte Lipidmonoschicht zu einer Lipiddoppelschicht ergänzt. Dabei zeigt sich, daß sich bei Überschreiten der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide, reproduzierbar eine Lipiddoppelschicht bildet, die die Oberfläche jedoch nur zu etwa 70% bedeckt.

Sind Membranproteine in den Vesikeln enthalten, integrieren sie sich in die planare Lipidschicht. Eine alternative Möglichkeit der Inkorporation von Membranproteinen wird durch Unterschreitung der kritischen Mizellkonzentration solubilisierter Membranproteine gezeigt. Folgende Membranproteine werden in dem Modellsystem charakterisiert:

Die H<sup>+</sup>ATPase aus Spinatchloroplasten wird in die thiopeptidunterstützte Lipidschicht rekonstituiert. Die Funktionalität der inkorporierten Enzyme wird mit der Methode der Rechteckwellenvoltammetrie nachgewiesen.

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor, isoliert aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens, wird als Beispiel für einen Rezeptor in die thiopeptidunterstützte Lipidschicht rekonstituiert. In Kombination mit einem Antikörperbindungsassay werden

Bindungsvorgänge an Rezeptoren, inkorporiert in die thiopeptidunterstützte Lipidschicht, mit der Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie nachgewiesen. Die erfolgte Bindung ist ein Hinweis auf die Inkorporation und die Orientierung der inkorporierten Rezeptoren.

Ein weiteres Membranprotein, das in dem Modellsystem charakterisiert wird, ist die Cytochrom c Oxidase aus Rinderherzmitochondrien. Ausführliche Messungen der Substratabhängigkeit des Enzyms bzw. seiner Inhibierung durch irreversible Bindung von Cyanid werden mit der Impedanzspektroskopie gemessen.

Durch die Inkorporation dieser Membranproteine wird die Anwendbarkeit der thiopeptidunterstützten Modellmembran als ein Sensorsystem für biologisch aktive Substanzen gezeigt. Die Kombination verschiedener Meßmethoden ermöglicht den empfindlichen Nachweis von Bindungsvorgängen, bzw. die Messung der Aktivität inkorporierter Membranproteine.



## Summary

incorporated membrane proteins, thiopeptide supported membranes, functionalized surfaces

In this work the development of a system is described, which models as a native biomembrane. The layer system consists of a thiopeptide tethered lipid layer, which is covalently bound to a gold surface.

The properties of this architecture are characterized by using a wide spectrum of techniques, such as surface plasmon spectroscopy, x-ray photoelectron spectroscopy, impedance spectroscopy, cyclic voltammetry and atomic force microscopy.

On the gold surface, the AFM shows a homogeneous layer formed by the thiopeptide molecules. This layer protects the surface from contamination with material, that binds unspecifically. The long term stability of the surface properties are demonstrated by electric measurement techniques.

The functionalization of the surface by thiopeptides, with biological function properties, is shown by the interaction with integrin receptors (cell adhesion molecules) and antibody binding, respectively.

The spreading of lipid vesicles transforms the peptide tethered lipid mono layer into a lipid double layer. This process is strongly temperature dependent: the phase transition temperature of the lipid must be exceeded.

However, the obtained double layer shows strong defects. Only 70% of the surface area are covered by the double layer.

For the insertion of membrane proteins in the thiopeptide supported lipid layer, vesicles with reconstituted proteins are used. Alternatively, detergent solubilized proteins are diluted below the critical micellar concentration. Using this techniques the proteins incorporate in the preformed lipid bilayer spontaneously. The following membrane proteins serve as examples for the incorporation into the thiopeptide - supported lipid layer:

H<sup>+</sup>ATPase, isolated from spinach chloroplasts, is incorporated into the layer system in a functional active form as shown by square wave voltammetry.

The nicotinic acetylcholine receptor, isolated from the electric organ of the electric fish, is an example for a reconstituted receptor protein. The different binding assays with

antibodies indicate the successful incorporation of the receptor into the lipid bilayer. The successful binding also indicates that at least a portion of the receptor molecules are oriented with the acetylcholine binding domain pointing to the outside of the lipid bilayer. Furthermore, the mitochondrial cytochrom c oxidase is investigated with respect to the layer system. Detailed studies of the substrate-dependency and inhibition of the protein are described.

In summary, the incorporation of different proteins shows the feasibility of thiopeptide supported lipid layers for sensoric purposes. The Combination of different characterization techniques allows the detailed investigation of binding processes of incorporated membrane proteins.

# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur und Funktion biologischer Membranen

Die Existenz biologischer Zellen ist an das Vorhandensein von Membranen gebunden. Sie sind für die Kompartimentierung einer Zelle verantwortlich, dafür, daß Ionenströme auf Grund von Enthalpie - oder Potentialdifferenzen fließen, die durch Membranen aufrechterhalten werden. Sie ermöglichen die Kopplung von Energie mit Metabolismus: die beiden wichtigsten Prozesse der Energiegewinnung, die Photosynthese und die Atmungskette sind ursächlich mit der Existenz von Membranen verbunden.

Biologische Membranen wirken als selektive Barrieren für einen kontrollierten Stoffwechsel. Phospholipide sind die wesentlichen Bausteine dieser Membranen. So verschieden die Funktionen biologischer Membranen sind, der Aufbau ist universal: Eine biologische Membran besteht aus zwei monomolekularen Lipidschichten, deren hydrophile Phosphatgruppen in die wäßrige Phase orientiert sind. Der amphiphile Charakter der Phospholipide bewirkt, daß sie in wäßriger Umgebung stabil sind. Lipiddoppelschichten verhalten sich wie zweidimensionale Flüssigkeiten (*'fluid mosaic'*-Modell [Sin72]), in der die einzelnen Lipidmoleküle eine hohe laterale Beweglichkeit aufweisen.

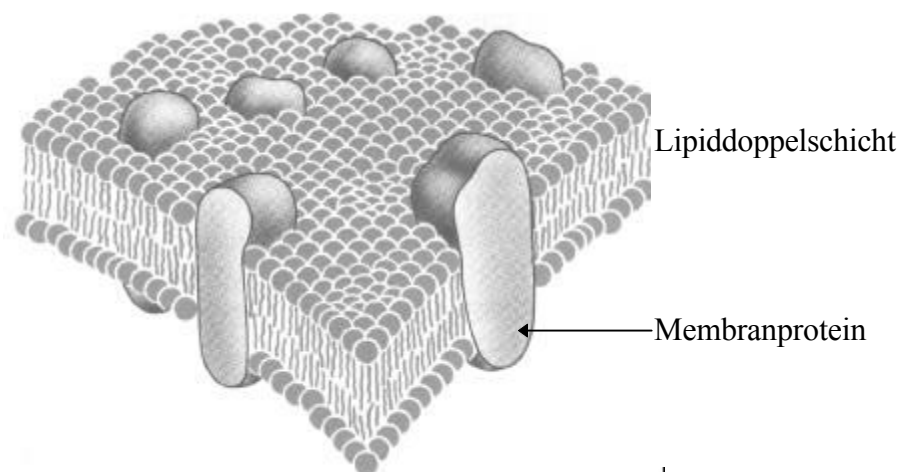


Abb. 1.1.1: Flüssig-Mosaik-Modell nach S.J. Singer und G.L. Nicolson. Membranständige und membrandurchspannende Proteine sind in einer fluiden Matrix einer Lipiddoppelschicht inkorporiert. [Sin72]

Diese Lipiddoppelschicht einer eukaryontischen Membran bildet eine nahezu impermeable Barriere für geladene bzw. größere Moleküle. In dieser Eigenschaft liegt ihre wichtigste Funktion: die Separation von Reaktionsräumen und damit die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten, in denen Stoffwechselenergie konserviert ist. Die Funktionalisierbarkeit eukaryontischer Membranen wird durch den Einbau von Proteinen erreicht:

Membranproteine sind durch nichtkovalente, kooperative Bindungen in der Membran 'gelöst', wodurch eine hohe laterale Beweglichkeit gewährleistet ist. Die Membranarchitektur wird durch den Einbau von Proteinen asymmetrisch, da die Funktionalität der Proteine mit einer geometrischen Orientierung in der Membran verbunden ist.

Membranproteine erfüllen vielfältige Aufgaben, sie wirken als:

1. Rezeptoren, die Ausgangspunkt von Signaltransduktionsvorgängen sein können.
2. Strukturelemente, die die Stabilität der Membran und ihre Verankerung an das Zytoskelett bewirken.
3. Transportkatalysatoren, die die Membran selektiv für Stoffwechselprodukte permeabel machen.
4. Enzyme, die spezifisch Reaktionen katalysieren.
5. Pumpen, die verantwortlich für die Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von Membranpotentialen sind.

Durch die Charakterisierung isolierter Membranproteine soll Einblick in die komplexen Zusammenhänge membrangebundener Stoffwechselprozesse gewonnen werden. Die Entwicklung artifizieller Lipiddoppelschichten ermöglicht die Untersuchung isolierter Proteine in einem Modellsystem.

Die Erarbeitung der physikalischen Prinzipien, auf denen die Proteinfunktion beruht, ist notwendig, um Proteine gezielt in ihren Eigenschaften verändern zu können und sogar Proteine mit vorgegebenen Eigenschaften *de novo* zu synthetisieren. Es ist zu erwarten, daß die dabei gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere Klassen von Makromolekülen übertragen werden können und bei der Entwicklung von '*nanoscale devices*' Anwendung finden.

## 1.2 Modellsysteme für die biologische Membran

Ziel der Entwicklung von Modellsystemen ist die Nachahmung der natürlichen Umgebung von Membranproteinen (*biomimesis*).

Die wichtigsten Modellsysteme sind in der Abb. 1.2.1 dargestellt:

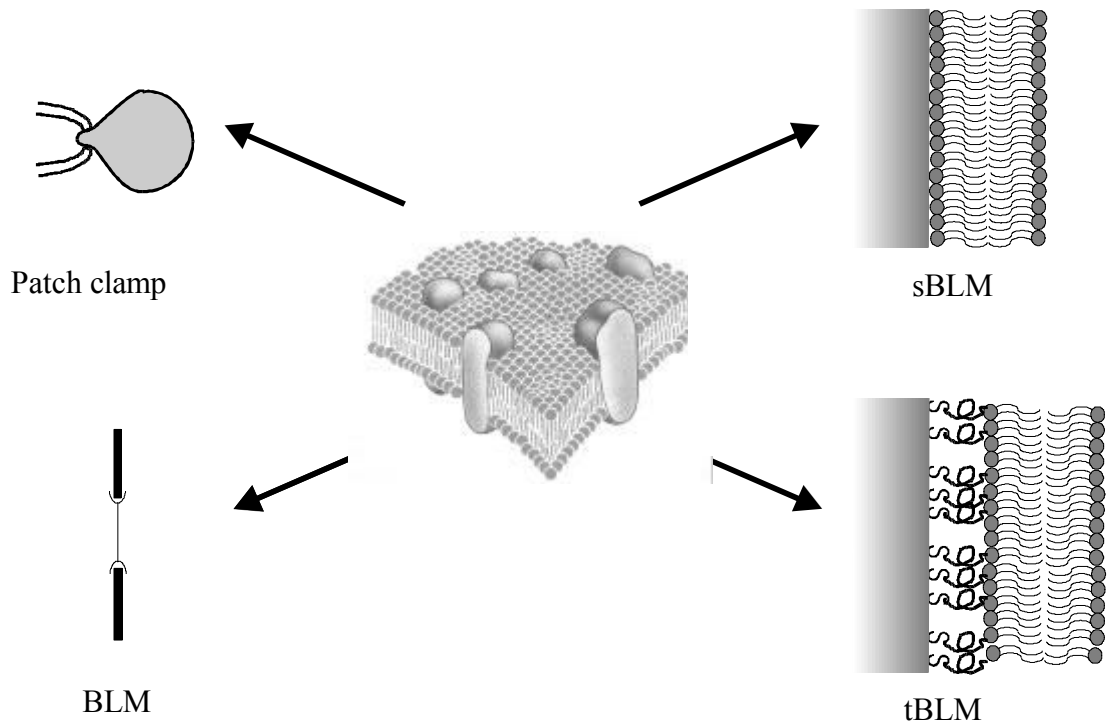


Abb. 1.2.1: Dargestellt sind die verschiedenen Modellsysteme, die eine Biomembran in ihren Eigenschaften nachahmen: 'patch clamp' Messung an Vesikeln, 'BLM' black lipid membrane, 'sBLM' supported lipid membrane, 'tBLM' tethered lipid membrane.

### 1.2.1 Klassische Modellsysteme

Modellsysteme, die schon länger zur Untersuchung von Membranproteinen eingesetzt werden, sind:

1. Bimolekulare oder schwarze Membranen (BLM)
2. Membranfragmente, die an Oberflächen adsorbieren (sBLM, bzw. tBLM)
3. Liposomen mit rekonstituierten Proteinen

Diese zum Teil sehr gut charakterisierten Modelle zeigen jedoch systemimmanente Nachteile. So enthalten Membranfragmente naturgemäß Fremdproteine, die die Meßergebnisse in unerwünschter Weise beeinflussen. Die in Punkt 3. erwähnten Liposomen können in einer definierten Zusammensetzung hergestellt werden, sie sind über längere Zeiträume stabil und eignen sich für die Rekonstitution von Proteinen [Sha95], [Ste98] [Szo80]. Elektrisch charakterisierbar sind sie jedoch nur als 'giant

*liposomes*' mit der *'patch clamp'* Methode [Ham81], [Neh92], [Cah92]. Schwarze Membranen (1.) [Cor86], sind ebenfalls perfekt definiert in ihrer Zusammensetzung, aber die Inkorporation von Proteinen ist aufgrund des hohen Lateraldruckes der Membran nur schwer zu erreichen. Schließlich sind schwarze Membranen nicht über einen längeren Zeitraum stabil. Diese Überlegungen führen zu der Entwicklung von festkörperunterstützten Membranen.

### 1.2.2 Festkörperunterstützte Modellmembranen

Membranen, die an planare Oberflächen gebunden sind, zeigen im Vergleich mit den oben beschriebenen Modellsystemen ein hohes Maß an Stabilität [Ulm91], [Sac96]. An planaren, festkörperunterstützten Systemen ist es außerdem möglich, eine Reihe von Untersuchungsmethoden, wie Röntgenreflektometrie, Neutronenstreuung, Oberflächenplasmonenspektroskopie, Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie, Antikörperbindungsassays, Impedanzspektroskopie, zyklische Voltammetrie, Kraftmikroskopie und Infrarotspektroskopie anzuwenden.

Festkörperunterstützte Membranen werden hauptsächlich verwendet, um Kanalproteine [Sza98] bzw. Carrierproteine zu inkorporieren. Eine große Anzahl unterschiedlicher Porenbildner, darunter Antibiotika wie Alameticin, Gramicidin A, Nystatin und Amphotericin [Lin97], [Cor97], [Cuk97], [Hia91], [Hen89] wurden in festkörperunterstützte Membranen inkorporiert und untersucht. Weniger häufig sind komplexere Proteine, wie Cytochrom c Oxidase [Sal93], [Sal96] und Rhodopsin [Hey98] bzw. Bakteriorhodopsin [Ste96,97] in diesen Membranen untersucht worden. Durch den direkten Kontakt zu einem Festkörper können komplexe periphere Proteine häufig nicht inkorporiert werden, da für ihre peripheren Domänen kein Raum zwischen Oberfläche und Lipidschicht besteht. Ein weiterer Grund ist die hohe Oberflächenenergie und die mangelnde Fluidität oberflächenfixierter Systeme, so daß die inkorporierten Proteine in ihrer nativen Konformation beeinflußt werden, was zur Denaturierung führt. Schließlich fehlt die wäßrige Phase zwischen Substrat und Lipidschicht, was die Messung von Ionenströmen erheblich erschwert.

Diese Überlegungen führen zu der Entwicklung verankerter festkörperunterstützter Modelle, in denen zwischen Substrat und Lipidschicht Abstandhaltermoleküle eingeführt werden. Dieser so geschaffene Zwischenraum soll dazu dienen, die Konformation und damit die Funktionalität eingebauter Proteine zu erhalten.

Als Abstandhalter wurden bisher verwendet:

- Oligo (oxyethylen) [Häu91], [Wol91], [Spi92], [Joh92], [Chi92].
- Polyoxyethylen [Cor97]
- Dextran [Ele96]
- Cellulose [Set82]
- Agar-Gel [Lu96]

An diesen Systemen werden kanalbildende Proteine und komplexe integrale Membranproteine untersucht. Die Untersuchungen der in diesen Systemen inkorporierten Proteine, zeigen, daß die Bedingungen in Anlehnung an eine natürliche Biomembran verbessert werden müssen, um verschiedene Nachweise ihrer Funktionalität erbringen zu können. Das thiopeptidunterstützte Membranmodell stellt den Ausgang für die Entwicklung eines solchen biomimetischen Systems dar.

### 1.3 Die Motivation dieser Arbeit

Orientierende Versuche haben ergeben [Nau95], daß eine Thiopeptidmonoschicht als ‘Abstandhalter’ ebenfalls geeignet ist, eine verankerte Lipidmembran aufzubauen. Ziel dieser Arbeit ist es, dieses System systematisch zu untersuchen und hinsichtlich der Peptidsequenz und der übrigen Präparationsbedingungen zu optimieren. Weiterhin soll die Fähigkeit des Systems untersucht werden, verschiedene Membranproteine zu inkorporieren und deren Bindungseigenschaften, Orientierung und Aktivität zu prüfen. Von besonderem Interesse sind dabei Membranproteine, die Ionen über die Lipidmembran transportieren. Die Bindung von Antikörpern an die inkorporierten Proteine wird durch die Anwendung oberflächenspezifischer optischer Methoden nachgewiesen. Die Verwendung einer thiopeptidunterstützten Lipiddoppelschicht wird hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit, Spezifität und Empfindlichkeit als Alternative zu den bisher bekannten Immunoassays geprüft.

In diesem Zusammenhang wird ein breites Spektrum von Untersuchungsmethoden angewendet, das von optischen und elektrischen Messungen bis zu biochemischen Techniken reicht.

## 2 Thiopeptidunterstützte Lipidschichten

### 2.1 Der Aufbau geordneter Schichten

Die Entwicklung selbstorganisierender Adsorptionsschichten (*self-assembled monolayers*) bietet eine interessante Alternative [Ulm91] zu der klassischen Langmuir-Blodgett-Kuhn Technik [Rob90], [Ulm91], um geordnete Schichten auf Oberflächen zu bilden. Selbstorganisierte Adsorptionsschichten basieren auf der starken Wechselwirkung zwischen Adsorbat und Oberfläche. Eine Vielzahl organischer Verbindungen eignet sich als Adsorbat, viele davon sind einfach zu präparieren, chemisch inert und mechanisch robust [Ulm91], [Bai89]. Um die Anordnung der Moleküle an der Oberfläche zu unterstützen, kann z.B. die Affinität von Thiolgruppen zu Goldoberflächen ausgenutzt werden [Bai89a], [Tan82], [Nuz83].

Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Thiopeptidsequenzen verwendet, die sich auf einer Goldoberfläche organisieren und die Unterlage für eine Lipiddoppelschicht bilden. Die Verbindung der Peptidmoleküle mit Lipidmolekülen und die Eigenschaften der resultierenden Schichten werden untersucht. Die Ergänzung der Peptidmonoschichten zu peptidunterstützten Lipiddoppelschichten durch Vesikelspreitung vervollständigt den Schichtaufbau des Modellsystems.

### 2.2 Thiopeptidmonoschichten

Die Untersuchungen gehen von einem Peptid aus (konzipiert und synthetisiert von Dr. Jonczyk, Merck KGaA) [Nau95], dessen Aminosäuresequenz, 3Mercaptopropionyl-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala, in der Abb. 2.2.1 dargestellt ist.

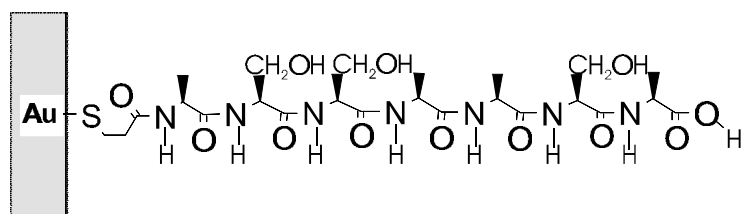


Abb. 2.2.1: Die Abbildung zeigt schematisch die Anbindung des Thiopeptides an die Goldoberfläche



Die Eigenschaften der Thiopeptidmonoschicht haben einen grundlegenden Einfluß auf die gesamte Architektur des Systems. Daher ist die ausführliche Charakterisierung der Peptidschicht notwendig, um die Eigenschaften des Systems zu optimieren.

### 2.2.1 Bestimmung des Brechungsindex einer monomolekularen Thiopeptidschicht

Der Brechungsindex dieser monomolekularen Peptidschicht ist nicht aus der Literatur bekannt. Er ist aber zur Auswertung der Ergebnisse der Plasmonenspektroskopie nötig, und wird daher mit dieser Methode bestimmt. Dazu werden Resonanzkurven (s. Kap.7.1) in Luft, Wasser, Pufferlösung und einem organischen Lösungsmittel, Dimethylformamid, gemessen, die gemäß der Fresnelgleichungen ausgewertet werden. Die Darstellungen aller Wertepaare, bestehend aus Brechungsindex ( $n$ ) und zugehöriger Schichtdicke ( $d$ ) in dem jeweiligen Dielektrikum, sollten sich in einem Schnittpunkt treffen. Wie in Abb. 2.2.2 gezeigt, schneiden sich die Kurven nicht in einem Punkt sondern begrenzen eine Fläche. Außerhalb dieses Bereiches befindet sich jedoch die Kurve, die in Dimethylformamid/LiCl [8mg/ml] gemessen wird, dem Lösungsmittel des Peptids. Der Mittelpunkt der Fläche der sich schneidenden Kurven liegt bei einem Wertepaar, das für den Brechungsindex des Thiopeptids  $n = 1,41$ , für die dazugehörige Schichtdicke  $d = 1,2 \text{ nm}$  ergibt. Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang, daß die Messung in Luft keine hohe Sensitivität für den Brechungsindex zeigt, jedoch empfindlicher für die Schichtdickenbestimmung ist. Messungen in wäßriger Umgebung hingegen erlauben eine weitgehende Eingrenzung der Werte für den Brechungsindex, divergieren aber in Bezug auf die Schichtdicke. Diese Tatsache beruht auf dem niedrigeren Kontrast in wäßrigen Lösungen. Die erhaltene Schichtdicke von 1,2nm für die Thiopeptimonolage entspricht etwa der durch Röntgenreflektometrie-Experimente gemessenen Schichtdicke von 1,5nm [Bun97]. Diese Abmessungen stimmen auch mit der berechneten Ausdehnung des Moleküls überein, die laut Literaturangaben 1,5nm beträgt [Nau95]. Daraus kann auf eine nahezu vollständige Bedeckung mit einer monomolekularen Schicht geschlossen werden. Die erhaltenen Werte für den Brechungsindex und für die Schichtdicke sind als konstant für alle weiteren Berechnungen anzunehmen.

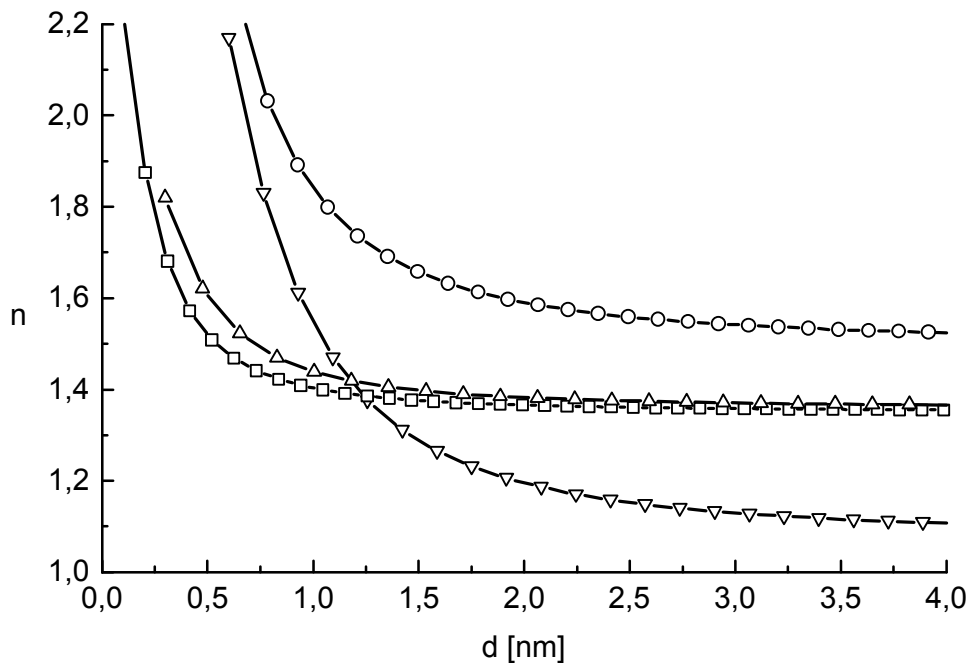


Abb. 2.2.2: Lorentz-Fits der Wertepaare aus Brechungsindex  $n$  und der Schichtdicke  $d$ , gemessen in Luft  $\nabla$ -, Wasser  $\square$ -, Puffer  $\Delta$ - und Dimethylformamid/LiCl [8mg/ml]  $\circ$ -.

### 2.3 Kraftmikroskopische Aufnahmen der thiopeptid- beschichteten Oberfläche

Kraftmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche geben Aufschluß über ihre Topographie (Abb. 2.3.1). Dazu wird das Thiopeptid in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,6mg/ml bzw. 1mg/ml in DMF/LiCl 8mg/ml) über einen Zeitraum von acht Stunden an Gold(1:1:1)-Mica (Glimmer) Oberflächen adsorbiert. Die Beschichtungslösung wird anschließend entfernt und mit reinem Lösungsmittel überschüssiges Material abgespült. Eventuelle anorganische Rückstände werden zunächst mit MQ-Wasser, dann mit Ethanol entfernt. Mit Stickstoff wird die Oberfläche getrocknet und in wässriger Lösung im ‘tapping mode’ (s. Kap.7.6) gemessen.

Unbeschichtetes Gold auf Mica wird mit den beiden thiopeptidbeschichteten Proben verglichen (Abb. 2.3.1). Eine Konzentration von 0,6mg/ml in der Beschichtungslösung ergibt eine Zunahme der Oberflächenrauheit ( $b$ ), was die Anwesenheit einer adsorbierten Schicht bestätigt. Eine wichtige Beobachtung besteht in der homogenen Verteilung der

Peptidmoleküle auf der Oberfläche. Eine periodisch kristalline Anordnung der Peptidmoleküle ist nicht erkennbar.

Im Vergleich zu (b) ergibt sich für die höhere Thiopeptidkonzentration von 1mg/ml eine deutlich andere Topographie (c). Erkennbar sind ungeordnete Strukturen, die sich mit der AFM-Spitze mechanisch leicht entfernen lassen, weil sie nur schwach an der Oberfläche adsorbiert sind. Diese adsorbierten Strukturen haben eine überwiegend ringförmige Struktur. Einige dieser Strukturen zeigen eine kraterförmige Vertiefung, die bis in die Goldschicht hineinreicht.

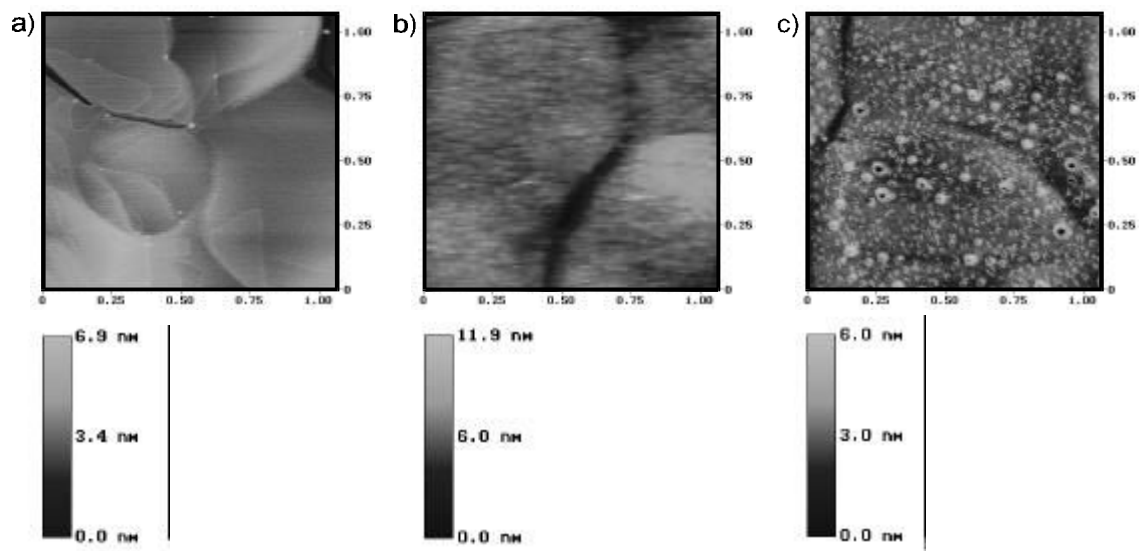


Abb. 2.3.1: AFM Aufnahmen, gemessen im 'tapping mode' in wässriger Lösung: a) 1:1:1 Gold, aufgedampft auf Mica, b) Nach Beschichtung mit 0,6mg/ml Peptid, c) Nach Beschichtung mit 1mg/ml Peptid

Ein weiteres Experiment besteht darin, durch eine Passivierung der Oberfläche die Bedeckung mit Peptidmolekülen nachzuweisen. Dazu wird ein Tropfen peptidhaltigen Lösungsmittels auf die Oberfläche gebracht, anschließend wird das überschüssige Material abgespült und die Oberfläche in MQ-Wasser im 'tapping mode' gemessen. Die Abb. 2.3.2 zeigt den Grenzbereich zwischen bedeckter, bzw. freier Oberfläche. Die linke Hälfte des gemessenen Bereiches ist mit Peptidmolekülen belegt, während die rechte Hälfte die unbeschichtete Goldoberfläche zeigt. Auf dieser zeigt sich nach längerer Inkubation in MQ-Wasser eine unspezifische Adsorption von Material aus der Umgebung (Verunreinigungen, bzw. Luftblasen), das die Grenze zu der peptidbeschichteten Oberfläche nachzeichnet. Die linke Hälfte zeigt - deutlich erkennbar

- keine unspezifische Adsorption. Daraus kann man schließen, daß die Peptidschicht die Goldoberfläche gegen unspezifische Adsorption schützt (passiviert).

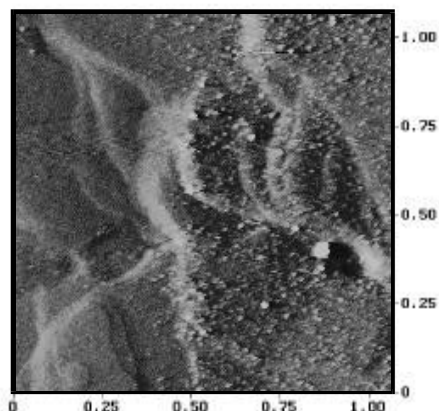


Abb. 2.3.2: AFM Aufnahme einer Gold(1:1:1)- Oberfläche, gemessen im 'tapping mode'. Gescannt wurde der Grenzbereich zwischen peptidbeschichteter, bzw. freier Oberfläche. Der linke Bereich zeigt die passivierte Oberfläche, die rechte Hälfte zeigt die unbeschichtete Oberfläche, auf der nach längerer Inkubationszeit unspezifisch Material aus der umgebenden Lösung adsorbiert.

### 2.3.1 Diskussion der AFM Aufnahmen

Die Beweglichkeit adsorbierter Moleküle auf Oberflächen ist ein wichtiger Parameter für ihre Abbildbarkeit mit der Methode der Rasterkraftmikroskopie. Alkylthiole, z.B. bilden hochgeordnete, kristalline Schichten, wodurch die Beweglichkeit der einzelnen Moleküle in der Schicht stark eingeschränkt ist [Alv92]. Sterisch kompliziertere Moleküle sind nur dann abbildbar, wenn sie ebenfalls Gitterstrukturen ausbilden, wie z.B. Azobenzylthiole [Wol95]. Durch fehlende bzw. geringe intermolekulare Wechselwirkungen besitzen die Thiopeptidschichten eine höhere Beweglichkeit, die dazu führt, daß sie durch die AFM Spitze nicht abgebildet werden können. Die Anwesenheit der adsorbierten Schicht zeigt sich daher nur durch die erhöhte Rauheit der Oberfläche. Einen zusätzlichen Hinweis erhält man aus der Passivierung der Oberfläche durch die Beschichtung mit Thiopeptidmolekülen.

Eine wichtige Beobachtung ist die gleichmäßige Verteilung der chemisorbierten Moleküle auf der Oberfläche, die auch in niedrigerer Auflösung keine Inhomogenitäten zeigt. Dieses Ergebnis spricht für eine monomolekulare Belegung der Oberfläche mit Thiopeptidmolekülen, besonders im Zusammenhang mit dem Ergebnis der Schichtbestimmung mittels Oberflächenplasmonenspektroskopie.

Bei höheren Konzentrationen bildet sich oberhalb der chemisorbierten Monoschicht zusätzlich eine physisorbierte Schicht mit ringförmigen Strukturen. Diese lassen sich leicht durch die AFM-Spitze entfernen. Diese Gebilde zeigen zum Teil kraterförmige Vertiefungen (in Abb. 2.3.1 (c) deutlich erkennbar), die so weit in die Goldoberfläche hineinragen, daß die Tiefe mit herkömmlichen AFM Spitzen nicht mehr bestimmbar ist. Eine Erklärung für diese Lochbildung ist, daß sich die Löslichkeit des Goldes an Stellen extrem hoher Thiopeptidkonzentration erhöht.

Basierend auf den Ergebnissen der AFM Messung, bzw. der Oberflächenplasmonenspektroskopie wird für die weiteren Experimente für die Beschichtungslösung eine Konzentration von 0,6mg/ml Thiopeptid gewählt.

Bei dieser Konzentration ist das Thiopeptid für die Beschichtung der Goldoberfläche geeignet, weil es:

- eine homogene Schicht bildet.
- mechanisch belastbar ist.
- die Oberfläche gegen unspezifische Adsorption passiviert.

## 2.4 Untersuchung verschiedener Peptidsequenzen

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit untersuchten Peptidsequenzen aufgelistet:

Nr.	Bemerkung	Sequenz	M <sub>w</sub>
1.	Ausgangssequenz	3Merkaptopropionyl-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala	651
2.	Modifizierung mit Pro-Ser-Ser (helixbrechende Sequenz)	3Merkaptopropionyl-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala- <b>Pro-Ser-Ser</b>	976,2
3.	Modifizierung mit hydrophilem Lysin	3Merkaptopropionyl-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala- <b>Lys-Lys</b> x TFA	943,4
4.	Modifizierung mit Cysteinamid statt 3Merkaptopropionyl als Ankergruppe und dem helixbrechenden Pro-Ser-Ser	Ser-Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala- <b>Cys-amid</b>	936,99
5.	Modifizierung wie 4. Und Bindung an Fettsäurederivat: wobei X für die Myristinsäure (C14) steht	<b>(X)-Lys-X-</b> Ser-Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala <b>Cys-amid</b>	1485,88

*Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Peptidsequenzen*

Die Sequenz Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala (Peptid Nr.1) wird in der Literatur als eine helixbildende Struktur beschrieben [Lea89]. In der Funktion als ‘abstandhaltende Schicht’ zu einer Lipidschicht bietet sich die Verwendung einer möglichst organisierten und damit stabilen Sekundärstruktur an. Deshalb ist diese Sequenz als Grundgerüst in

allen nachfolgenden Peptidsequenzen enthalten. Die Weiterentwicklung zum Peptid Nr.2 liegt in der Einführung einer helixbrechenden Aminosäure (Prolin) am karboxyterminalen Ende des Peptid Nr.1. Diese Aminosäure soll eine höhere Flexibilität des karboxyterminalen Endes des Moleküls und eine damit verbundene effektivere Kopplung an die Lipidmoleküle erreichen. Peptid Nr.3 enthält zwei zusätzliche Lysine, die die hydrophilen Eigenschaften der Peptidschicht verstärken.

Die Vermutung liegt nahe, daß die *in-situ* Kopplung für einen großen Teil der Defekte verantwortlich ist, die sich aus den optischen und elektrischen Messungen für die Peptid-Lipidschichten ergeben. Die Alternative besteht in der Verwendung eines Gesamtkonstrukts, bestehend aus Peptid - bzw. Lipidanteil: Peptid-Lipid-Molekül Nr.5. Dieses Molekül bindet ebenfalls mittels einer Thiolgruppe an die Goldoberfläche an, wobei sich die Peptid, bzw. Lipidmonoschicht auf der Goldoberfläche organisiert. Der möglicherweise sterisch ungünstige Vorgang des Koppelns der Lipide an eine bereits angeordnete Peptidschicht entfällt also.

## 2.5 Kopplung von Lipidmolekülen an Thiopeptidschichten

In folgenden Experimenten wird die Anbindung von Lipidmolekülen an die karboxyterminalen Enden der Peptidmoleküle näher untersucht. Die terminale COOH-Gruppe des auf der Oberfläche fixierten Peptids wird *in situ* aktiviert und mit der primären Aminogruppe des Lipids DMPE (Dimyristoylphosphatidylethanolamin) gekoppelt. Dadurch entsteht durch Selbstorganisation eine Lipidmonoschicht auf der Peptidschicht (s. Abb. 2.5.1:(a, b)).

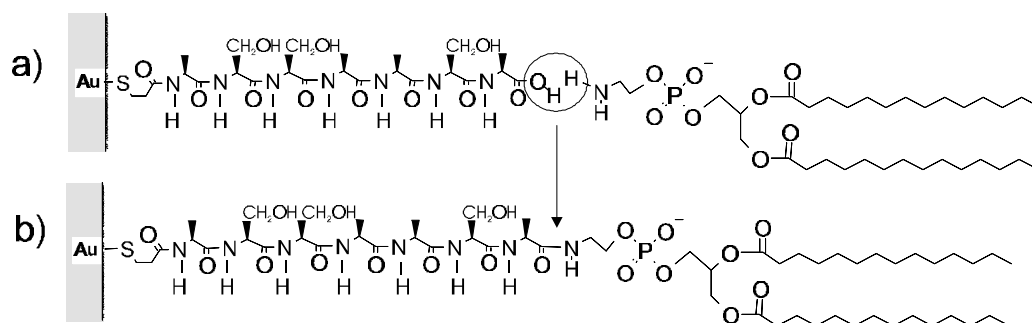


Abb. 2.5.1: Kopplungsvorgang des immobilisierten Thiopeptides an ein Lipid: a) Übergangszustand, der die Kondensation des karboxyterminalen Endes des Peptids an ein DMPE Molekül zeigt, b) Thiopeptid mit kovalent gebundenem Lipidmolekül.

Auf dieser Peptid/Lipidschicht wird durch Vesikelspreitung eine Lipiddoppelschicht erzeugt, die eine natürliche Membran in ihren Eigenschaften nachahmt. Ausgehend von der beschriebenen Präparation, [Nau95], wird die Kopplungsreaktion in folgenden Punkten optimiert:

- Verkürzung der Inkubationszeiten
- Verwendung eines geeigneteren Lösungsmittels für das Lipid
- Rühren während der Beschichtungs - bzw. Kopplungsprozesse

## 2.6 Kopplung der karboxiterminalen Gruppen der Thiopeptide mit Lipidmolekülen

An die oben beschriebenen Peptidsequenzen Nr.1-3 wird Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE) folgendermaßen angebunden:

Die gereinigten Glassubstrate werden für 12h in der Lösung der Peptide [0,6mg/ml] in Dimethylformamid, LiCl [8mg/ml] unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend wird im reinen Lösungsmittel überschüssiges Material entfernt, mit Ethanol gespült und die Substrate mit Stickstoff getrocknet. In einer Lösung aus Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE) [1mg/ml] in Chloroform/Methanol (4:1) werden die terminalen COOH - Gruppen des Peptids durch Zugabe von Diisopropylcarbodiimid (DIC) [20µl/ml] aktiviert. Mögliche Razemisierung wird durch Zugabe von 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT) [15mg/ml] verhindert. Nach 10min wird ein tertiäres Amin (N-Ethyl-diisopropylamin) zugegeben [10µl/ml] und für 12h unter ständigem Rühren inkubiert. Abschließend werden die Substrate mit Chloroform, Ethanol und MQ-Wasser gespült und in Stickstoff getrocknet. Der Kopplungsvorgang wird ein zweites Mal durchgeführt, um möglichst alle Peptide mit Lipidmolekülen zu verbinden.

Die präparierten Schichten sind über den Zeitraum von Tagen in ihren Eigenschaften unverändert.

## 2.7 Kopplung der aminoterminalen Gruppe der Thiopeptidmoleküle mit Lipiden

Die Peptidsequenz Nr.4 wird über ihr aminoterminalen Ende mit einem Lipidmolekül gekoppelt. Bei dem Lipidmolekül handelt es sich um ein Lysin-derivat, dessen COOH Gruppe aktiviert wird, um eine kovalente Bindung mit dem Aminoterminus des Peptides

einzu gehen. Das Peptid Nr.4 wird in einer Konzentration von 0,6mg/ml in MQ-Wasser gelöst und darin die Substrate für 12h inkubiert. Anschließend wird überschüssiges Material durch Spülen entfernt und im Stickstoffstrom getrocknet.

Das Lysinderivat wurde in einer Konzentration von 55mg/ml in Dimethylformamid / Dichlormethan (1:1) und LiCl [15mg/ml] vorgelegt. Durch Zugabe von HOBT [15mg/ml] und DIC [13µl/ml] wird die COOH - Gruppe aktiviert. In dieser Mischung werden die mit Peptid 4 beschichteten Substrate für 12h inkubiert. Nach Spülen der Substrate in Dimethylformamid und Ethanol wird der Vorgang der Kupplung wiederholt. Abschließend erfolgt die Spülung der Substrate in Ethanol und MQ-Wasser, anschließend werden sie im Stickstoffstrom getrocknet.

### 2.7.1 Nachweis der Kopplungsreaktion

Die FT-IR Spektren in Abb. 2.7.1 zeigen die Existenz der chemisorbierten Peptidmonoschicht auf der Goldoberfläche vor bzw. nach der Kopplungsreaktion mit DMPE. Das untere Spektrum stellt die Messung der Peptidschicht dar, das obere Spektrum beschreibt den Zustand nach der Kopplungsreaktion mit DMPE.

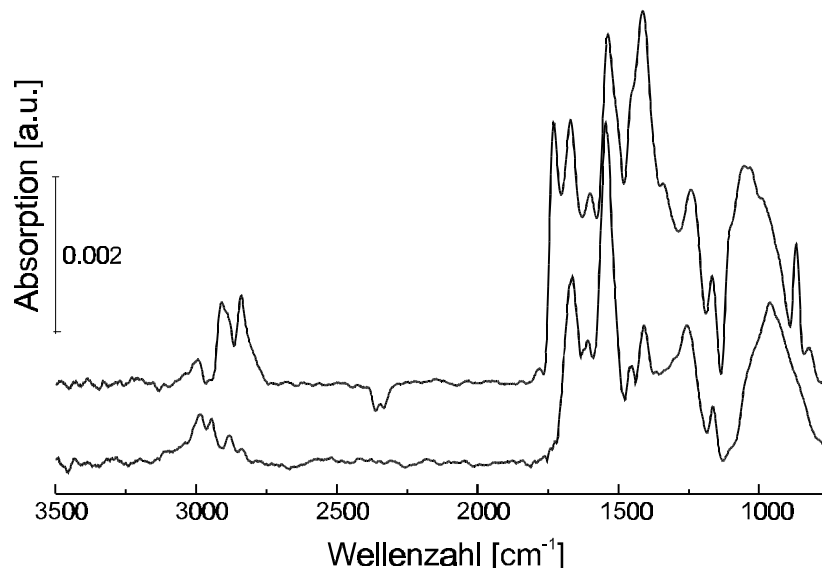


Abb. 2.7.1: FT-IR Spektren, aufgenommen in einem FT80 'set-up' bei einem Einfallswinkel von 80°. Das untere Spektrum zeigt die FT-IR-Absorption der Peptidmonoschicht auf einer Goldoberfläche, das obere Spektrum zeigt die Peptidmonoschicht nach der Kopplungsreaktion mit DMPE. Durchgeführt wurden die Messungen mit einem Nicolet 5DXC, ausgestattet mit einer 'Ever-Glo'-Lichtquelle und einem Stickstoff gekühlten HgCdTe Bandfilter





Minuten erreicht. Bei einer Temperatur von 20°C verläuft die Fusion erheblich langsamer.

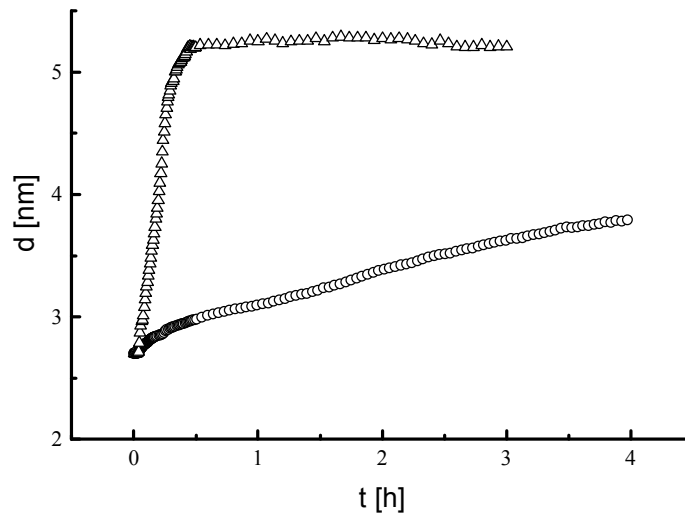


Abb. 2.8.2: Temperaturabhängigkeit der Vesikelfusion. In Abhängigkeit von der Zeit wird unter einem festen Winkel die Bildung der Schichten beobachtet. -Δ- wird bei einer Temperatur von 30°C gemessen, -O- bei einer Temperatur von 20°C. Die verwendeten Vesikel bestehen aus einem Lipidgemisch (Phosphatidylcholin, isoliert aus Ei (Lipoid Egg PC, 8mg/ml)

Aufgrund dieses Ergebnisses wird für die folgenden Untersuchungen eine Temperatur von 30°C gewählt, um eine möglichst schnelle und vollständige Fusion der Lipidvesikel mit der Thiopeptid-Lipidschicht zu erreichen.

### 2.8.2 Vergleich der resultierenden optischen Schichtdicken

Tabelle 2 zeigt die berechneten und gemessenen Längen der verschiedenen Konstrukte, basierend auf verschiedenen Peptidsequenzen.

Nr.	Peptid [nm]		Peptid-Lipid Monoschicht [nm]		Peptid-Lipid Doppelschicht	
	berechnet	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet [nm]	gemessen
1	1,5	1,2	3,7	2,6	6,2	5
2	1,9	1,4	4,1	2,0	6,6	3,2
3	1,8	1,4	4	1,8	6,5	3,8
4	1,7	1,5	--	--		--
5	(1,7)	--	4	3,7	6,5	4,2

Tabelle 2: Schichtdicken der verschiedenen Konstrukte, basierend auf verschiedenen Peptidsequenzen. Die fehlende Wert der Konstrukte Nr. 4 und 5 erklären sich folgendermaßen: Nr. 5 basiert auf der Aminosäuresequenz Nr.4, insofern gelten sinngemäß die entsprechenden Werte für das Peptid Nr.5.

Die gezeigten Werte ließen sich in zahlreichen Messungen reproduzieren. Aus der Tabelle 2 geht hervor, daß die gemessenen Schichtdicken der verschiedenen Peptide nahezu ihren berechneten Werten entsprechen. Entspricht die in der SPS gemessene Gesamtdicke einer Schicht ungefähr der Länge eines einzelnen Moleküls, so ist dieses ein Hinweis für eine sehr dichte Packung der Peptide auf der Oberfläche. Generell scheinen Thiopeptide geeignet, dicht gepackte Schichten auf Goldoberflächen zu bilden. Die entsprechenden Peptid - Lipidmonoschichten zeigen im Vergleich mit den berechneten Werten deutlich unvollständigere Schichten. Die gemessenen Schichtdicken entsprechen teilweise nur zur Hälfte den zu erwartenden Werten. Dieses Ergebnis kann auf eine unvollständige Kupplung der Peptide mit Lipidmolekülen zurückzuführen sein. Diese Vermutung bestätigt das Konstrukt Nr.5. Dieses Molekül, bestehend aus Peptid und Lipidanteil, bildet eine Schicht, die dem berechneten Wert sehr nahe kommt.

Die Vesikelfusion führt zu der Ergänzung der Lipidmonoschicht zu einer Doppelschicht. Der berechnete Wert von 5nm für eine Lipiddoppelschicht zuzüglich der jeweiligen Peptidschicht wird jedoch für keines der Konstrukte erreicht, was für die Bildung unvollständiger Schichten spricht. Eine detaillierte Aussage über die Belegung der Oberfläche mit einer Lipiddoppelschicht wird mit der Methode der Impedanzspektroskopie gewonnen.

## 2.9 Impedanzmessung und Ergebnisse der zyklischen

### Voltammetrie der peptidverankerten Lipiddoppelschicht

Für die elektrische Charakterisierung der Schicht werden Impedanzmessungen und die Methode der zyklischen Voltammetrie angewendet. Die Durchmesser der Halbkreise in den dargestellten Ortskurven entsprechen den elektrischen Widerständen der entsprechenden Schichten (s. Kap.7.3.3). Verglichen werden in der Abb. 2.9.1 exemplarisch die Peptid - Lipid Konstrukte der Peptide Nr.1 und Nr.5.

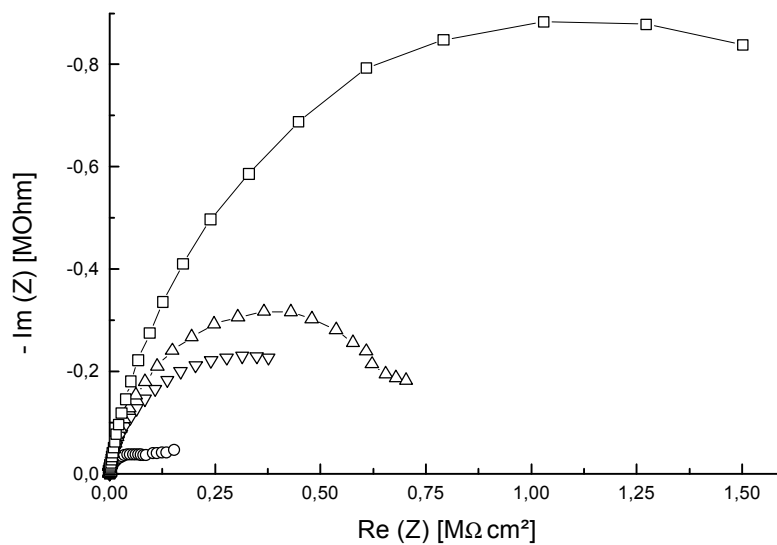


Abb. 2.9.1: Impedanzspektrum der Peptid - Lipid Monoschicht von Peptid Nr. 1. im Vergleich mit dem Konstrukt aus Peptid Nr. 5., bzw. Vergleich der anschließend durch Vesikelfusion erhaltenen elektrischen Eigenschaften der peptidunterstützten Lipiddoppelschicht.  $\Delta$ - Peptid - Lipid Nr.1,  $\square$ - Lipiddoppelschicht auf Peptid Nr.1,  $\circ$ - Peptid - Lipid Nr.5,  $\nabla$ - Lipiddoppelschicht auf Peptid Nr.5.

Zur Auswertung werden die experimentell gewonnenen Spektren mit berechneten Spektren von Ersatzschaltkreisen verglichen, die in Kap7.6, bzw. 6.5.2 dargestellt und diskutiert werden. Folgende Werte werden in einen Ersatzschaltkreis eingesetzt:

- Lipidschicht:  $0,5\mu\text{Fcm}^{-2}$
- Goldoberfläche (Kapazität der Helmholtzschicht):  $25\mu\text{Fcm}^{-2}$

Daraus ergibt sich eine Bedeckung der Goldoberfläche mit den Peptid - Lipidkonstrukten von ca. 70%, bzw. mit Defekten von ca. 30%. Dieses Ergebnis entspricht dem Anteil an Defekten, die durch die Röntgenreflektometrie gefunden werden [Bun97]. Die in Abb. 2.9.1 dargestellten Ortskurven ergeben für Peptid Nr.1 einen Widerstand von  $0,7\text{M}\Omega\text{cm}^2$ .

Werden Vesikel auf der Oberfläche gespreitet, erhöht sich durch die Bildung der Lipiddoppelschicht der Widerstand auf einen Wert von ca.  $2\text{M}\Omega\text{cm}^2$  (in der Abb. 2.9.1 dargestellt). Das Konstrukt Nr.5 zeigt einen niedrigeren Widerstand. ( $0,1\text{M}\Omega\text{cm}^2$  für die Peptid-Lipidschicht, bzw.  $0,6\text{M}\Omega\text{cm}^2$  für die Lipiddoppelschicht). Die Konstrukte basierend auf den Peptiden Nr.2-5 ergeben im Vergleich mit Peptid Nr.1 ebenfalls niedrigere Widerstände (nicht gezeigt). Die angegebenen Werte sind präparations-

abhängig, zeigen aber die Tendenzen der elektrischen Eigenschaften der Peptidsysteme, die sich aus zahlreichen Messungen ergeben.

In der Tabelle sind die Kapazitäten, bzw. Widerstände der Lipiddoppelschichten basierend auf den verschiedenen Peptidsequenzen aufgelistet. Zusätzlich sind die zugehörigen Ergebnisse der zyklischen Voltammetrie aufgeführt.

Peptid Nr.	C [ $\mu\text{Fcm}^{-2}$ ]	R [ $\text{M}\Omega\text{cm}^2$ ]	Peak Separation [mV]
1.	4-6	2	>350
2.	6	1-2	120
3.	6-8	0,8	200
4.	--	--	--
5.	4-7	0,6	350

Tabelle 3: Elektrische Eigenschaften der verschiedenen Konstrukte, basierend auf verschiedenen Peptidsequenzen

Zusammenfassend ergeben sich für die untersuchten Peptid-Lipidsysteme Widerstände, die im Mega-Ohm Bereich liegen. Dabei ist der Widerstand des Konstruktes, basierend auf der Sequenz Nr. 1 mit  $2 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$  am höchsten. Die Kapazitätswerte der Konstrukte unterscheiden sich untereinander nur unwesentlich.

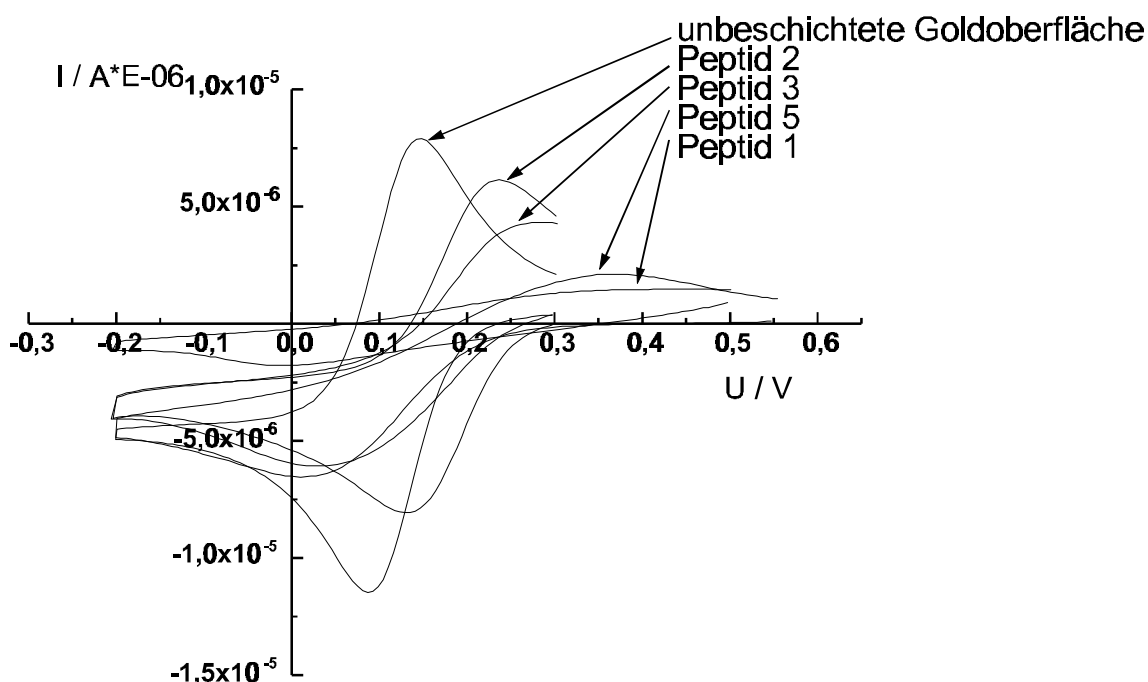


Abb. 2.9.2: Zyklische Voltammogramme der verschiedenen Peptid-Lipidkonstrukte im Vergleich zu einer unbeschichteten Goldoberfläche, Scangeschwindigkeit:  $0,1 \text{Vs}^{-1}$ . Die durchschnittliche Elektrodenfläche, bestimmt mit einer  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  Lösung ( $10^{-3} \text{ M}$ ) beträgt  $0,189 \text{cm}^2$ .

Der Vergleich mit dem theoretischen Wert von  $0,5 \mu\text{Fcm}^{-2}$  für eine Lipiddoppelschicht zeigt, daß die Schichten nur unvollständig die Oberfläche bedecken. Ebenso zeigen die Separationen der Maxima in den zyklischen Voltammogrammen (Abb. 2.9.2), daß die Goldoberfläche nur unvollständig bedeckt ist.

## 2.10 Diskussion

Die Schichten der verschiedenen Peptide, bzw. der Peptid-Lipid Mono- und Doppelschichten werden mit der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS), Kraftmikroskopie (AFM), Cyclovoltammetrie (CV) und Impedanzspektroskopie (IS) charakterisiert. Aus den Experimenten ergibt sich eine Anzahl von Ergebnissen, die im folgenden diskutiert werden.

Der Brechungsindex einer Thiopeptidschicht, präpariert aus Sequenz Nr.1, beträgt 1,41 und die zugehörige Schichtdicke 1,2nm. Diese Schichtdicke wird durch Ergebnisse der Röntgenreflektometrie [Bun97] und durch Berechnung der molekularen Dimension bestätigt [Nau97]. Die gemessenen Schichtdicken entsprechen nahezu ihren berechneten Dimensionen, was für eine hohe Belegungsdichte der Goldoberfläche mit Peptidmolekülen spricht.

In dieser Arbeit werden diese Werte mit der Methode der Plasmonenspektroskopie bestimmt, indem die Peptidschicht in verschiedenen dielektrischen Medien vermessen werden (Wasser/Puffer/Luft/Dimethylformamid).

Die resultierenden Lorentz-Fits der  $dn/dc$ -Wertepaare treffen sich jedoch nicht in einem Punkt, sondern grenzen eine Fläche ein. Den Mittelpunkt dieser Fläche beschreibt das oben genannte Wertepaar,  $n=1,41$  und  $d=1,2\text{nm}$ . In dem Lösungsmittel Dimethylformamid/LiCl [8mg/ml] schneidet die resultierende Kurve der  $dn/dc$  - Wertepaare an keinem Punkt die Kurven der übrigen verwendeten Dielektrika Wasser, Puffer und Luft. In DMF/LiCl ist das Peptid löslich, während es ansonsten nahezu unlöslich ist. Insofern scheint DMF/LiCl die Konformation des Peptids so stark zu verändern, daß die resultierenden Eigenschaften nicht mehr mit denen der ungelösten Substanz in wäßrigen Medien übereinstimmen.

Für die folgenden Experimente, die in wäßriger Umgebung durchgeführt werden, wird der Brechungsindex und die Schichtdicke, gemessen in dem Wasser/Puffer/Luft-System auf die übrigen Thiopeptidsequenzen übertragen.

Die verwendeten kurzen Aminosäuresequenzen besitzen in Lösung eine hohe Mobilität, die eine reproduzierbare Organisation an der Oberfläche ermöglicht. Langkettige Polymere hingegen interagieren miteinander auf einer Oberfläche und bilden so präparationsabhängig variierende Schichten. Im Gegensatz dazu organisieren sich die Peptidmoleküle (bei einer geeigneten Konzentration von 0,6mg/ml) in einer homogenen Schicht.

Die passivierenden Eigenschaften der Peptidschichten schützen die Oberfläche vor Kontaminationen. AFM Aufnahmen und Langzeitmessungen ergeben, daß die Peptidschichten die Goldoberfläche vor unspezifischer Belegung schützen. Durch die chemisch inerte Peptidschicht sind die Substrate an Luft lagerfähig.

Die chemische Kompatibilität der Aminosäureketten ermöglicht die Anbindung von Lipidketten. Qualitativ nachweisen läßt sich diese *in-situ* Kupplung mit FT-IR Messungen. Die resultierenden Schichten werden mit der Methode der Oberflächenplasmonenspektroskopie gemessen. Die SPS Messungen zeigen, daß die entstehenden Schichten den theoretisch berechneten Schichtdicken nicht entsprechen, was möglicherweise auf die unvollständige Kupplung der Peptide mit Lipidmolekülen zurückzuführen ist. Die Alternative zu der *in-situ* Kupplung liegt in der Verwendung eines Moleküls, bestehend aus Peptid und Lipidanteil (Nr.5). Dieses Molekül bildet durch Selbstorganisation eine Peptid-Lipidmonoschicht auf der Goldoberfläche. Aufgrund der schlechten elektrischen Eigenschaften der resultierenden Schicht, wird dieses Konstrukt jedoch nicht für weitere Experimente verwendet.

Die Lipidmonoschichten, basierend auf dem Peptid Nr.1, bilden eine ideale Oberfläche für eine anschließende Vesikelfusion, die die Monoschicht zu einer Lipiddoppelschicht ergänzt. Die so gebildeten Schichten weisen eine hohe Reproduzierbarkeit und Stabilität auf. Der Vorgang der Vesikelspreitung ist von den Eigenschaften des Substrates und der Temperatur abhängig. Wird die Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide nicht erreicht, erfolgt die Fusion der Vesikel mit der Oberfläche nur unvollständig, weil die nötige Fluidität der Lipidmoleküle nicht erreicht wird. Basierend auf diesem Ergebnis wird für alle Experimente eine Temperatur gewählt, die über der Phasenübergangstemperatur der jeweils verwendeten Lipide liegt.

Mit der Methode der Impedanzmessung können Aussagen über die elektrischen Eigenschaften der Schichtsysteme gemacht werden. Den verschiedenen Architekturen, aus denen die verschiedene Domänen der Membran bestehen, werden entsprechende

Komponenten eines Schaltkreises zugeordnet. Aus den Experimenten geht hervor, daß defekte Bereiche in allen hergestellten Peptid-Lipidsystemen vorhanden sind. Ergebnis der Impedanzmessungen ist, daß die Elektrodenoberfläche zu 70% mit der Peptid-Lipidschicht bedeckt und die restliche Fläche mit Defekten belegt ist. Dieses Ergebnis entspricht den Messungen der Röntgenreflektometrie [Bun97].

Die Kapazitäten und die Widerstände der untersuchten Schichten weichen von den theoretischen Werten für eine intakte Lipiddoppelschicht ab ( $R=20-100\text{M}\Omega\text{cm}^2$  [Kuk97],  $C=0,5\mu\text{Fcm}^{-2}$  [Lan94], [Lin97], [Cor97]). Die Defekte in den Schichten zeigen in ihrer Simulation, daß die Elemente der Schaltkreise parallel angeordnet sind, da die höchsten Kapazitäten in einer Parallelschaltung die Gesamtkapazität bestimmen und die gemessenen Werte deutlich über der Kapazität einer perfekten Lipiddoppelschicht liegen. Aus den Widerständen, bzw. den Kapazitäten der untersuchten Konstrukte ergeben sich für Peptid Nr.1 die günstigsten elektrischen Eigenschaften (Widerstand:  $2\text{M}\Omega\text{cm}^2$ , Kapazität:  $4-6\mu\text{Fcm}^{-2}$ ).

Die Vorteile der Verwendung von Thiopeptiden als ‘Abstandhaltermoleküle’ für eine Lipiddoppelschicht lassen sich abschließend in folgenden Punkten zusammenfassend aufzählen:

- Stabilität der gebildeten Schichten
- homogene Schichtbildung
- hohe Reproduzierbarkeit der präparierten Schichten
- Funktionalisierbarkeit mit Lipiden
- Passivierung der Oberfläche

Um Ionentransportvorgänge an Lipiddoppelschichten spezifisch nachzuweisen, müssen die elektrischen Eigenschaften des Modellsystems weiter verbessert werden.



### 3 Untersuchung von RGD-Thiopeptidschichten

Basierend auf den bereits gewonnenen Erkenntnissen, ergab sich die Möglichkeit, Thiopeptide an Oberflächen in einem anderen Kontext zu charakterisieren. Ihre bisherige Funktion bestand in einer Bildung einer hydrophilen Zwischenschicht zu einer Lipidschicht, in die verschiedene Membranproteine inkorporiert werden. Thema des folgenden Kapitels ist hingegen die Funktionalisierung von Oberflächen durch Thiopeptidschichten.

In Zusammenarbeit mit Dr. Jonczyk und Dr. Meyer, Merck KGaA, werden zwei biologisch aktive Peptidsequenzen untersucht. Beide Sequenzen enthalten die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD), bekannt für die Interaktion mit bestimmten Zelladhäsionsrezeptoren (Integrinen). Die Immobilisierung von RGD Peptiden an Oberflächen ist eine Strategie zur selektiven Anbindung von bestimmten Zellen.

#### 3.1 Theoretische Grundlagen

Integrine bilden eine Familie transmembraner Rezeptoren, die in den Prozeß der Zelladhäsion involviert sind. In dieser Familie befinden sich ebenso Rezeptoren von Fibronectin und anderen extrazellulären Matrixproteinen, wie Rezeptoren, die Zell-Zell Adhäsionsvorgänge steuern [Ebl97].

Die Integrine wurden zuerst 1986 von Tamkun et al. [Tam86] als transmembrane Glykoproteine beschrieben, die das intrazelluläre Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbinden. Spätere Untersuchungen ergaben, daß Integrine nicht nur als 'mechanische Anker' aufzufassen sind, sondern zusätzlich eine Rezeptorfunktion haben. Durch sie werden extrazelluläre Signale in das Innere der Zelle weitergeleitet. Die Reaktion einer Zelle, ausgelöst durch Aktivitäten ihrer Integrinrezeptoren, kann sowohl in einer Bindung an eine Oberfläche als auch in einer internen Stoffwechselantwort bestehen [Hyn92]. Integrine können durch den Wechsel zwischen ihrer aktiven bzw. inaktiven Konformation die Zelladhäsion kontrollieren, bzw. einen Signaltransfer in das Zellinnere vermitteln, wodurch z.B. die Expression von Genen reguliert werden kann [Dan95]. In umgekehrter Richtung, kann die Zelle die Bindungsaffinität ihrer Integrine zu den entsprechenden Liganden regulieren. Durch Bindung bzw. Ablösung von

Liganden an die Zelloberfläche ist die Zelle in der Lage, ihre direkte Umgebung zu verändern [Aki89].

Alle Integrine sind Heterodimere, ihre generelle Struktur, abgeleitet aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen [Alb94], [Car85], [Par85], [Kel87] zeigt Abb. 3.1.1.

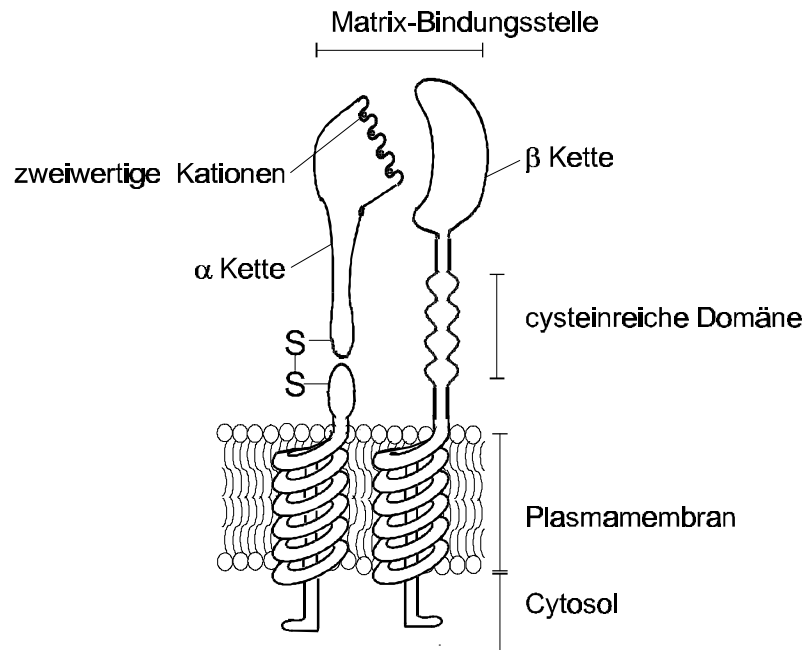


Abb. 3.1.1: Struktureigenschaften von Integrinen, abgeleitet aus elektronenmikroskopischen Abbildungen. Integrine sind aus zwei transmembranen Glykoproteineinheiten, genannt  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten zusammengesetzt, die die Zelle mit dem Zytoskelett verbinden.

Nach ihren  $\alpha/\beta$  Kombinationen, wird die Familie der Integrine in verschiedene Spezies eingeteilt [Hyn92]. Mittlerweile sind ungefähr siebzehn verschiedene  $\alpha$  - und acht  $\beta$  Ketten bekannt (s. Abb. 3.1.2). Durch 'alternative splicing' einiger Integrin RNAs wird noch ein zusätzliches Maß an Komplexität gewonnen [Hyn92], [Alb94].

An den N-terminalen Domänen dieser Ketten findet die Erkennung von Liganden statt. Die zwei cytoplasmatischen Domänen interagieren mit zytoskeletalen Proteinen [Tap89] und bieten möglicherweise den Ausgangspunkt für regulatorische Prozesse [Bur88], [Kat97]. Die Spezifität der Erkennung wird durch die Kombination von  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten (s. Abb. 3.1.2) und die Anwesenheit bestimmter zweiwertiger Kationen erreicht [Gai88], [Kir90,91], [Alb94].

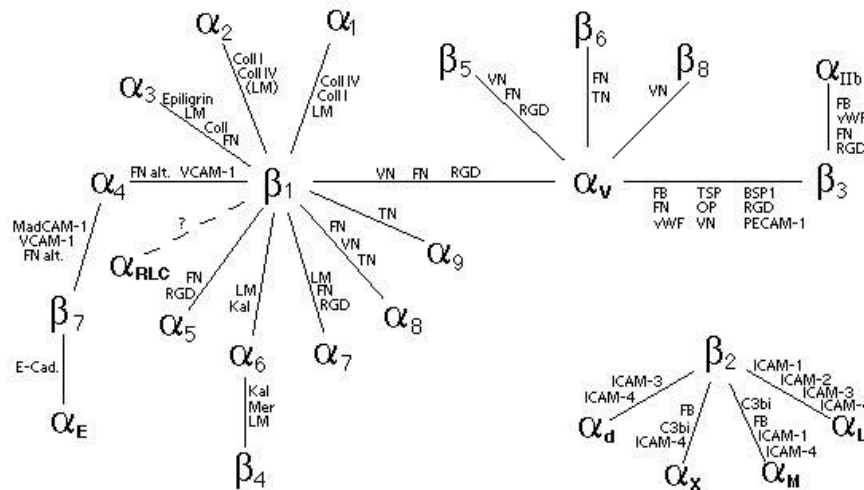


Abb. 3.1.2: Die Familie der Integrine: Dargestellt sind die bisher bekannten Kombinationen zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$  Untereinheit und die spezifisch gebundenen Matrixproteine. Verwendete Abkürzungen: FN: Fibronectin, FB: Fibrinogen, VN: Vitronectin, LM: Laminin1, Mer: Merosin (LM2), Kal: Kalinin (LMS), E-Cad: E-Cadherin, RGD: Arg-Gly-Asp Tripeptid, vWF: von Willebrand Factor, BSP1: Knochen Sialoprotein-1, TSP: Thrombospondin, OP: Osteopontin, MadCAM-1: Mucosal Addressin CAM1, TN: Tenascin

Eine Subfamilie der Integrine bindet spezifisch die Aminosäuresequenz Arginin-Glyzin-Aspartat (abgekürzt: RGD-Sequenz), die in verschiedenen Matrixproteinen enthalten ist. Die Tatsache, daß sich Integrine durch Antikörper bzw. bestimmte Peptidsequenzen beeinflussen lassen [Jos98], bietet einen therapeutischen Ansatz für ein großes Spektrum von Krankheiten, wie Thrombosen, Infektionskrankheiten und Krebs.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Integrin aus der Familie  $\alpha_v\beta_3$  untersucht, das sensitiv für die RGD Sequenz folgender Matrixproteine ist:

- Vitronectin [Bus92]
- Fibrinogen [Kat95]
- von Willebrand's Faktor [Che87]
- Thrombospondin [Ste90], [Tsa95]
- Osteopontin ('bone sialo protein -1') [Den93], [Sen94], [Hu95].

Die Motivation für die nachfolgenden Experimente ist die Oberflächenmodifikation von Implantaten mit einer RGD-haltigen Peptidsequenz. RGD - peptidbeschichtete Implantate werden durch die RGD-Integrin Wechselwirkung bevorzugt von Osteoblasten (knochenbildenden Zellen) umwachsen, was zu einer höheren mechanischen Belastbarkeit des Implantats führen soll.

Die Interaktion eines RGD Peptides, immobilisiert auf einer Goldoberfläche, mit dem  $\alpha_v\beta_3$  - Rezeptor wird charakterisiert. Abschließend wird in Anlehnung an die ursprüngliche Verwendung der Thiopeptide, die Inkorporation des  $\alpha_v\beta_3$  - Rezeptors in das peptidunterstützte Membransystem durchgeführt.

### 3.2 Verwendete RGD Peptidsequenzen

Im Rahmen dieser Arbeit werden Oligopeptide, die eine RGD Sequenz enthalten, in ihrer Interaktion mit dem  $\alpha_v\beta_3$  Rezeptor, bzw. mit einem Antikörper gegen die RGD-Sequenz untersucht. Die Synthese wird von Dr. Jonczyk, Fa.Merck KGaA, im Rahmen der präklinischen Anwendung dieser Peptide, durchgeführt. In nachfolgender Tabelle sind zwei verschiedene Sequenzen aufgelistet, die untersucht werden.

Zyklisches Peptid	EMD 73450	c(RGDfK-(3Mercaptopropionyl)
lineares Peptid	EMD 69856	CGGGRGDS-OH

*Tabelle 3.2.1: Verwendete RGD-Peptidsequenzen, 'c' bedeutet: über Amidbindung Kopf-Schwanz zyklisiert*

Die wasserlöslichen Peptide werden in Kontakt mit einer Goldoberfläche gebracht (um eine Au-S Bindung zu ermöglichen) und die resultierende Schicht mit der Methode der Plasmonenspektroskopie gemessen.

### 3.3 Konzentrationsabhängigkeit der Schichtbildung

Das zyklische Peptid wird in einer Konzentration von 4 $\mu$ g/ml mit einer Goldoberfläche in Kontakt gebracht. Die Affinität der Thiolgruppe des Peptids zu der Goldoberfläche führt zu einer organisierten Anordnung der Peptidmoleküle an der Oberfläche. Die im Zeitraum von Sekunden erreichte Schichtdicke beträgt 3nm.

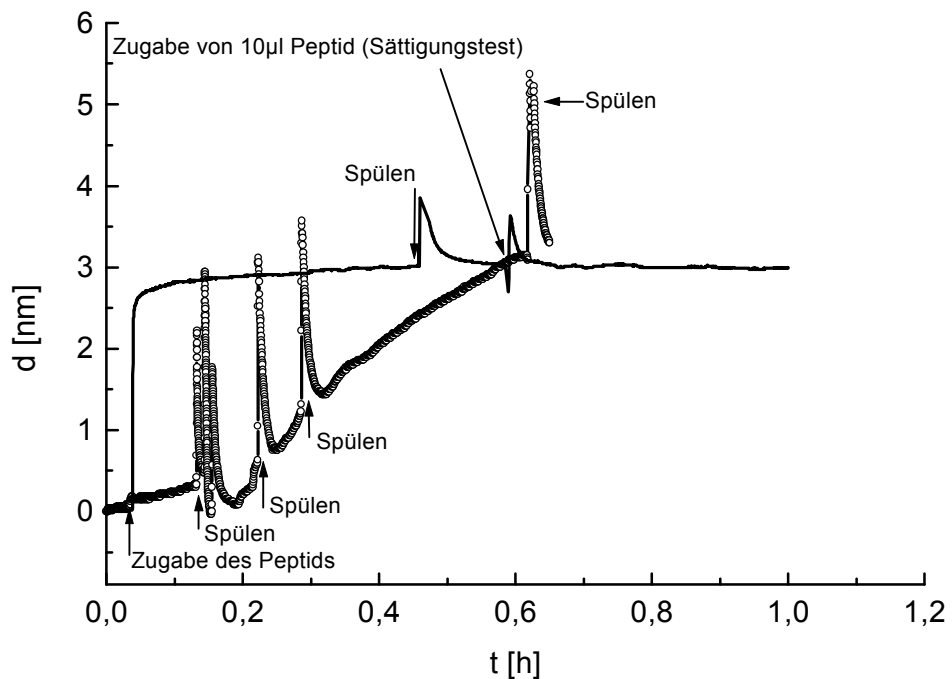


Abb. 3.3.1: Gezeigt wird die Kinetik der Anlagerung von Thiopeptidmolekülen (EMD73450) an eine Goldoberfläche. - - - zeigt die Kinetik der Schichtbildung, ausgehend von einer hohen Peptidkonzentration [ $4 \mu\text{g/ml}$ ], - ○ - die Kinetik einer niedrigen Konzentration [ $40 \text{ ng/ml}$ ].

Wird nach Erreichen der stationären Phase erneut Peptid zugegeben, (Sättigungstest) so verändert sich die Schichtdicke nicht. Daraus geht hervor, daß sich eine geschlossene monomolekulare Schicht auf der Oberfläche gebildet hat, an der keine unspezifische Adsorption weiterer Peptidmoleküle stattfindet.

Wird eine 100-fach geringere Konzentration von  $40 \text{ ng/ml}$  gewählt, verlangsamt sich der Prozeß der Schichtbildung. Durch wiederholtes Spülen wird die Konzentration noch weiter verringert. Aus der Kinetik wird jedoch ersichtlich, daß die Menge an Peptid in der wäßrigen Phase ausreicht, um die Oberfläche vollständig zu bedecken. Dieses Resultat zeigt die hohe Affinität der Moleküle an die Oberfläche, die zu einer irreversiblen Bindung führt

### 3.4 Vergleich zweier unterschiedlicher RGD-Peptide

Zwei RGD-Peptide unterschiedlicher Sequenz wurden hinsichtlich ihrer resultierenden Schichtdicken untersucht. Für beide Peptide wurde ein Brechungsindex von  $n = 1.4$  angenommen, in Anlehnung an die bereits beschriebene Bestimmung des Brechungsindex eines Thiopeptides (s. Kap.2.2.1).

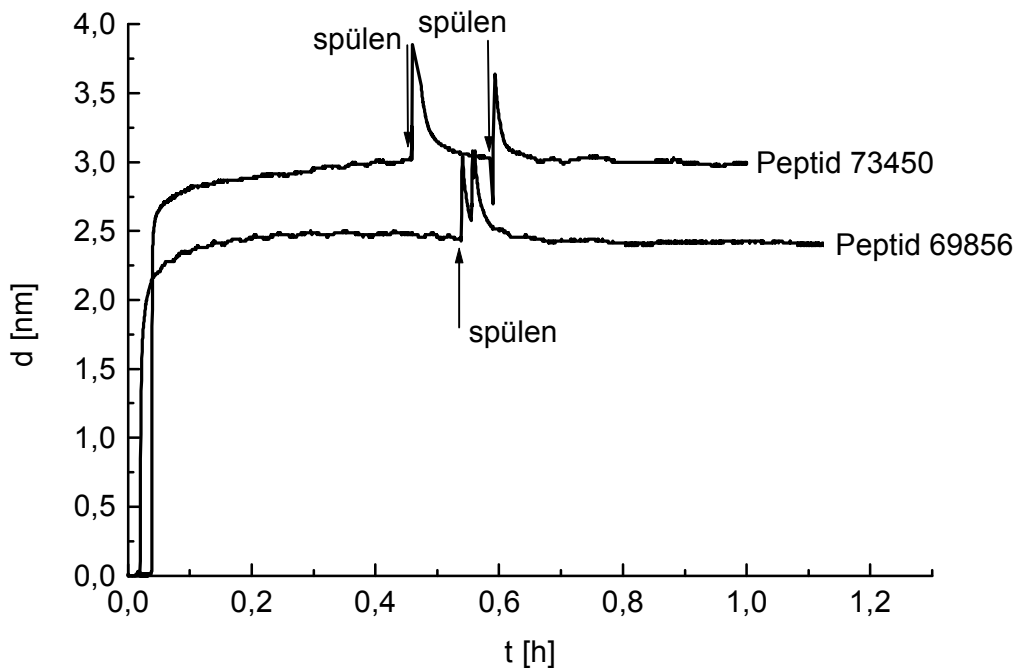


Abb. 3.4.1: Resultierende Schichtdicken unterschiedlicher RGD Peptide.

In Abb. 3.4.1 werden die entsprechenden Kinetiken gezeigt. Dabei ergibt sich für die zyklische Sequenz eine höhere Schichtdicke (3nm) im Vergleich zu der linearen Sequenz (2,5nm). Beide Peptide ergeben eine stabile Schicht, da durch Spülen kein Material von der Oberfläche entfernt wird. Das Erreichen einer stationären Phase deutet darauf hin, daß beide Peptide nicht unspezifisch an die Oberfläche adsorbieren, sondern eine organisierte monomolekulare Schicht bilden.

### 3.5 Antikörperbindungen an immobilisierte RGD-Peptidschichten

Dieses Experiment zeigt die sterische Zugänglichkeit der RGD-Sequenz in der immobilisierten Peptidschicht. Dazu wird ein monoklonaler Antikörper verwendet (Maus anti RGD), zur Verfügung gestellt von Dr. Diefenbach, Fa. Merck KGaA, der spezifisch für die Erkennung der RGD Sequenz ist.

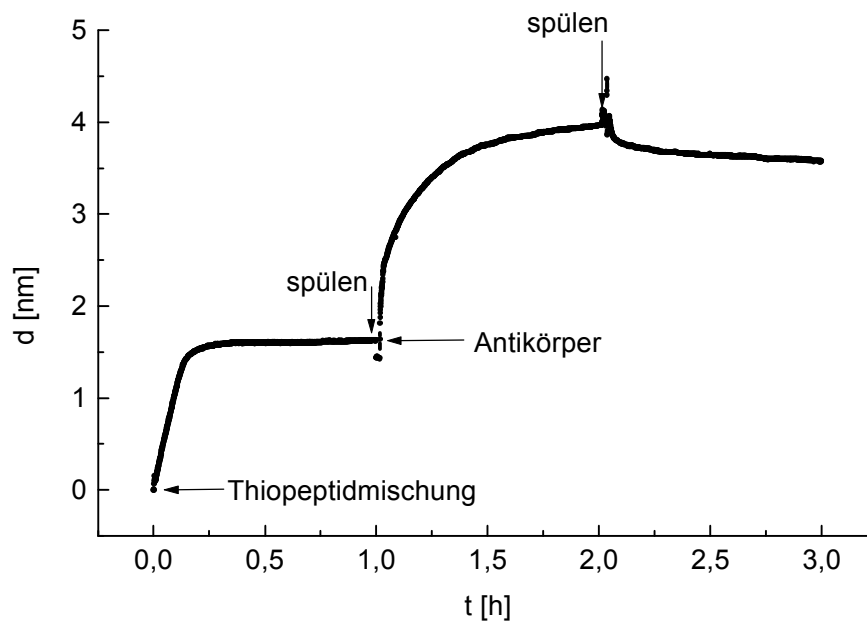


Abb. 3.5.1: Bindungskinetik einer binären Mischung von RGD-Peptid (EMD73450) und 3-Mercaptopropionyl-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala-Lys-Lys  $\times$  TFA an eine Goldoberfläche mit anschließender Antikörperbindung.

Bindet der Antikörper an die immobilisierten Peptidmoleküle, so besagt dieses Ereignis, daß die RGD-Sequenz sterisch zugänglich ist. Wird das RGD-Peptid auf der Goldoberfläche immobilisiert, so erfolgt keine Bindung des Antikörpers an das Peptid (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die RGD-Sequenz für die Bindungsdomäne des Antikörpers nicht zugänglich ist. Aus dieser Beobachtung resultiert das Experiment, dessen Ergebnis in Abb. 3.5.1 gezeigt wird: Durch Verdünnung des RGD-Peptides mit Peptiden anderer Sequenz soll die Konformation der Moleküle an der Oberfläche dahingehend verändert werden, daß die RGD Sequenz zugänglich wird. Um eine Phasenseparation der Moleküle an der Oberfläche zu vermeiden, sind als

‘Verdünner’ nur Moleküle geeignet, die ähnliche Eigenschaften in bezug auf die Mobilität bzw. Affinität zur Oberfläche haben. Als ‘Verdünner’ für das RGD-Peptid wurde eine binäre Mischung bestehend aus dem RGD-Peptid und einem Thiopeptid mit der Sequenz 3-Mercaptopropionyl-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala-Lys-Lys (Nr.4, s. Kap.2.4) hergestellt und in Kontakt mit der Goldoberfläche gebracht. Die anschließende Bindung des Antikörpers zeigt, daß die RGD Sequenz durch die ‘Verdünnung’ mit anderen Peptidmolekülen sterisch zugänglich geworden ist.

### 3.6 Bindung des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors an eine RGD-Peptid beschichtete Oberfläche

Die Wechselwirkung isolierter Integrinrezeptoren an eine RGD-Peptid beschichtete Oberfläche soll untersucht werden. Beide verwendeten RGD Peptidsequenzen werden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Integrinmoleküle zu binden. Die Adsorption von Integrinmolekülen an die unterschiedlichen Peptidsequenzen wird in einer SPS Kinetik gezeigt. Das Referenzexperiment wird ohne Peptidschicht durchgeführt, um die unspezifische Bindung an die Goldoberfläche zu messen.

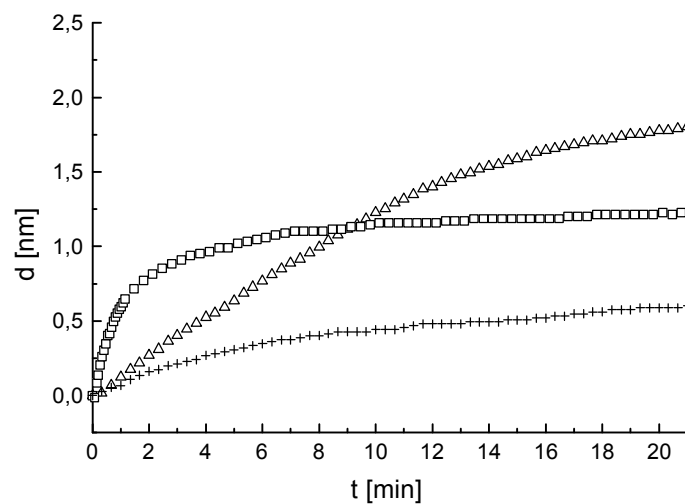


Abb. 3.6.1: Zeitabhängige Bindung des  $\alpha_v\beta_3$  Rezeptors an zwei RGD Peptide unterschiedlicher Konformation bzw. an die reine Goldoberfläche (Referenz), immobilisiert auf einer Goldoberfläche. Dabei entspricht  $\square$  dem zyklischen RGD Peptid EMD73450;  $+-$  dem linearen RGD Peptid EMD69856 und  $\Delta$  der Bindung des Rezeptors an eine unbeschichtete Goldoberfläche (Referenz-messung).



Die Abb. 3.6.1 zeigt, daß eine Bindung an die peptidbeschichteten Oberflächen erfolgt, die unspezifische Bindung an eine reine Goldoberfläche führt jedoch zu größeren Schichtdicken. Insofern bewirkt die Beschichtung einer Goldoberfläche mit RGD-Peptiden keine stärkere Bindung der Rezeptormoleküle.

### 3.7 Inkorporation des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors in eine peptidunterstützte Lipiddoppelschicht mit anschließender Vitronektinbindung

In diesem Experiment werden Lipidvesikel auf eine thiopeptidbeschichtete Goldoberfläche gespreitet. Sobald die optische Schichtdicke ungefähr 5nm erreicht, was der reproduzierten Schichtdicke der Vesikelfusion auf der Thiopeptidschicht entspricht, wird in Detergenz solubilisierter Rezeptor zugegeben.

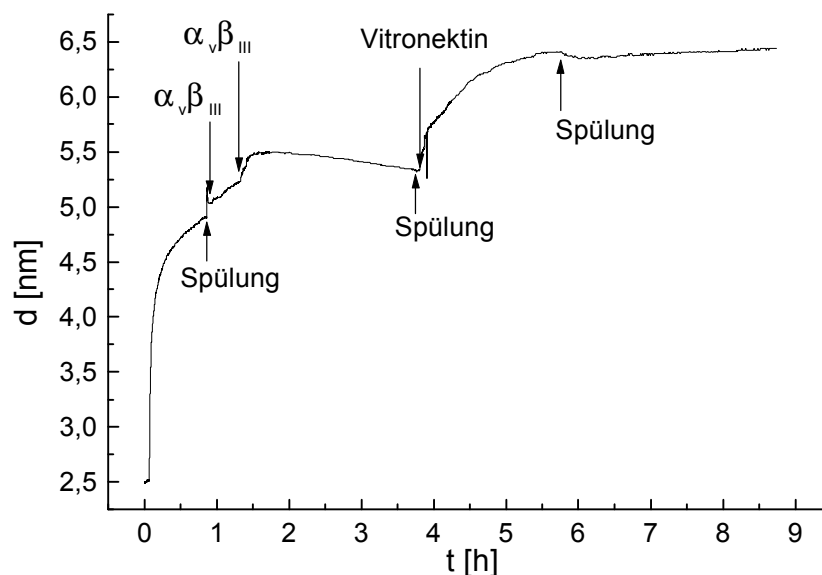


Abb. 3.7.1: Rekonstitution des  $\alpha_v\beta_3$  Rezeptors in eine peptidunterstützte Modellmembran mit anschließender Vitronektin - Bindung. Die Ausgangs-schichtdicke entspricht dem Thiopeptid/Lipidmonolayer. EggPC-Vesikel werden zugegeben und die Bildung der Lipiddoppelschicht beobachtet. Nach Abspülen überschüssiger Vesikel wird die Rezeptorpräparation zugegeben. Dieser Vorgang wird wiederholt. Vitronektin als Ligand wird zugegeben und seine Bindung an den inkorporierten Rezeptor gemessen.

Der Einbau in die Lipidschicht zeigt sich durch eine weitere Schichtdickenzunahme. Die Inkubation der gebildeten Schicht in einem vitronektinhaltigen Puffer führt zur schwachen Anbindung dieser Matrixproteine an die Schicht. Ist kein Rezeptor in der Lipidschicht enthalten, so erfolgt keine Adsorption (nicht gezeigt). An dieser Stelle fehlt

jedoch das Referenzexperiment, in dem überprüft wird, ob eine Zugabe des reinen Detergenz ohne Rezeptor zu einer Schichtdickenzunahme führt. Verglichen mit den geometrischen Schichtdicken sowohl des Rezeptors als auch des Vitronektins, sind die erhaltenen Dicken relativ gering und lassen auf einen geringen Einbau bzw. schwache Adsorption schließen.

### 3.8 Diskussion

Die Fähigkeit der RGD-Peptide eine Schicht auf der Oberfläche zu bilden, ist die Voraussetzung für Bindungsexperimente des  $\alpha_v\beta_3$  - Rezeptors. Resultat dieser Experimente ist, daß die Moleküle mit einer sehr hohen Affinität an die Goldoberfläche binden. Dabei passivieren die in Kap 2.4 beschriebenen Thiopeptide die Oberfläche gegen unspezifische Bindung und bilden eine monomolekulare Schicht. Selbst bei einer hohen Verdünnung des Peptids bildet sich eine optische Schichtdicke, die einer dichten monomolekularen Ordnung der Moleküle entspricht. Dieser Effekt basiert auf der starken Schwefel-Gold-Wechselwirkung und der hohen Mobilität der Moleküle in der Lösung. Vergleicht man eine zyklische Aminosäuresequenz mit einer linearen so ergibt sich für die zyklische Sequenz eine höhere optische Schichtdicke. Dieses läßt sich mit einer höheren Packungsdichte, bzw. einem höheren Brechungsindex erklären.

Die Antikörperbindung an die immobilisierten Peptide beschreibt die Zugänglichkeit der RGD Sequenz für Bindungsvorgänge. Dabei läßt sich beobachten, daß die hohe Packungsdichte der Peptide eine Bindung des Antikörpers verhindert. Durch Verdünnungsexperimente mit einem Thiopeptid anderer Aminosäuresequenz wird die Bindung des Antikörpers möglich. Dieser Bindungsvorgang ist ein Beweis für die Belegung der Goldoberfläche mit Peptidmolekülen, deren RGD-Sequenz zugänglich ist.

Der nächste Schritt besteht in einem Bindungsassay des  $\alpha_v\beta_3$  - Rezeptors an die immobilisierte RGD-Peptidschicht. Die unspezifische Bindung des Rezeptors zu der reinen Goldoberfläche überwiegt, verglichen mit der spezifischen Bindung zu den RGD-Peptiden. In dem Kontext der Oberflächenmodifikation von Implantaten bietet die Beschichtung mit RGD Peptiden zumindest in dieser Versuchsanordnung keinen Vorteil. Insofern wird diese Fragestellung nicht weiter verfolgt, sondern an die ursprüngliche Fragestellung angeknüpft. Der  $\alpha_v\beta_3$  - Rezeptor dient als Beispiel für ein Membranprotein, das in eine peptidunterstützte Lipiddoppelschicht inkorporiert wird. Die

Funktionalität des Rezeptors wird durch die Bindung eines Liganden nachgewiesen. Der spontane Einbau in die peptidunterstützte Lipiddoppelschicht wird durch Unterschreiten der kritischen Mizellkonzentration des solubilisierten Rezeptors erzielt. Die geringe Zunahme der optischen Schichtdicke deutet auf einen geringen Einbau des Rezeptors hin. Wird der Ligand Vitronektin zugegeben erfolgt wiederum nur eine geringe Zunahme der optischen Schichtdicke. Da die Integrine generell die jeweiligen Liganden mit schwacher Affinität binden [Str95], wird für eine effiziente Bindung eine hohe Zahl inkorporierter Rezeptoren benötigt. Aufgrund des geringen Einbaus des Rezeptors findet nur eine schwache Bindung des Liganden statt.

Verglichen mit der Adsorption an eine rezeptorfreie Lipiddoppelschicht ist der Effekt deutlich und gibt einen Hinweis auf die funktionale Inkorporation des  $\alpha_v\beta_3$  Rezeptors in die thiopeptidunterstützte Lipidschicht.

## 4 Inkorporation der H<sup>+</sup>ATPase (CF<sub>0</sub> CF<sub>1</sub>), isoliert aus Thylakoidmembranen der Spinatchloroplasten

### 4.1 Theoretische Grundlagen

Alle Zellen besitzen in ihren Membranen spezifische Transportsysteme, mit denen sie Nahrungsstoffe aufnehmen und Abbauprodukte abgeben, Ionengradienten erzeugen und diese zur Energiegewinnung und Signalübertragung nutzen. Dieser selektive Transport ist eine Leistung integraler Membranproteine. Man unterscheidet zwischen passivem und aktivem Transport. Der passive Transport, auch als erleichterte Diffusion bezeichnet, folgt einem Konzentrationsgradienten oder einer Potentialdifferenz. Erfolgt ein Transport jedoch gegen einen Gradienten, muß Energie aufgewendet werden, so zum Beispiel durch die Bereitstellung chemischer Energie aus der Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat). Umgekehrt kann der Gradient der elektrochemischen Potentiale genutzt werden, um ATP zu erzeugen. Dieser Vorgang wird von Enzymen katalysiert, die als ATPasen bezeichnet werden.

Man unterscheidet drei Gruppen von ATPasen, bei denen der Transport von Ionen gegen eine Differenz der elektrochemischen Potentiale an die Spaltung bzw. Synthese von ATP gekoppelt ist:

1. Zu den P-ATPasen gehören Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen und Ca<sup>2+</sup>-ATPasen.
2. V-ATPasen generieren einen niedrigen pH Wert z.B. in Lysosomen.
3. F-ATPasen bilden bzw. verbrauchen ATP, angetrieben durch die Differenz der elektrochemischen Potentiale der Membran (*proton-motive force*), die sich aus dem pH Gradienten und dem Membranpotential zusammensetzen.

Zu den F-ATPasen gehört die H<sup>+</sup>ATPase/Synthase [Del83], die im Rahmen dieser Arbeit in eine thiopeptidunterstützte Lipidschicht inkorporiert wird. Dieses Enzym befindet sich in den photosynthetischen und respiratorischen Membranen von Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten. Die ATPase/Synthase nutzt die protonenmotorische Kraft als Antrieb für die Synthese von ATP aus ADP und P<sub>i</sub> [Mit66]. Das membranständige Holoenzym arbeitet im Prinzip reversibel, es nutzt eine elektrochemische Potentialdifferenz zur Synthese von ATP oder kann umgekehrt eine solche Differenz unter Hydrolyse von ATP erzeugen. In Chloroplasten erfordert die

Synthese eines Moleküls ATP den Transport von vier Protonen über die Membran [Wal96].

Die Struktur der H<sup>+</sup> transportierende ATPase/Synthase wird vereinfacht in (Abb. 4.1.1) dargestellt. Im Wesentlichen wird das Enzym in zwei Bereiche unterteilt, den membranständigen Teil, F<sub>0</sub> und den peripheren Bereich, F<sub>1</sub>, [Sch82], [Str84], [Sch86], [Lil86], [Eng86] [Abr94]. In dem membranständigen Bereich der ATPase/Synthase findet der Protonentransport über die Membran statt, kombiniert mit der ATP Synthese bzw. Hydrolyse am entsprechenden F<sub>1</sub>-Teil des Enzyms. Die beiden großen Untereinheiten des F<sub>1</sub> Teils,  $\alpha$  und  $\beta$  sind als Hexagon ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> angeordnet, in dessen Mitte sich eine verdrehte ‘Welle’ aus zwei  $\alpha$ -helikalen Segmenten der Untereinheit  $\gamma$  befindet.

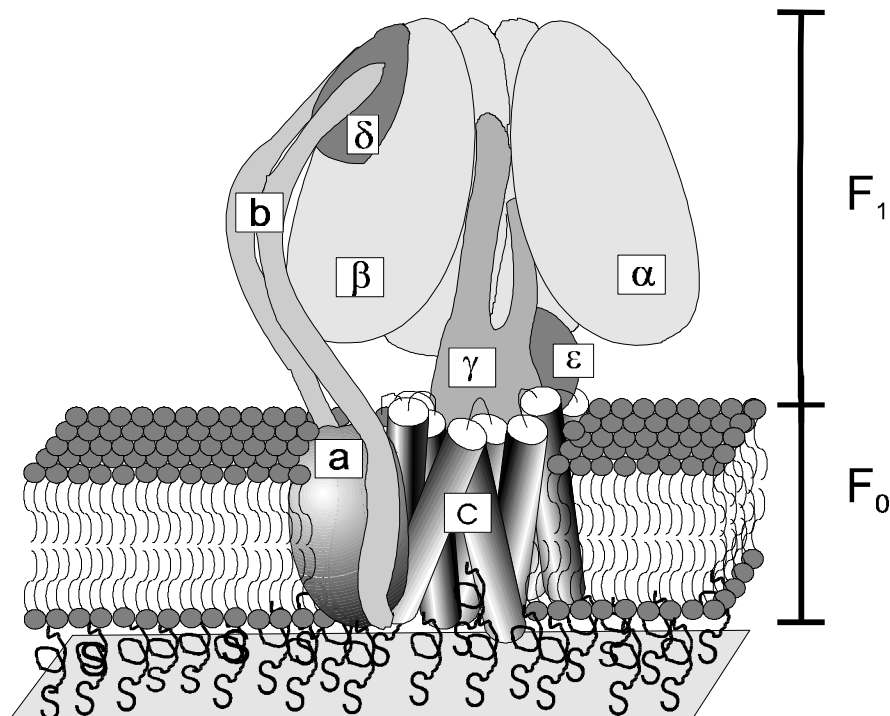


Abb. 4.1.1: Vereinfachte Struktur der CF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase, inkorporiert in eine thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht. Gezeigt wird ein Querschnitt der zweiteiligen Struktur des mit ATP wechselwirkenden Kopfteils, F<sub>1</sub>, und dem ionenleitenden Membranteil, F<sub>0</sub> [Jun97]. Die Rotation von  $\gamma$  relativ zu ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> während der Hydrolyse von ATP wurde verschiedentlich nachgewiesen. [Dun95], [Sab96], [Noj97]. Die zusätzliche Verbindung zwischen F<sub>1</sub> und F<sub>0</sub> Teil wird von W. Junge [Jun97] proklamiert, um das Drehmoment des Rotors ( $c\gamma\epsilon$ ) auf den Stator  $ab_2\delta(\alpha\beta)_3$  zu übertragen.

ATPasen haben einen großen Einfluß auf die elektrochemischen Parameter einer Membran, insofern wird ihre Funktionsweise intensiv untersucht. Die H<sup>+</sup>ATPase/Synthase, isoliert aus den Thylakoidmembranen von Blattspinat (*Spinacia*

*oleracea L.*), wird im Rahmen dieser Arbeit in der thiopeptidunterstützten Lipiddoppelschicht rekonstituiert und hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht.

## 4.2 Abhängigkeit der Schichtdicke vom Proteingehalt der Vesikel

Der Einbau der  $CF_1CF_0$ -ATPase in die Lipiddoppelschicht wird mit der Methode der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS) gezeigt. Dabei wird - in Abhängigkeit von der Zeit - der sukzessive Schichtaufbau betrachtet. Die Peptid/Lipid-Monoschicht wird, wie bereits beschrieben, auf einer Goldoberfläche präpariert und seine optische Dicke gemessen. Anschließend werden Vesikel mit der rekonstituierten ATPase auf der vorbereiteten Peptidschicht gespreitet.

Um die Konzentration der ATPasen in der planaren Lipidschicht zu kontrollieren bietet sich die Möglichkeit, die Proteinkonzentration der Vesikel zu variieren. Die verwendeten Präparationen enthalten durchschnittlich 1, 10 bzw. 20 ATPasen pro Vesikel. Gespreitet werden die Vesikel auf der Peptid-Lipidschicht, aus Peptid Nr.1 (Kap.2.4). Das Resultat ist in Abb. 4.2.1 gezeigt.

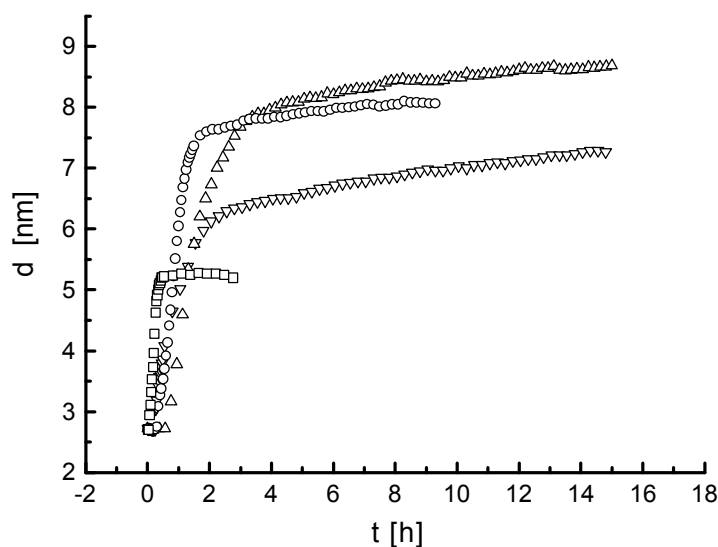


Abb. 4.2.1.: Dargestellt sind die Kinetiken der verschiedenen Vesikelpräparationen, die kein Enzym -□-, bzw. durchschnittlich -▽- 20 Enzyme pro Vesikel, -Δ- 10 Enzyme pro Vesikel, -○- 1 Enzym pro Vesikel enthalten. Die Ausgangs-schichtdicke entspricht dem Thiopeptid/Lipidmonolayer.

In Abhängigkeit vom Proteingehalt der Vesikel resultieren die Kinetiken des Spreitvorganges in verschiedenen optischen Schichtdicken. Vesikel mit 1 bzw. 10 ATPasen führen zu etwa der gleichen optischen Schichtdicke von 8nm während 20 ATPasen pro Vesikel nur 7nm ergeben. Der Einbau der  $CF_1F_0$ -ATPase in einen planaren Lipidfilm ist insofern nur geringfügig von dem Protein-Lipidverhältnis der eingesetzten Vesikel abhängig. Ein Verhältnis von 10 Enzymen pro Vesikel ergibt die optimalen Einbaubedingungen mit einer resultierenden Schichtdicke von 8nm. Ein Enzym pro Vesikel erreicht eine Schichtdicke von 8nm, liegt also ebenfalls über dem Wert, der mit der hohen Enzymkonzentration erreicht wird. Verglichen mit der resultierenden Lipidschicht ohne Protein, wird in allen Fällen eine Zunahme der Schichtdicke erreicht. Daraus kann man schließen, daß die Rekonstitution der ATPasen in die thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht stattgefunden hat. Die Einzelwerte der Schichtdicken stellen jeweils einen Mittelwert dar, der sich aus den Abmessungen der Lipiddoppelschicht und den daraus herausragenden Enzymen zusammensetzt. Aufgrund der Form des Enzyms ist davon auszugehen, daß der Einbau der Enzyme gerichtet (Abb. 4.2.2) erfolgt, so daß die  $F_1$ - Bereiche von der Goldoberfläche abgewandt sind.

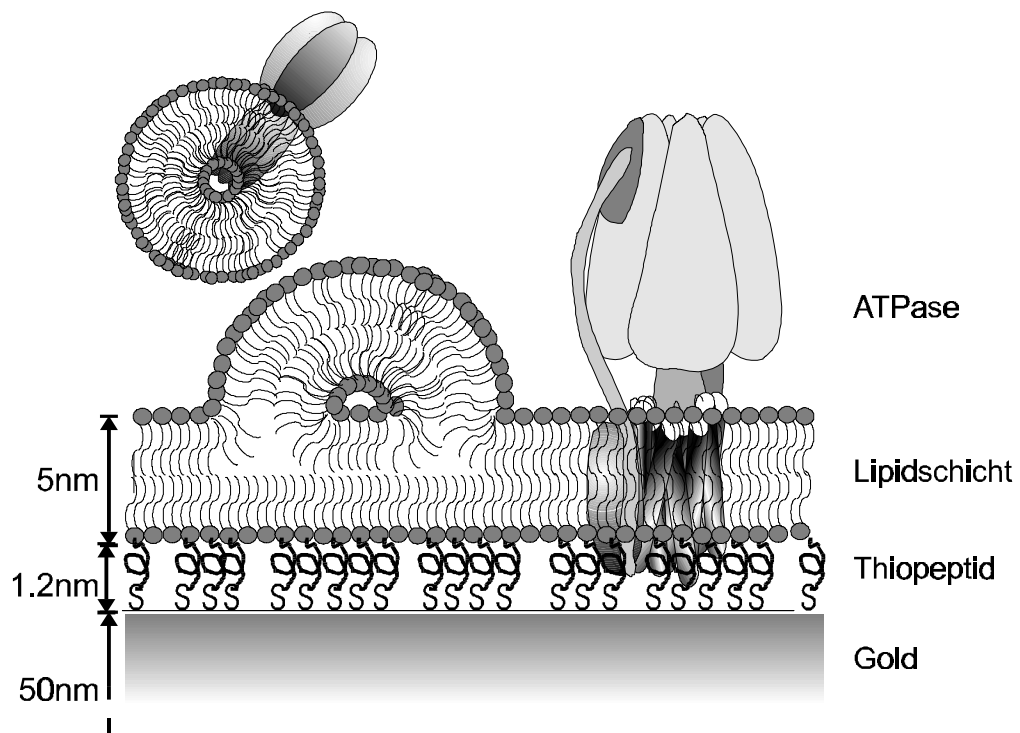


Abb. 4.2.2: Modell der Fusion  $H^+$ ATPase-haltiger Vesikel mit einer thiopeptid-unterstützten Lipidschicht.

Die in der SPS Messung erhaltenen optischen Schichtdicken der betrachteten Fläche ergeben ein gemittelttes Niveau der aus Lipid und Proteinanteil zusammengesetzten Schicht. Der dabei zugrundeliegende Brechungsindex wird mit  $n = 1,5$  angenommen (s. Kap.2.2.1).

Schicht	Schichtdicke, gemessen in nm, Brechungsindex n: Peptidschicht: 1,414, Lipid/Proteinschicht: 1,5
Thiopeptid - Lipid Doppelschicht nach Fusion mit Vesikeln, die durchschnittlich eine CF <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase enthalten	8
Thiopeptid - Lipid Doppelschicht nach Fusion mit Vesikeln, die durchschnittlich zehn CF <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasen enthalten	8
Thiopeptid - Lipid Doppelschicht nach Fusion mit Vesikeln, die durchschnittlich zwanzig CF <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPasen enthalten	7

*Tabelle 4.2.: Einfluß verschiedener ATPase-Konzentrationen pro Vesikel auf die Inkorporationskinetik*

### 4.3 Untersuchung des nachträglichen Einbaus von Cholesterin - bzw. Proteinmolekülen in eine thiopeptidunterstützte Lipidschicht

Folgendes Experiment untersucht die Möglichkeit des nachträglichen Einbaus von Cholesterin-, bzw. Proteinmolekülen in eine planare thiopeptidunterstützte Lipidschicht. Mit der Oberflächenplasmonenspektroskopie wird in einer Kinetikmessung der Austausch von Cholesterin - bzw. Proteinmolekülen aus Vesikel in eine vorgefertigte planare Lipiddoppelschicht gemessen.

Zunächst wird in Abhängigkeit von der Zeit die Bildung einer Lipiddoppelschicht auf einer Peptid/Lipid-Monoschicht durch Zugabe von Lipidvesikeln beobachtet. Nach Erreichen der stationären Phase, in der die Schicht die Ausmaße von 5nm erreicht, werden cholesterinhaltige Vesikel zugegeben (Pfeil 1. in Abb. 4.3.1).



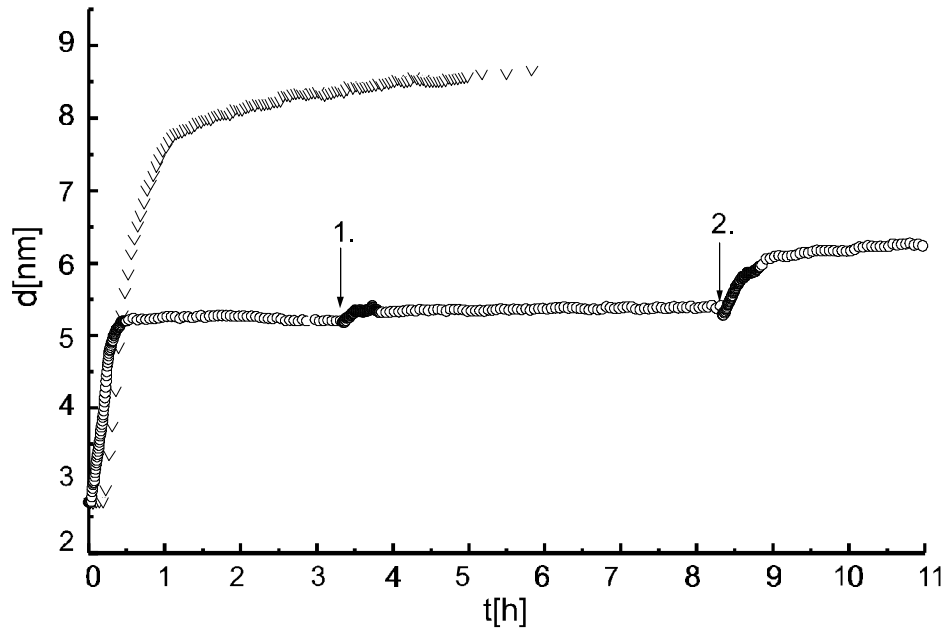


Abb. 4.3.1: Gezeigt wird der Aufbau einer Lipiddoppelschicht auf Peptid/Lipid Monoschichten. -V- enthält durchschnittlich 10ATPasen pro Vesikel, -O- enthält zunächst kein Enzym, Punkt 1. bezeichnet den Zeitpunkt, an dem cholesterinhaltige Vesikel zugegeben wurden, Punkt 2. den Zeitpunkt, an dem ATPase-haltige Vesikel zugegeben werden. Die Ausgangsschichtdicke entspricht dem Thiopeptid/Lipidmonolayer mit einer optischen Dicke von 2,5nm.

Verursacht durch den Austausch mit cholesterinhaltigen Vesikeln steigt die optische Dicke der planaren Schicht an. Die geringe Veränderung der optischen Schichtdicke läßt keine Aussage über einen tatsächlichen Einbau von Cholesterinmolekülen zu. Werden ATPase- haltige Vesikel zugegeben, so findet eine deutliche Schichtdickenzunahme statt. Sie ist jedoch geringer (Abb. 4.3.1), verglichen mit der direkten Spreitung von enzymhaltigen Vesikeln auf die Peptid/Lipidschicht.

Der Einbau von Cholesterinmolekülen bzw. ATPasen in die planare Lipiddoppelschicht ist irreversibel, nach Spülen mit Pufferlösung bleibt die optische Dicke konstant, was auf die Stabilität der gebildeten Schicht hindeutet.

#### 4.4 Funktionsnachweis der eingebauten H<sup>+</sup>-ATPase

ATPase-haltige Vesikel bilden auf einer Peptid-Lipidmonoschicht spontan eine Lipiddoppelschicht aus, die das rekonstituierte Protein enthält. Die H<sup>+</sup>ATPase katalysiert in ihrer natürlichen Umgebung den Protonentransport über die Membran.

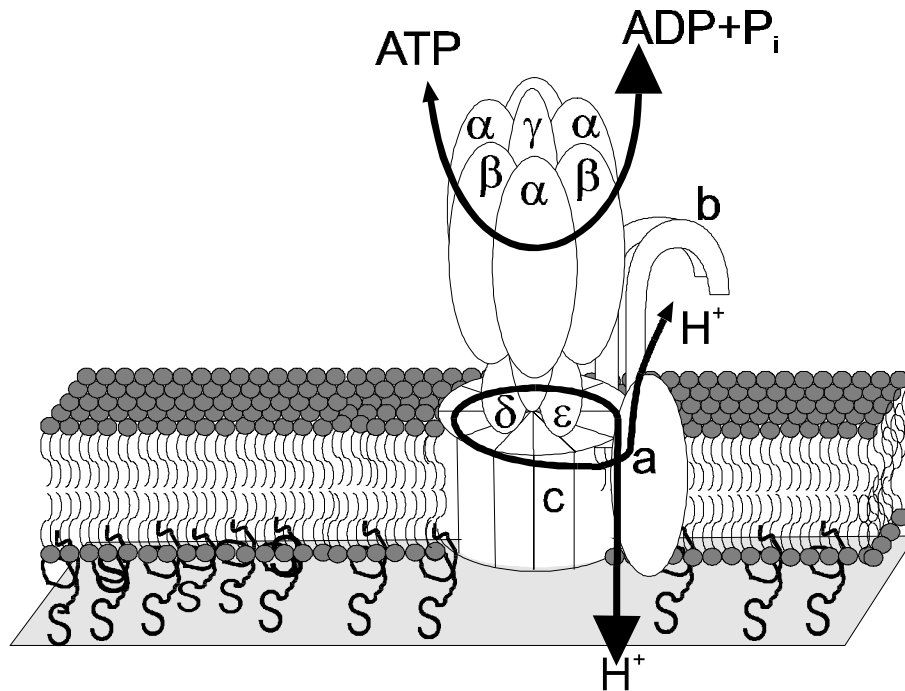


Abb. 4.4.1: Schematische Darstellung der  $CF_1F_0$ -ATPase, inkorporiert in eine Lipiddoppelschicht, in der Orientierung, die sterisch am wahrscheinlichsten ist (nicht nachgewiesen). Eingezeichnet sind der Ort der Katalyse und des Protonentransports. Die Dicke der Pfeilspitzen entspricht der Richtung des Protonentransports, bzw. der ATP Hydrolyse/Synthese bei hoher ATP Konzentration am  $F_1$  Teil.

Bei einem hohen ATP/ADP+P<sub>i</sub> Verhältnis am F<sub>1</sub>-Teil des Enzyms werden die Protonen ins Thylakoidlumen transportiert. Rekonstituiert in das artifizielle System, werden die Protonen in Richtung der Goldoberfläche transportiert.

Dort können sie elektrochemisch durch die Entladung an der Goldelektrode nachgewiesen werden. Die Protonenentladung an der Goldoberfläche ist abhängig von der Aktivität des immobilisierten Enzyms. Mit der Methode der Rechteckwellenvoltammetrie (*'Square Wave Voltammetrie'*) wird der Enladungsstrom bei einem Potential von -0,7V gemessen. Dazu wird mit einer Amplitude von 25mV und einer Frequenz von 80Hz der Potentialbereich von 0,3 bis -0,8V durchlaufen. Die resultierenden Rechteckwellenvoltammogramme sind in der Abb. 4.4.2 dargestellt.

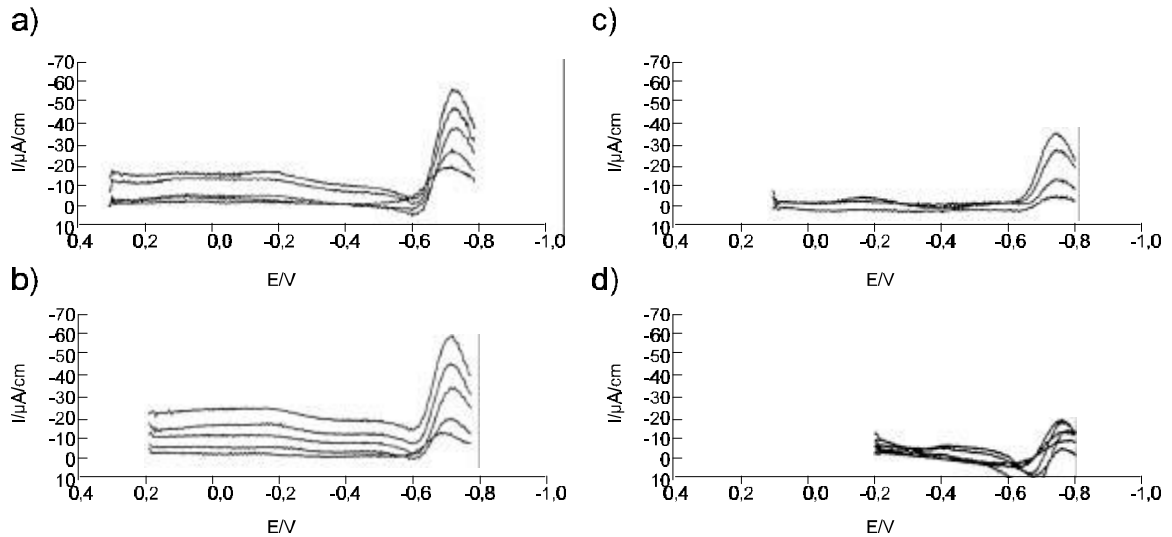


Abb. 4.4.2: Voltammogramme (80Hz), die Peakhöhe wächst mit steigenden ATP Konzentrationen (2,5;7;29 und 47mM,) gemessen bei verschiedenen Ausgangspotentialen a) 0,3, b) 0,2, c) 0,1, d) -0,2V

Beobachtet wird für alle Messungen ein Maximum bei -0,7V. Dies ist ein Hinweis auf die ansteigende Protonenkonzentration auf der Elektrodenoberfläche durch die Aktivität des Enzyms. Die Signalhöhe ist deutlich von der Substratkonzentration abhängig, was für eine Substratabhängigkeit des Enzyms spricht. Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von einem positiven Aktivierungspotential ist deutlich ersichtlich.

## 4.5 Diskussion

Erste Hinweise auf die Inkorporation der Proteine gibt die Plasmonenspektroskopie, die es ermöglicht, die Kinetiken der Vesikelspreitung in Abhängigkeit von der Zeit zu beobachten. Die dadurch erhaltenen optischen Schichtdicken entsprechen jedoch einer heterogenen Zusammensetzung aus der Dicke der Lipiddoppelschicht und den daraus hervorragenden ATPasen. Die resultierende 'Rauheit' ist mit der Methode der Plasmonenspektroskopie nicht auflösbar, sondern wird als mittlere optische Schichtdickenzunahme gemessen, wobei ein universeller Brechungsindex von  $n = 1,5$  für die Lipid/Proteinmischung auf der Oberfläche angenommen wird.

Fusionieren enzymhaltige bzw. enzymfreie Vesikel mit der thiopeptidunterstützten Lipidschicht, zeigt sich ein Unterschied in den resultierenden optischen Schichtdicken. Dabei erreichen die enzymfreien Vesikel eine optische Schichtdicke von 5nm, während

die enzymhaltigen Vesikel eine deutlich höhere Schichtdicke erreichen. Insofern ist dieser Unterschied ein Hinweis auf die Rekonstitution der Enzyme in das Schichtsystem.

Die Dimension der EF<sub>0</sub>EF<sub>1</sub> ATPase aus *Escherichia coli* ist aus elektronenmikroskopischen [Gol87], [Cap92] sowie röntgenkristallographischen Messungen [Abr94] bekannt. Die Länge des F<sub>1</sub>-Teils der ATPase wird mit 8nm, der 'Stiel' mit 4,5nm, der membranständige F<sub>0</sub> Teil mit 5nm beschrieben. Die Gesamtlänge der ATPase entspricht also 17nm. Diese Dimensionen werden auf die H<sup>+</sup>ATPase, isoliert aus der Spinatpflanze, übertragen.

Verglichen mit den erhaltenen optischen Schichtdicken kann man auf eine relativ dichte Belegung der Oberfläche mit ATPase - Molekülen schließen, berücksichtigt man die diskutierte Nivellierung der optischen Schichtdicken, die durch die Zusammensetzung der Schicht aus Bereichen reiner Lipide und Bereichen mit inkorporiertem Enzym entsteht.

Eine Fragestellung besteht in der Möglichkeit, durch die Verwendung verschiedener Proteinkonzentrationen in den eingesetzten Vesikeln, die Menge an Proteinen festzulegen, die sich nach dem Fusionsvorgang in der planaren Lipidschicht befinden soll. Resultat dieser Experimente ist jedoch, daß die resultierende ATPasekonzentration in der Lipidschicht nicht von der Konzentration in der eingesetzten Vesikeln abhängt.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine hohe Proteinkonzentration von 20 Enzymen pro Vesikel nicht die maximale Schichtdicke ergibt. Die Beobachtung, daß mit einer hohen Enzymkonzentration in den Vesikeln nicht die höchste Einbaurrate an der Oberfläche erzielt wird, ist möglicherweise auf sterische Behinderungen der Proteinmoleküle untereinander zurückzuführen. Die Proteinkonzentration von 1 bzw. 10 ATPasen pro Vesikel ergeben etwa die gleiche Schichtdicke von 8nm. Die ATPasekonzentration in der planaren Lipidmembran läßt sich also nicht über die Proteinkonzentration der eingesetzten Vesikel steuern. Es könnte sogar eine Anreicherung der Proteine in der planaren Lipidschicht angenommen werden.

Aus den Kinetiken geht ebenfalls hervor, daß die Fusion der Vesikel mit der thiopeptidlipidbeschichteten Oberfläche spontan abläuft. Daraus läßt sich schließen, daß es sich dabei um einen energetisch begünstigten Prozeß handelt. In Abhängigkeit von der Menge an inkorporiertem Protein verlangsamt sich die Geschwindigkeit der Vesikelspreitung. Dieser Effekt kann mit dem höheren Energieaufwand erklärt werden, der mit der Umorganisation der dichtgepackten Peptid/Lipidvesikel zu einer planaren Membran

verbunden ist. Die sterische Behinderung, die mit der Anzahl inkorporierter Proteine offensichtlich zunimmt, äußert sich in einer Kinetik mit geringerer Steigung.

Der Austausch von Molekülen zwischen einer vorgefertigten planaren Lipiddoppelschicht und freien Vesikeln wird ebenfalls untersucht. Der Austausch von Cholesterinmolekülen aus Vesikeln mit einer vorgefertigten planaren Lipiddoppelschicht führt zu einer Zunahme der optischen Schichtdicke. Die Veränderung der optischen Eigenschaften der Schicht deutet auf die Inkorporation der Cholesterinmoleküle hin, die Zunahme der optischen Schichtdicke ist jedoch sehr gering und ist kein eindeutiger Beweis für einen tatsächlichen Einbau von Cholesterinmolekülen. Fortgesetzt wird dieses Experiment durch die Zugabe ATPase-haltiger Vesikel. Ebenfalls ist ein Austausch mit der planaren Lipiddoppelschicht zu beobachten, wobei die resultierende Schichtdicke niedriger ist, verglichen mit dem direkten Spreiten von ATPase-haltigen Vesikeln auf der Lipidmonoschicht. Diese Beobachtung ist dadurch zu erklären, daß sich die bereits gebildete Lipiddoppelschicht umorganisieren muß, um die Proteine nachträglich zu inkorporieren. Die Einbaueffizienz ist niedriger, als es bei dem direkten Spreiten der Vesikel auf einer imperfekten Lipidschicht der Fall ist. Beide Experimente deuten darauf hin, daß die peptidunterstützte Lipidschicht eine Beweglichkeit aufweist, die den nachträglichen Einbau von Molekülen ermöglicht, auch wenn es sich um sterisch komplexe Moleküle wie die ATPase handelt.

Die Stabilität der resultierenden Schicht zeigt sich durch die Spülvorgänge, die offensichtlich keinen negativen Effekt auf die gebildete Schicht haben. Auch über einen Zeitraum von drei Tagen ist das Schichtsystem stabil und die inkorporierten Enzyme aktiv.

Für den Funktionsnachweis wird die Enzymaktivität mit einem elektrochemischen Prozeß korreliert. Die  $H^+$ ATPase katalysiert in ihrer natürlichen Umgebung den Protonentransport über die Membran. Rekonstituiert in die peptidunterstützte Lipidschicht, werden die Protonen bei einer hohen ATP Konzentration am  $F_1$  Teil des Enzyms in Richtung der Goldoberfläche transportiert. Aufgrund der Geometrie der ATPase ist es wahrscheinlich, daß der überwiegende Teil der Enzyme mit dem  $F_0$  Teil in Richtung der Goldoberfläche eingebaut ist. Die Methode der Rechteckwellenvoltammetrie mißt die resultierende Entladung der Protonen an der Elektrodenoberfläche. Der resultierende Entladungsstrom ist ein Maß für die Aktivität

des Enzyms. Dabei ist eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der ATP Konzentration erkennbar.

Untersucht wird außerdem die ATPase-Aktivität in Abhängigkeit vom Aktivierungspotential. Durch die Verwendung verschiedener Startpotentiale wird die Enzymaktivität beeinflusst [Nau97]. Dabei ist zu beobachten, daß mit negativerem Startpotential der Entladungsstrom kleiner wird (die Enzymaktivität sinkt). Umgekehrt hängt die Aktivität der ATPase von dem Anlegen eines positiven Aktivierungspotentials ab. Ein positives Aktivierungspotential schafft für die ATPase offenbar die Voraussetzung, um den Protonentransport zu katalysieren [Jun89]. Dieses Verhalten korreliert mit der Beobachtung, daß die ATPase der Thylakoidmembran, rekonstituiert in Vesikel, einer Aktivierung durch ein positives Potential bzw. durch einen pH-Sprung bedarf [Jun87].

Die inkorporierten Enzyme bilden - ihrer natürlichen Funktion entsprechend - in dem thiopeptidunterstützten Schichtsystem einen Protonengradienten über die Membran aus. Die Experimente zeigen, daß sich eine stabile Lipiddoppelschicht auf dem Peptidfilm organisiert hat. Die Zugabe von ATPase-haltigen Vesikeln bewirkt die Rekonstitution der Enzyme in die planare Lipidschicht. Optische und elektrochemische Methoden zeigen sowohl den Einbau des Membranproteins in die planare Lipiddoppelschicht als auch die Funktionalität des Enzyms.

## 5 Inkorporation des nikotinischen Acetylcholinrezeptors in eine thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht

### 5.1 Theoretische Grundlagen

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor ist ein postsynaptisches Membranprotein, das durch die Bindung von Acetylcholin die Funktion eines ligandengesteuerten Kationenkanals erfüllt. Die mit der Öffnung des Kanals verbundene Depolarisierung der Membran ist ein fundamentaler Mechanismus, um einen Nervenimpuls an Muskelzellen zu übertragen. (s. Review [Huc96]). Zu dem Verständnis der Funktionsweise dieses Rezeptors haben Methoden der klassischen Proteinbiochemie ebenso beigetragen, wie die Methoden der rekombinanten DNA - Technologie und die Verwendung monoklonaler Antikörper.

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor, isoliert aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens *Torpedo californica* wurde bereits erfolgreich in Vesikel [Sch96], [Neu96], [Kuk98] bzw. planare Lipiddoppelschichten [Boh81], [Era95] rekonstituiert. Wichtige Fragestellungen in diesem Zusammenhang, wie Agonisten bzw. Antagonistenwechselwirkungen machen die Rekonstitution in eine biomimetische Umgebung interessant, die alternativ zu den vesikulären Systemen anderen Meßmethoden zugänglich und über einen längeren Zeitraum stabil ist. Thiopeptidunterstützte Membranen werden im folgenden als interessante Alternative zu den beschriebenen Modellsystemen verwendet. Die Vorteile dieses festkörperunterstützten Systems werden in den vorgestellten Experimenten deutlich.

#### 5.1.1 Aufbau des Rezeptors

Den schematischen Aufbau des Rezeptors, isoliert aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens *Torpedo californica*, beschreibt Abb. 5.1.1. Ein Ionenkanal besteht aus vier Untereinheiten,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , die in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1:1:1 zusammengesetzt sind (Abb. 5.1.1). In der Membran liegt der Rezeptor als Dimer ( $M_w$  580 000), bestehend aus zwei Kanälen vor.

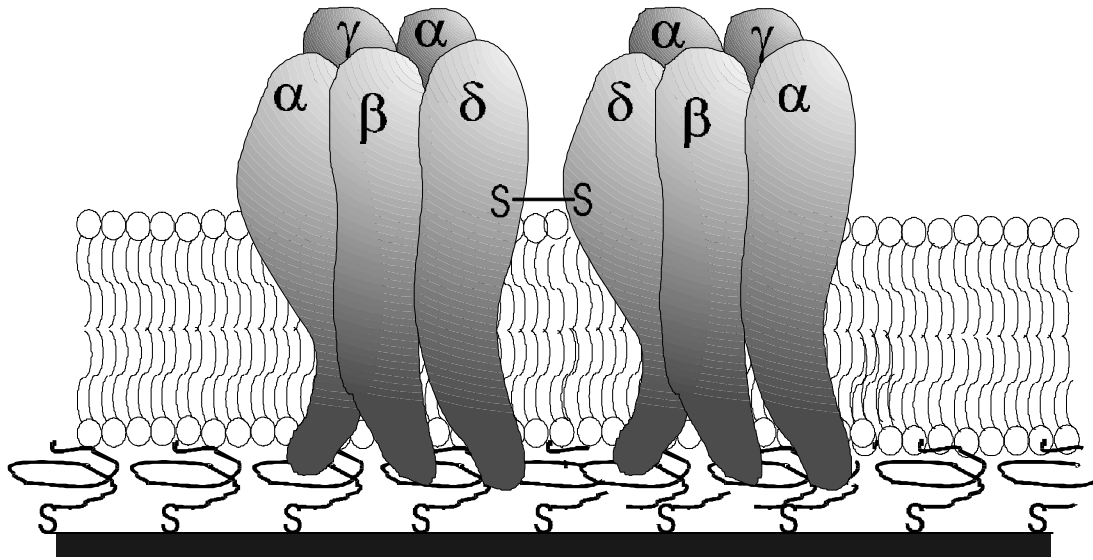


Abb. 5.1.1: Modell eines Acetylcholinrezeptordimers,  $(\alpha_2\beta\gamma\delta)_2$ , inkorporiert in eine thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht auf einer planaren Goldoberfläche

## 5.2 Einbau des Rezeptors durch Vesikelfusion auf einer thiopeptidunterstützten Lipidschicht

Auf einer thiopeptidunterstützten Lipidmonoschicht werden rezeptorhaltige und rezeptorfreie Vesikel gespreitet. Verwendet werden Präparationen, die freundlicherweise von Dr. Kukol, AK Prof. Neumann zur Verfügung gestellt werden. Die entstehenden Schichten werden in der Oberflächenplasmonenspektroskopie unter einem konstanten Winkel in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet.

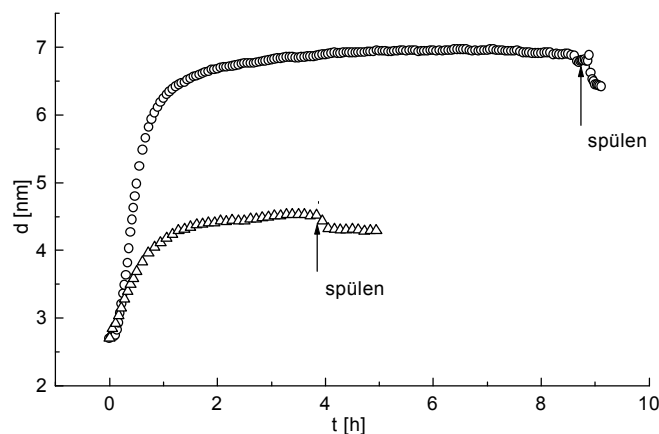


Abb. 5.2.1: Kinetikmessung in Echtzeit, gemessen bei konstantem Winkel. Die Reflektivität wird in optische Schichtdicke umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Ausgangsschichtdicke entspricht der Thiopeptid-Lipidmonoschicht (ca. 2.5 nm). Dargestellt ist die Fusion AChR-freier Vesikel  $\Delta$ , bzw. AChR-haltiger Vesikel  $\circ$ .



Der Brechungsindex der aus Protein- und Lipidmolekülen zusammengesetzten Schicht ist nicht bekannt und wird mit  $n = 1,5$  angenommen. Basierend auf dem Fresnel-Formalismus (näher beschrieben in Kap.7.1.3) werden die optischen Schichtdicken berechnet. Durch die Fusion der rezeptorhaltigen Vesikel steigt die Schichtdicke auf 7nm an. Das Inkrement zwischen rezeptorhaltiger und rezeptorfreier Schicht beträgt ca. 2,5nm. Der Unterschied in der optischen Schichtdicke, die durch Fusion von rezeptorfreien bzw. rezeptorhaltigen Vesikeln entsteht, ist auf den Einbau des Rezeptors in die Lipiddoppelschicht zurückzuführen.

### 5.3 Antikörperbindung an den inkorporierten Rezeptor

Die Kinetikmessung, dargestellt in Abb. 5.3.1, zeigt die Fusion der AChR - Vesikel auf der Peptid-Lipidmonoschicht. Aus der resultierenden Schichtdicke von 6,5nm geht der Einbau der Rezeptormoleküle hervor (der Vergleich mit Abb. 5.2.1 zeigt die hohe Reproduzierbarkeit der resultierenden Schichtdicken).

Um eine Aussage über die Orientierung der inkorporierten Rezeptormoleküle zu treffen, wurde ein Bindungsassay mit einem monoklonalen Antikörper durchgeführt.

Monoklonale Antikörper werden *in vitro* von einer einzelnen Hybridomzelle und ihren genetisch identischen Nachkommen (Klone) produziert. Die so entstehenden Antikörper sind untereinander identisch und binden eine bestimmte Bindungsstelle des jeweiligen Moleküls, das als Antigen in den Wirtsorganismus injiziert wurde.

Für die Experimente wurde der Antikörper WF6 [Sch94] verwendet (zur Verfügung gestellt von Prof. Maelicke), der spezifisch an die Acetylcholinbindungsstelle des Rezeptors bindet [Sch94]. Hergestellt wurde dieser Antikörper in der Maus - Hybridomzelllinie XR6-G10-B3 [Fel86]. Er gehört in die IgG Familie 2a und bindet sowohl an membrangebundene wie auch an freie Rezeptoren, isoliert aus *Torpedo marmorata*. Die Bindung erfolgt jedoch auch an den Rezeptor der Spezies *Torpedo californica* [Sch94].

Ein monoklonales WF6 Molekül bindet jeweils an ein Acetylcholinrezeptormolekül. Die dadurch erzielte Schichtdickenzunahme liegt unter der Auflösungsgrenze der Oberflächenplasmonenspektroskopie (Abb. 5.3.1). Um eine höhere Schichtdickenzunahme zu erhalten, wird ein weiterer Bindungsassay durchgeführt. Dazu wird ein sekundärer, polyklonaler Antikörper verwendet (Kaninchen - anti - Maus - Antikörper,

DIANOVA GmbH, Hamburg). Polyklonale Antikörper werden *in vivo* von B-Lymphozyten produziert. Durch ihre Diversität binden sie an mehrere Stellen des jeweiligen Antigens. In diesem Fall binden demzufolge mehrere sekundäre Antikörper eines Kaninchens an den primären, monoklonalen Antikörper, isoliert aus Mauszellen. Deshalb resultiert die sukzessive Bindung von primärem und sekundärem Antikörper in einer deutlichen Zunahme der Schichtdicke von 0,5nm. In Abb. 5.3.1 wird die Vesikelfusion mit anschließender Bindung des primären bzw. sekundären Antikörpers dargestellt.

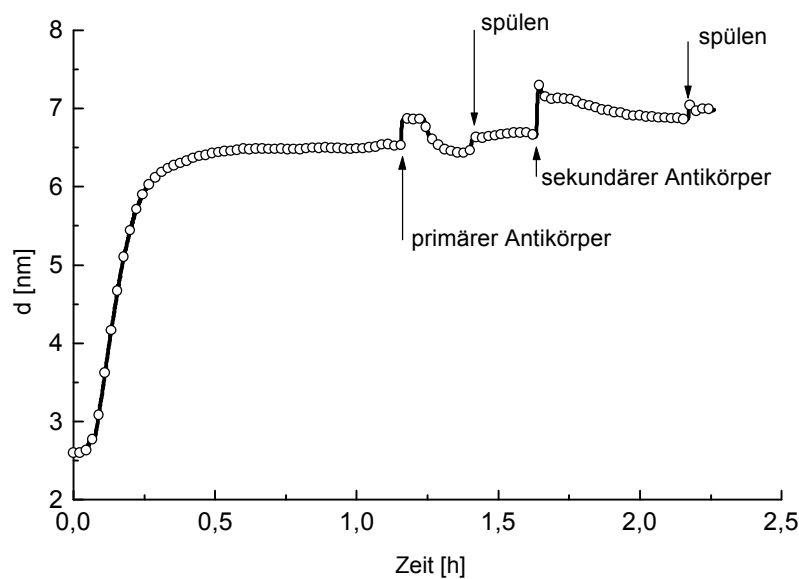


Abb. 5.3.1: Kinetikmessung in Echtzeit, gemessen bei konstantem Winkel. Die Reflektivität wird in optische Schichtdicke umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Ausgangsschichtdicke entspricht der Thiopeptid-Lipidschicht (2.5 nm). Dargestellt ist die Fusion AChR-haltiger Vesikel -○- mit der anschließenden Bindung von primärem, bzw. sekundärem Antikörper.

Als Referenzmessung wird eine rezeptorfremde Lipidschicht mit den Antikörpern inkubiert. Die dabei auftretende unspezifische Bindung ist durch Spülen vollständig zu entfernen. Die Schichtdickenzunahme durch die Verwendung von primärem und sekundärem Antikörper ist jedoch relativ gering. Deshalb wird ein sensitiverer Nachweis etabliert, der im folgenden beschrieben wird.

## 5.4 Antikörperbindungen, nachgewiesen durch Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie

Eine Möglichkeit, die Empfindlichkeit der Oberflächenplasmonenspektroskopie zu erhöhen, ist die Plasmonenfluoreszenzspektroskopie, im folgenden als SPFS Messung bezeichnet (*'surface plasmon fluorescence spectroscopy'*). Die Emission fluoreszierender Moleküle wird durch Anregung eines Plasmons und der damit verbundenen Vergrößerung des elektromagnetischen Feldes verstärkt (s. Kap. 7.2). Die Methode der SPFS erzielt eine um Größenordnungen höhere Empfindlichkeit für Bindungsvorgänge an der Oberfläche, verglichen mit der Oberflächenplasmonenspektroskopie.

Als fluoreszierendes Markermolekül wird Carbocyanin (Cy5<sup>®</sup>) verwendet (DIANOVA GmbH, Hamburg), das an den sekundären Antikörper gebunden ist. Die dadurch entstehende Anordnung ist schematisch in Abb. 5.4.1 dargestellt.

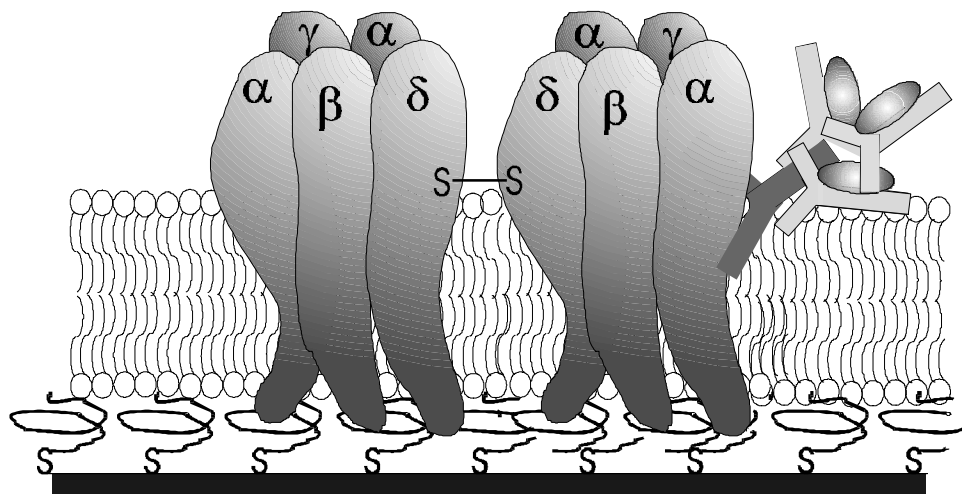


Abb. 5.4.1: Schematische Darstellung des inkorporierten Rezeptordimers mit gebundenem primärem und sekundärem Antikörper

Die in der Abb. 5.4.2 gezeigten Plasmonen - bzw. Fluoreszenzkurven zeigen den Einbau des Rezeptors in die Lipidschicht mit den nachfolgenden Antikörperbindungen. Die Fluoreszenzkurve, gemessen in Abhängigkeit vom Einfallswinkel, zeigt die Emission des fluoreszierenden Farbstoffs. Wird der Rezeptor inkorporiert und die Antikörper gebunden, entsteht ein Maximum an Fluoreszenz. Dieses Maximum ist winkelabhängig. Es liegt im Winkelbereich des Minimums der SPS-Kurve (Abb. 5.4.2). Diese Winkelabhängigkeit ist ein Indiz für die Oberflächensensitivität der Meßmethode, da nur

die Fluoreszenz im Bereich des evaneszenten Feldes verstärkt wird. Die detektierte Fluoreszenz läßt auf eine hohe Oberflächenbelegung mit Rezeptoren schließen, die entsprechend orientiert sind. Die Quantifizierung der gemessenen Fluoreszenz, die einen Aufschluß über die Zahl der inkorporierten Rezeptoren hätte geben können, war zum Zeitpunkt der Messung nicht verfügbar.

Die Referenzmessung wird an einer rezeptorfreen Lipidschicht durchgeführt, wobei keine Fluoreszenz detektierbar ist. Die unspezifische Bindung fluoreszierender Antikörpermoleküle an die Oberfläche ist demzufolge sehr gering.

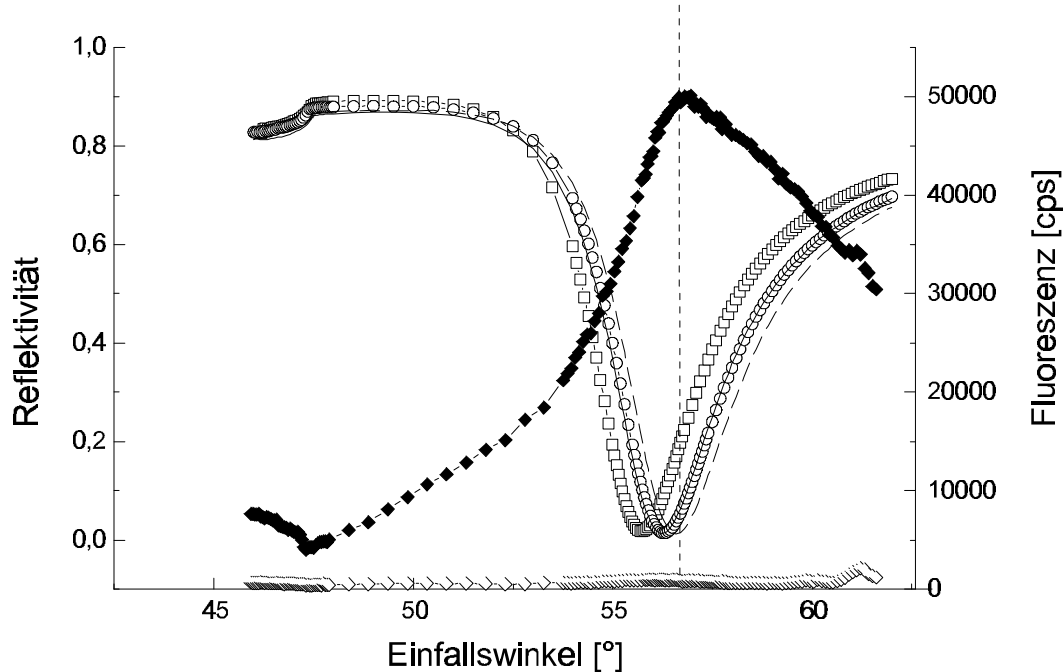


Abb. 5.4.2: Reflektivitätskurve (SPS) bzw. Fluoreszenzkurve (SPFS). cps: counts per second, a.u.: arbitrary units,  $\square$ - Thiopeptid-Lipidschicht,  $\circ$ - Thiopeptid-Lipidschicht mit inkorporiertem AChR, — dito mit gebundenem monoklonalen WF6 Antikörper, — — dito mit gebundenem fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper. Fluoreszenzskurven von der Thiopeptid - Lipiddoppelschicht mit  $\blacklozenge$ - und ohne  $\pi$ - inkorporiertem AChR, mit primärem, bzw. sekundärem Antikörper markiert.

## 5.5 Bindung des Antagonisten $\alpha$ -Bungarotoxin an den inkorporierten Acetylcholinrezeptor

Die Wechselwirkung des rekonstituierten Rezeptors mit einem bekannten Antagonisten des Rezeptors wird im folgenden untersucht. Das Peptid  $\alpha$ -Bungarotoxin, enthalten in dem Schlangengift, isoliert aus einem Vielbindenkrait (*Bungarus multicinctus*) bindet

irreversibel an den Rezeptor und verhindert die Kanalöffnung durch den Liganden Acetylcholin.

In der Oberflächenplasmonenspektroskopie wird in einer Kinetikmessung der Bindungsvorgang des Bungarotoxin gezeigt. Zunächst wird wieder der Einbau des Acetylcholinrezeptors verfolgt. (vgl. Abb. 5.2.1). Danach wird die Schichtdicke nach Zugabe von  $\alpha$ - Bungarotoxin in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Schichtdickenzunahme durch die Bindung des Peptidmoleküls  $\alpha$ - Bungarotoxin entspricht ca. 0,5nm in einem kurzen Zeitraum von 30min. Zu beobachten ist anschließend in einer Langzeitkinetik von 8 Stunden das weitere Ansteigen der Schichtdicke auf einen Wert von ca. 1nm.

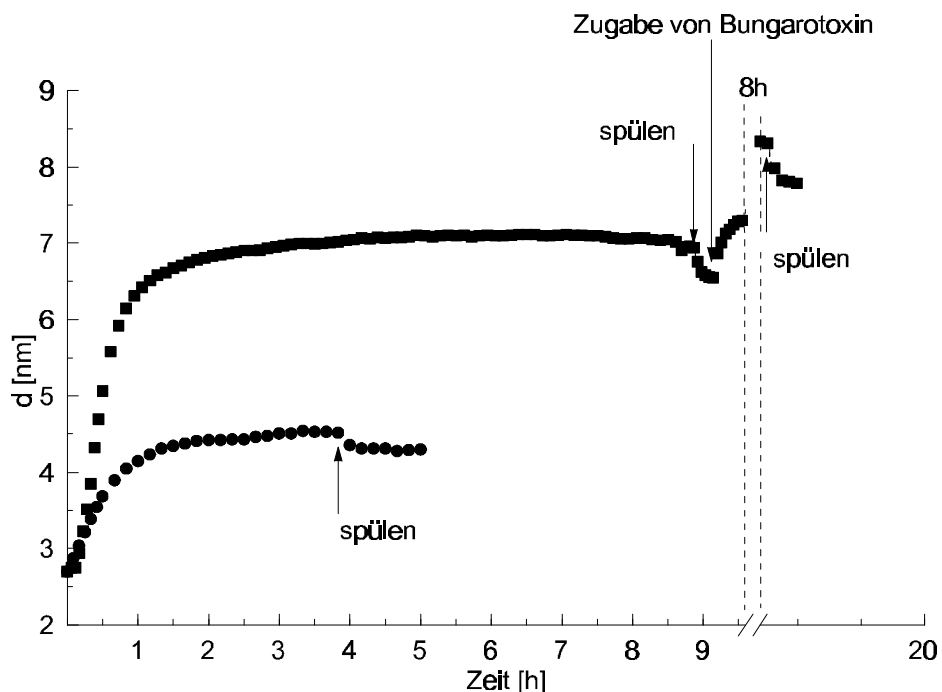


Abb. 5.5.1: Kinetikmessung in Echtzeit, gemessen bei konstantem Winkel. Die Reflektivität wird in optische Schichtdicke umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Ausgangsschichtdicke entspricht der Thiopeptid-Lipidschicht (2.5 nm). Gespreitet werden Vesikel ohne  $\bullet$ - AChR bzw. mit rekonstituiertem AChR  $\blacksquare$ -. Gezeigt wird auch die Bindung des Antagonisten  $\alpha$ - Bungarotoxin an den Rezeptor.

## 5.6 Diskussion

Die Fusion acetylcholinrezeptorhaltiger Vesikel führt zur Rekonstitution des Rezeptors in die thiopeptidunterstützte Lipidschicht. Mit der Methode der Oberflächenplasmonenspektroskopie lässt sich der Aufbau des Schichtsystems verfolgen. Die Inkorporation des Rezeptors in die Membran zeigt sich durch die Schichtdickendifferenz

zu der rezeptorfreen Schicht. Die optische Dicke der rezeptorhaltigen Schicht beträgt 7nm, wobei dieser Betrag über die Fläche des Lasermeßfleckes gemittelt ist. Die Schicht weist auf eine relativ hohe Belegungsichte hin, verglichen mit der Längenausdehnung von 10nm [Toy88].

Die Bindung des Antagonisten  $\alpha$ -Bungarotoxin wird mit der Methode der Oberflächenplasmonenspektroskopie gemessen. Über einen längeren Zeitraum gemessen, nimmt die optische Schichtdicke um 1nm zu.

Verschiedene Antikörperbindungsassays ermöglichen eine Aussage über die Orientierung der eingebauten Rezeptormoleküle. Der monoklonale WF6 Antikörper bindet spezifisch an der Acetylcholinbindungsstelle. Die Bindung des Antikörpers ist ein Hinweis darauf, daß zumindest ein Teil der inkorporierten Rezeptoren in der erwünschten Orientierung eingebaut ist und die Bindungsstelle für den Antikörper zugänglich bleibt. Die aus der Bindung resultierende Schichtdickenzunahme liegt jedoch unter der Auflösungsgrenze der Oberflächenplasmonenspektroskopie. Erst durch die anschließende Bindung mehrerer polyklonaler Antikörper an ein monoklonales primäres Antikörpermolekül, wird der Effekt der Schichtdickenzunahme verstärkt und die Bindung nachweisbar.

Eine erhebliche Verstärkung der Sensitivität wird durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes erzielt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff (Cy5) ist an den zweiten Antikörper konjugiert. Die Fluoreszenz wird durch das evaneszente Feld der Oberflächenplasmonen verstärkt. Die dabei auftretende Winkelabhängigkeit der Fluoreszenz ist ein Hinweis auf die Oberflächenspezifität dieser Methode. Der Vergleich mit der Referenzmessung ohne inkorporierten Rezeptor, bei der keine Hintergrundfluoreszenz meßbar ist, zeigt die hohe Spezifität der Bindung. Die Fluoreszenz der in Lösung befindlichen Moleküle beeinflußt die Messung an der Oberfläche also nicht.

Die Vorteile des Thiopeptid-Lipidsystems zeigen sich in der Spezifität der Bindungsassays. Im Vergleich mit dem klassisch durchgeführten ELISA (*'enzyme linked immunosorbent assay'*) wird die Antikörperbindung durch die oberflächensensitive Fluoreszenz um mehrere Größenordnungen verstärkt. Ein weiterer Vorteil ist die geringe unspezifische Bindung der Antikörper an die Oberfläche des Thiopeptid-Lipidsystems. Um die unspezifische Bindung der Antikörper in der Methode des klassischen ELISA zu

verhindern, müssen zeit- und materialaufwendige Spülprozesse durchgeführt werden, die bei dem hier vorgestellten Modellsystem entfallen.

Die thiopeptidunterstützte Lipidschicht zeigt in diesen Untersuchungen die geeigneten Eigenschaften, um durch den Nachweis von Bindungsvorgängen als System für ein Screening bezüglich der biologischen Wirksamkeit von Substanzen verwendet zu werden.

## 6 Inkorporation der Cytochrom c Oxidase, isoliert aus Rinderherzmitochondrien, in eine thiopeptidunterstützte Lipidschicht

### 6.1 Theoretische Grundlagen

Protonengradienten können auf unterschiedliche Weise aufgebaut werden. Eine Möglichkeit ist die Kopplung des Protonentransports an Redoxprozesse, wie es in der Atmungskette der Fall ist. Die Atmungskette, ein Bestandteil der oxidativen Phosphorylierung, katalysiert in Pro - und Eukaryonten den Transport von Elektronen (aus NADH bzw. reduziertem Ubichinon) zu molekularem Sauerstoff. Wegen der großen Differenz der jeweiligen Redoxpotentiale, ist diese Reaktion stark exergon. Ein großer Teil der dabei freiwerdenden Energie wird von den Komponenten der Atmungskette zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten genutzt, in dem die Stoffwechselenergie konserviert wird. Einer der Komponenten ist die Cytochrom c Oxidase (im folgenden als COX bezeichnet), die als vierter Komplex der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist.

Die COX enthält als redoxaktive Bestandteile zwei Kupfer - Zentren ( $Cu_A$  und  $Cu_B$ ) und die Hämzentren  $a$  und  $a_3$ , über die die Elektronen schließlich zum Sauerstoff gelangen. Der damit energetisch gekoppelte Protonentransport läuft vektoriell von der Matrix in den Intermembranraum. Durch Bindung von ATP an die Matrixdomäne der Untereinheit IV (Abb. 6.6.1) wird das Enzym allosterisch gehemmt (Kontrolle der Zellatmung durch den Energieverbrauch oder das ATP/ADP-Verhältnis) [Arn97]. Das Schilddrüsenhormon 3,5-Dijodthyronin bindet an die Untereinheit Va und hebt die ATP-Hemmung über die Untereinheit IV wieder auf [Arn98]. Bindung von ATP an die Untereinheit VIa halbiert die  $H^+/e^-$  Stöchiometrie des Enzyms aus Herz und Muskel von 1.0 auf 0.5 [Nap98]. Angetrieben wird dieser aktive Transport durch die enzymatische Reduktion von Sauerstoff, wobei die Elektronen von der Hämgruppe des Carrierproteins Cytochrom c bereitgestellt werden [Bab92]. Um diese grundlegenden Stoffwechselmechanismen zu verstehen, wurde die Cytochrom c Oxidase in Vesikel rekonstituiert [Ste91, 93], [Nic95].



Alternativ ist das thiopeptidunterstützte Modellsystem ein vielseitiges System, um den Protonentransport der Cytochrom c Oxidase direkt nachzuweisen. Die Charakterisierung mit optischen Meßmethoden gibt Einblick in den Prozeß und die Qualität der Rekonstitution. Simultan durchgeführte elektrochemische Methoden geben Hinweise auf die Aktivität der eingebauten Enzymkomplexe, während Einblicke in die Architektur des Schichtsystems durch die Impedanzspektroskopie gewonnen werden.

## 6.2 Spontane Inkorporation der solubilisierten Cytochrom c Oxidase durch Unterschreiten der kritischen Mizellkonzentration

Alternativ zu der Vesikelfusion wird im folgenden der spontane Einbau eines solubilisierten Membranproteins durch Unterschreiten der kritischen Mizellkonzentration gezeigt. Die Präparation wurde freundlicherweise vom Arbeitskreis Prof. Kadenbach zur Verfügung gestellt.

Die Cytochrom c Oxidase (COX) wird mit den Detergenzien Triton X-114, Triton X-100 und Na<sup>+</sup>Cholat aus Rinderherz isoliert [Kad86]. Die Ammoniumsulfat - präzipitierte COX wird in 0.25 M Saccharose aufgenommen. Das Cholat, angebunden an die membranständigen Domänen der COX, bewirkt, daß der Enzymkomplex in gelöster Form vorliegt.

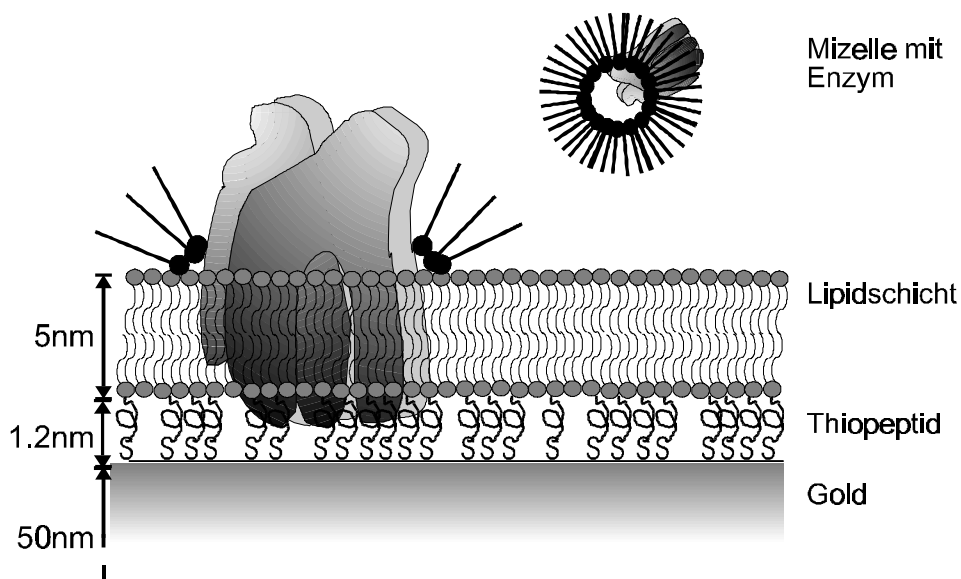


Abb. 6.2.1: Dargestellt ist schematisch der Vorgang der spontanen Rekonstitution der COX als Dimer in eine planare Lipiddoppelschicht, induziert durch Unterschreiten der kritischen Mizellkonzentration.

Die Endkonzentration der Saccharose/Cholat Lösung an Cytochrom c Oxidase-Molekülen beträgt 13,51mg/ml (66µM). In einer Meßküvette mit 800µl Puffervolumen wird die COX-Lösung auf 0,16 µM verdünnt. Die Abb. 6.2.1 zeigt, wie man sich den Einbau der solubilisierten COX als Dimere in die vorgefertigte Peptid - Lipiddoppelschicht vorstellen kann.

Die Zugabe einer kleinen Menge detergentzgelöster COX in die Meßzelle führt zu einer Verdünnung des Detergenz unter die sogenannte kritische Mizellkonzentration (*'critical micellar concentration' CMC*). Jedes Detergenz hat eine charakteristische kritische Mizellkonzentration, die von seinen molekularen Eigenschaften, der Ionenstärke, der Temperatur und dem pH Wert abhängt [s. Neu85]. Bei der Unterschreitung der kritischen Konzentration lösen sich die Detergenzmoleküle aus ihrer mizellaren Organisation und liegen als Monomere vor. Das verwendete Cholat hat eine CMC von 14mM [Tho80]. Cholat ist ein in der Gallenflüssigkeit vorkommendes Steroid, das in seiner Struktur sowohl polare als auch unpolare Strukturen aufweist (Abb. 6.2.2). Dadurch wirkt dieses Molekül als 'mildes' Detergenz und wird für die Solubilisierung der Cytochromoxidase [Nic85], [Azz81] [Err78] ebenso wie für die Isolation anderer komplexer Membranproteine verwendet [Bru85], [Dem84], [Mit85], [Bar84].

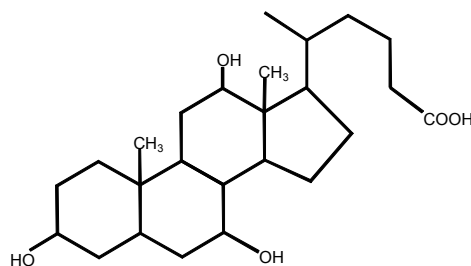


Abb. 6.2.2: Strukturformel von Cholat, MW 431, CMC, 20°C: 14mM bei einer Na<sup>+</sup>Konzentration von 0-0,05M

Durch die Auflösung der Mizellen zu einzeln vorliegenden Detergenzmolekülen, werden die Enzymkomplexe nicht mehr in Lösung gehalten, sondern inkorporieren spontan in die vorgefertigte planare Lipidschicht. Dieser Prozeß wird durch die hydrophoben Domänen der enthaltenen Rezeptormoleküle begünstigt.

Durch Entfernen der überschüssigen Detergenzmoleküle nach jedem Einbauschritt, soll eine Wechselwirkung mit der Lipiddoppelschicht verhindert werden. Die Inkorporation der Cytochrom c Oxidase führt zu einer Schichtdickenänderung an der Oberfläche, die

mit der Plasmonenspektroskopie zeitabhängig gemessen wird. Eine so entstandene Einbaukinetik ist in Abb. 6.2.3 dargestellt:

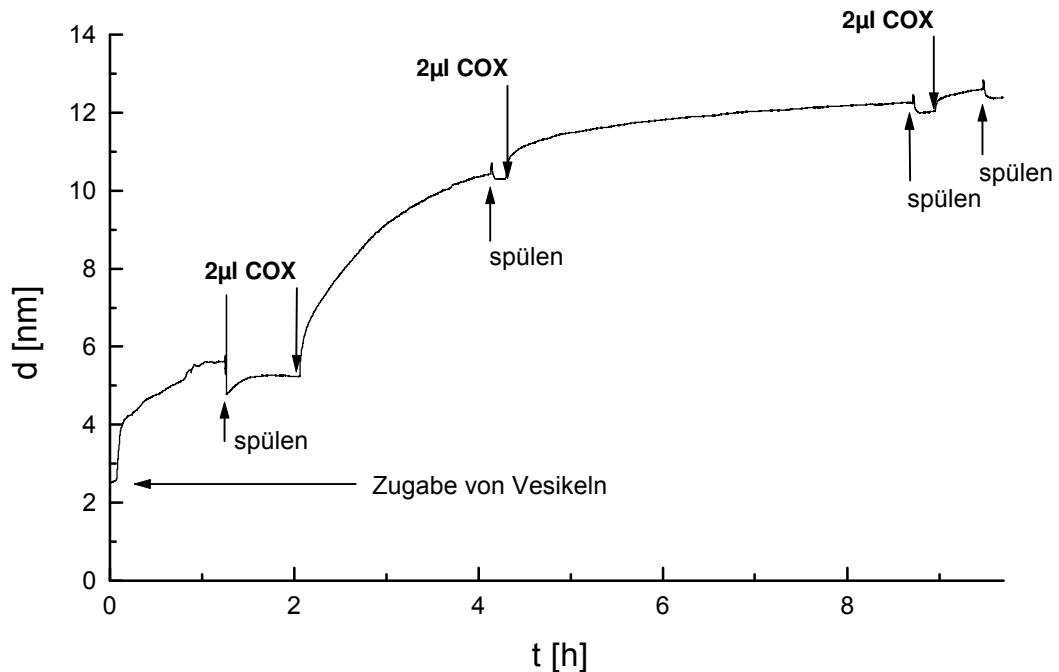


Abb. 6.2.3: Kinetikmessung der Vesikelspreitung auf einer thiopeptidunterstützten Lipidschicht mit anschließender Zugabe solubilisierter COX. Die Schichtdicke am Startpunkt entspricht der thiopeptidunterstützten Lipidmonoschicht (2,5nm). Die Vesikelfusion führt zunächst zu einer instabilen Schicht, die sich nach dem Spülprozeß stabilisiert. Wird eine geringe Menge cholatsolubilisierter COX zugegeben, wird die CMC des Detergenz unterschritten und es kommt zum spontanen Einbau. Anschließend wird ein Spülschritt durchgeführt. Diese Prozedur wird zweimal wiederholt bis eine stationäre Phase in der Kinetik erreicht wird.

Zunächst werden Lipidvesikel in Kontakt mit der Oberfläche gebracht, um die peptidgebundene Lipidmonoschicht zu einer Lipiddoppelschicht zu ergänzen. Die verwendeten Vesikel bestehen aus gereinigtem L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (aus Sojabohne) in einem Puffer, bestehend aus 100mM K-HEPES, 50mM KCl, pH7,2.

Anschließend ist nach Zugabe von detergenzsolubilisierter COX ein weiterer Anstieg der optischen Schichtdicke zu beobachten. Nach einem Zeitraum von vier Stunden wird gespült, um unspezifische Bindungen zu lösen und das Detergenz aus dem Küvettenvolumen zu entfernen. Der Wert der optischen Schichtdicke ist durch die Inkorporation der COX auf 10,3nm angestiegen. Wird erneut solubilierte COX

zugegeben, steigt die optische Schichtdicke bis auf einen Wert von 12nm an. Die letzte Zugabe des solubilisierten Enzymkomplexes führt zu keiner weiteren Schichtdickenzunahme. Die erreichte stationäre Phase des Einbauvorgangs ist auf eine Sättigung der planaren Lipidschicht mit COX Molekülen zurückzuführen. Daß sich die Enzymkomplexe in der Lipiddoppelschicht organisieren (und nicht nur adsorbieren), zeigt die stationäre Phase, in der die Zunahme der optischen Schichtdicke resultiert. Bemerkenswert ist ebenfalls, daß die Halbwertsbreite der zugehörigen Plasmonenkurven - ein Maß für die Rauheit der gemessenen Schicht - während des Inkorporationsprozesses kaum zunimmt.

Die Winkelposition der Probe im Plasmonenaufbau wird nach jedem Inkorporationsschritt auf den Anfangswert zurückgesetzt, um die Linearität zwischen Schichtdickenzunahme und Reflektivität zu gewährleisten. Erst für die Auswertung werden die gemessenen Werte zu der dargestellten Kinetik zusammengefügt.

### 6.3 Fluoreszenznachweis der inkorporierten Cytochrom c Oxidase

Die Inkorporation der COX in die planare Lipidmembran wird mit der oberflächenspezifischen Methode der Plasmonenfluoreszenzspektroskopie (SPFS) nachgewiesen. Abb. 6.3.1a) zeigt Plasmonenkurven der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS), die die Verschiebung des Reflektivitätsminimums durch einen Schichtaufbau an der Oberfläche zeigen. Die spontane Inkorporation der COX in die Lipidschicht entspricht der Winkelverschiebung von Kurve 1. zu Kurve 2.. Anschließend erfolgt die sukzessive Bindung des primären Antikörpers (Kurve 3.) und des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (Kurve 4.). In der Abb. 6.3.1 werden die Reflektivitätskurven mit den zugehörigen Fluoreszenzmessungen gezeigt, die während der Inkorporation und der Antikörperbindung gemessen werden. Abb. 6.3.1b) enthält zwei Fluoreszenzkurven, die im Bereich des Minimums der SPS-Kurven gemessen werden. Die Kurve 4, gemessen nach der Zugabe von primärem und sekundärem Antikörper zu der COX- haltigen Lipidschicht, zeigt den Anstieg der emittierten Fluoreszenz bei einem Winkel von 60°. Dieses Intensitätsmaximum liegt in dem Winkelbereich des Intensitätsminimums des reflektierten Lichtes der Plasmonenkurve, verdeutlicht durch die Linie, die die beiden Kurven miteinander verbindet. Die

beobachtete Winkelabhängigkeit zeigt den Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und dem erzeugten evaneszenten Feld des Plasmons und ist damit ein Hinweis für die Oberflächenspezifität der Meßmethode.

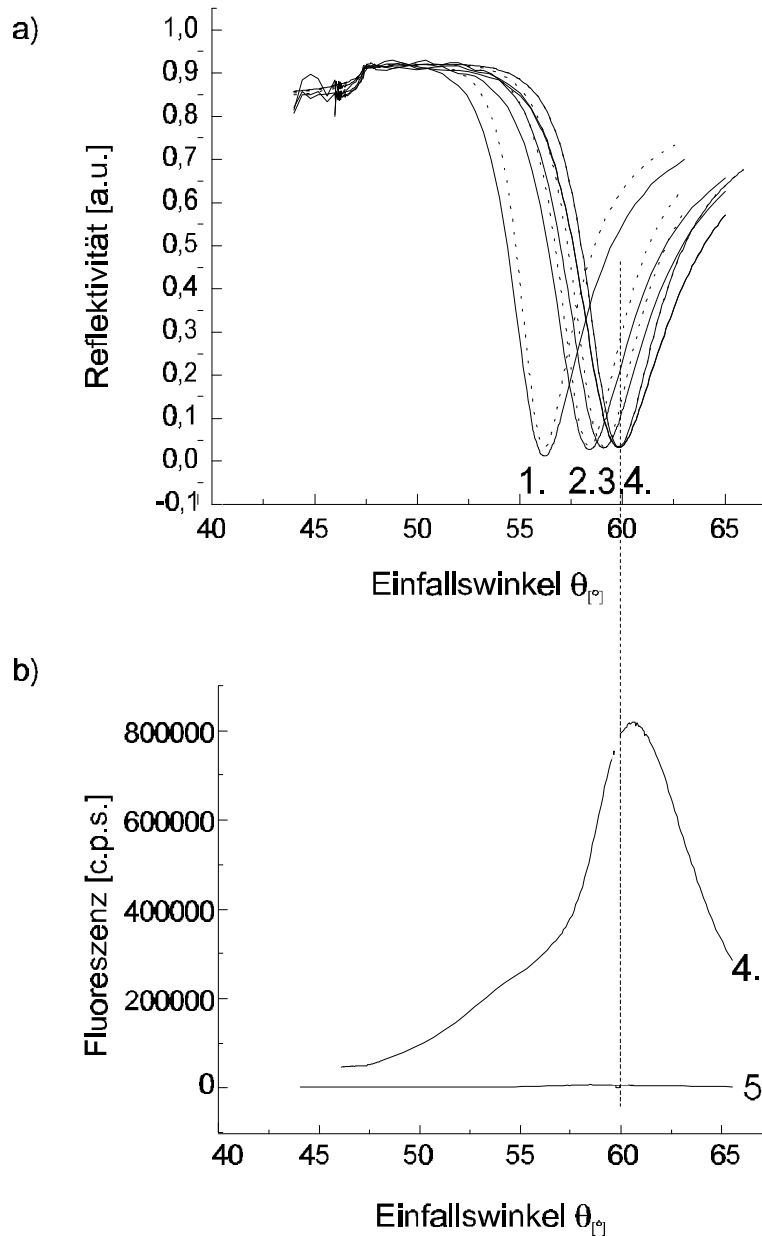


Abb. 6.3.1: a) SPS bzw. b) SPFS Kurven der COX - Inkorporation in die thiopeptidunterstützte Lipidschicht mit anschließender Bindung des primären, bzw. sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers. 1. Ausgangsschichtdicke der vorgefertigten peptidunterstützten Lipiddoppelschicht, 2. Inkorporation der COX, 3. Zugabe des primären Antikörpers, 4. Zugabe des sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers, 5. Referenz mit Antikörpern aber ohne Rezeptor. Die Kurven mit durchgezogener Linie entsprechen den Meßdaten, die Kurven mit gestrichelter Linie den Ergebnissen der Anpassungsrechnung.

Das Maximum an detektierter Fluoreszenz (Kurve Nr.4) wird von den angebundenen sekundären Antikörpern erzeugt. Verstärkt wird die Fluoreszenz durch das evaneszente Feld der Plasmonen. Kurve Nr.5 entsteht bei der Referenzmessung, bei der beide Antikörper zugegeben werden, jedoch keine Cytochrom c Oxidase in der Lipidschicht enthalten ist. Die Kurve zeigt; daß die in der Lösung befindliche Hintergrundfluoreszenz im Vergleich zu dem Signal der oberflächennahen, gebundenen Antikörper vernachlässigbar ist.

Der primäre, monoklonale Antikörper bindet spezifisch an die cytosolische Domäne der transmembranen Untereinheit IV der COX [Sch91]. Übertragen auf das Membranmodell befindet sich die Untereinheit IV auf beiden Seiten der Lipiddoppelschicht. Ist die Untereinheit IV der Antikörperbindung sterisch zugänglich, befindet sich zumindest ein Teil der inkorporierten COX in dieser Orientierung, d.h. mit der Matrixseite zur Goldschicht gerichtet.

Pro inkorporiertem Rezeptor bindet ein Antikörpermolekül. Verstärkt wird die resultierende Schichtdickenzunahme durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (Cy5<sup>®</sup>, Kaninchen anti Maus - Antikörper, DIANOVA GmbH, Hamburg).

### 6.4 Bindungsassay polyklonaler Antikörper

Ebenso, wie die sukzessive Bindung von primärem und sekundärem Antikörper eine Signalverstärkung bewirkt, kann direkt ein polyklonaler Antikörper eingesetzt werden (freundlicherweise von Viola Frank, AK Prof. Kadenbach, zur Verfügung gestellt). Die dadurch erzielte Signalverstärkung ist jedoch mit einem Verlust an Spezifität verbunden. Der eingesetzte polyklonale Antikörper, (aus dem Serum mit COX immunisierter Mäuse gewonnen) bindet an mehreren Stellen des Rezeptors. Insofern ist das resultierende Signal erheblich deutlicher, verglichen mit der Bindung eines monoklonalen Antikörpers (Abb. 6.4.1).

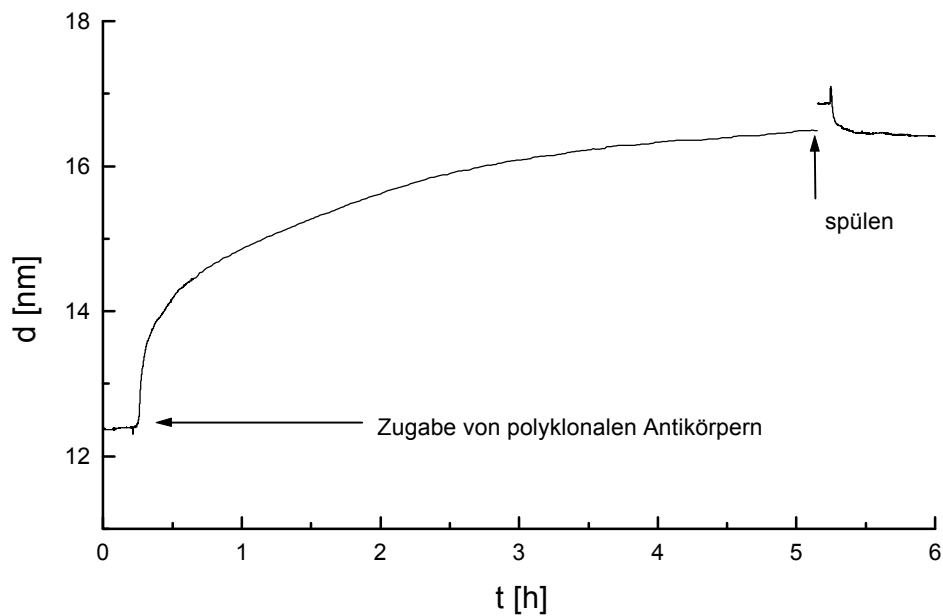


Abb. 6.4.1: Kinetik der Antikörperbindung nach Abb. 6.2.3.

Schlußfolgerungen über die Orientierung der Rezeptoren in der Membran sind wegen der vielen Bindungsmöglichkeiten der polyklonalen Antikörper an die inkorporierten Rezeptoren jedoch nicht möglich.

Die Bindung eines polyklonalen Antikörpers eignet sich, um in einer SPS Messung - ohne die Verwendung der Fluoreszenz - ein deutliches Signal zu erhalten. Für eine Vorabuntersuchung ist dieser Bindungsassay durchaus geeignet, zumal die Gewinnung monoklonaler Antikörper deutlich aufwendiger und langwieriger ist. Die Inkorporation der Cytochrom c Oxidase wird mit den Antikörperbindungsassays nachgewiesen, der Funktionsnachweis wird hingegen mit elektrischen Methoden durchgeführt, die im folgenden beschrieben werden.

## 6.5 Funktionsnachweis der inkorporierten Cytochrom c Oxidase

### 6.5.1 Elektrochemischer Funktionsnachweis der inkorporierten Cytochrom c Oxidase

Ein erstes Anzeichen für die Aktivität der inkorporierten COX wird durch elektrochemische Messungen erhalten. Die Ergebnisse der Rechteckwellenvoltammetrie

(SWV) (Abb. 6.5.1) zeigen die Aktivierung des Enzymkomplexes durch Zugabe von reduziertem Cytochrom c (s. Anhang).

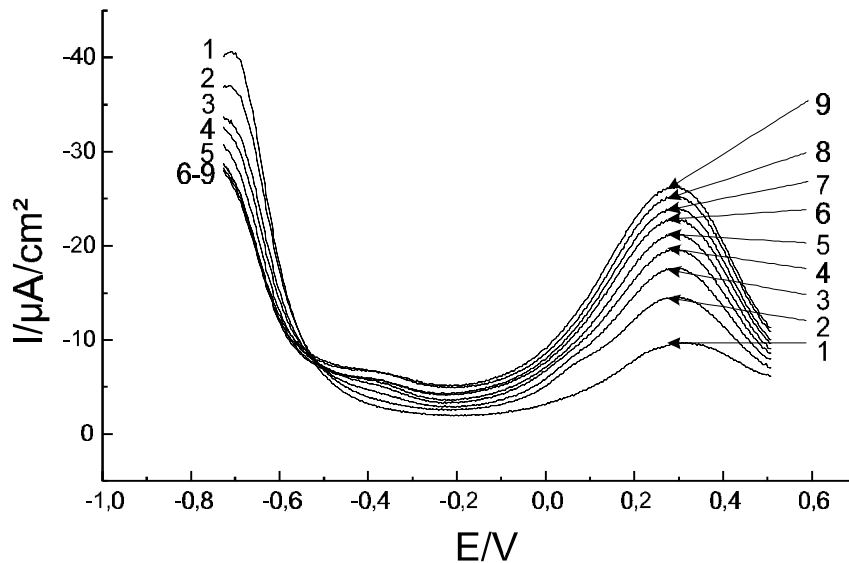


Abb. 6.5.1: Rechteckwellenvoltammogramm, gemessen ohne Substrat (1.) bzw. mit reduziertem Cytochrom c (2.-9.). Zugegeben werden an Cytochrom c: Kurve 2.:  $15\mu\text{M}$ , Kurve 3.:  $30\mu\text{M}$ , Kurve 4.:  $60\mu\text{M}$ , Kurve 5.:  $100\mu\text{M}$ , Kurve 6.:  $150\mu\text{M}$ , Kurve 7.:  $200\mu\text{M}$ , Kurve 8.:  $250\mu\text{M}$ , Kurve 9.:  $300\mu\text{M}$ . Der Puffer ist luftgesättigt.

Wie in Abb. 6.5.1 gezeigt, werden die inkorporierten Enzymkomplexe durch Zugabe des Substrates aktiviert. Die Aktivität entspricht der Signalthöhe in Abhängigkeit von der zugegebenen Substratmenge. Dabei ist bei  $0,3\text{V}$  ein Anstieg, bzw. bei  $-0,7\text{V}$  ein Abfall der Signalthöhe mit steigenden Substratkonzentrationen zu beobachten.

Das Signal bei  $0,3\text{V}$  zeigt einen anodischen Strom. Bei gleichem Potential finden Salamon *et al.* in festkörperunterstützten Membran einen direkten Elektronenaustausch zwischen inkorporiertem Enzym und der Elektrode [Sal93]. Da in dem beschriebenen System das Signal nur in Gegenwart von Cytochrom c beobachtet wird, wird angenommen, daß das Substrat als Mediator wirkt. Das Signal bei  $-0,7\text{V}$  wird als Protonenentladung an der Goldoberfläche beschrieben [Nau97]. Übertragen auf das verwendete System, bedeutet die substratabhängige Abnahme des Signals eine Verringerung der Protonenkonzentration in dem Zwischenraum zwischen Lipidschicht und Elektrode durch die Aktivität der Cytochrom c Oxidase, die Protonen über die Membran verschiebt.

Die Referenzmessung wird ohne inkorporierten Rezeptor an der Lipiddoppelschicht durchgeführt und zeigt nahezu keinen Effekt (nicht gezeigt).



### 6.5.2 Aktivitätsnachweis durch Impedanzspektroskopie

Die Methode der Impedanzspektroskopie wird verwendet, um die Eigenschaften der Schichten, die Inkorporation und die Aktivierung der COX zu messen. Die zur Interpretation der gemessenen Daten verwendeten Ersatzschaltkreise, enthalten generell ein RC - Element, bestehend aus dem Widerstand R und der Kapazität C.

Der Durchmesser einer Ortskurve ergibt den Widerstand R. In einer Ortskurve wird der negativ imaginäre Teil der Impedanz Z ( $-\text{Im}(Z)$ ) gegen den Realteil ( $\text{Re}(Z)$ ) aufgetragen. Zusätzlich kann der Widerstand, zusammen mit der Kapazität, ermittelt werden, indem man den Realteil der Impedanz Z ( $\text{Re}(Z)$ ) gegen die Kreisfrequenz ( $\omega$ ) aufträgt und mit folgender Funktion die Meßergebnisse fittet:

$$\text{Re}(Z) = \frac{R}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (1)$$

Dabei entspricht  $\tau=R \cdot C$  der Relaxationszeit des Schaltkreises. Die Ergebnisse, die durch die Verwendung dieses einfachen Ersatzschaltkreises erhalten werden, entsprechen den Meßergebnissen jedoch nur unzureichend. Insbesondere, da die Zentren der gemessenen Ortskurven oft unter der Achse des Realteils liegen, was durch diese Gleichung nicht berücksichtigt wird.

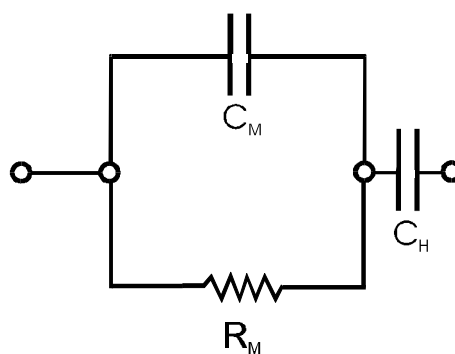


Abb. 6.5.2: Ersatzschaltkreis einer Lipiddoppelschicht,  $R_M$ ,  $C_M$ : Widerstand bzw. Kapazität der Lipiddoppelschicht,  $C_H$  Kapazität der Helmholtzschicht.

Diese Verschiebung der Ortskurven kann durch das Einführen eines ‘constant phase element’ CPE berücksichtigt werden. Ein CPE gibt die Verteilung der verschiedenen Relaxationszeiten durch den phänomenologischen Parameter  $\alpha$  wieder. Das Entstehen verschiedener Relaxationszeiten wird in der Literatur durch eine raue bzw. poröse

Elektrodenoberfläche [Mac87] beschrieben, beziehungsweise entspricht in dem untersuchten System der aus Lipid - und Proteinanteil zusammengesetzten Schicht. Das entsprechende Ersatzschaltbild beschreibt eine parallele Anordnung des Widerstandes und des CPE.

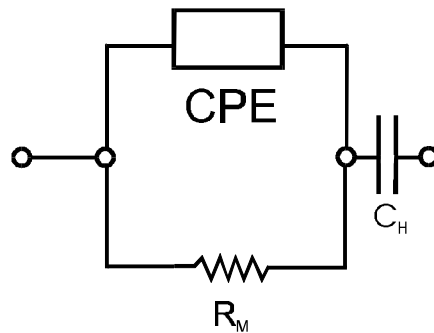


Abb. 6.5.3: Ersatzschaltkreis einer Lipiddoppelschicht mit CPE. Das CPE gibt die Verteilung der Relaxationszeiten wieder.

Die entsprechende Gleichung [Mac87] für eine parallele Anordnung von Widerstand und CPE lautet:

$$\operatorname{Re}(Z) = \frac{R[1 + (\omega\tau)^{1-\alpha} \cos \frac{\pi}{2}(1-\alpha)]}{[1 + (\omega\tau)^{1-\alpha} \cos \frac{\pi}{2}(1-\alpha)]^2 + [(\omega\tau)^{1-\alpha} \sin \frac{\pi}{2}(1-\alpha)]^2} \quad (2)$$

Ist  $\alpha = 0$ , wird Gleichung Nr.2 zu Gleichung Nr.1 reduziert und das CPE verhält sich in dem Ersatzschaltbild wie eine Kapazität. Angewendet auf die Meßdaten ergibt diese Gleichung gute Fitresultate, die anhand eines Beispiels in Abb. 6.5.6 gezeigt werden. Ein entscheidender Nachteil der Einführung des CPE besteht jedoch darin, daß die Ergebnisse keine Aussage über die Eigenschaften der unterschiedlichen Bestandteile des Schichtsystems zulassen.

Mehr Möglichkeiten der Interpretation bietet das Ersatzschaltbild, gezeigt in Abbildung 6.5.4, das außer der seriellen Anordnung von RC - Gliedern der Membran und der Helmholtzschicht, auch die parallele Anordnung von Defekten berücksichtigt.

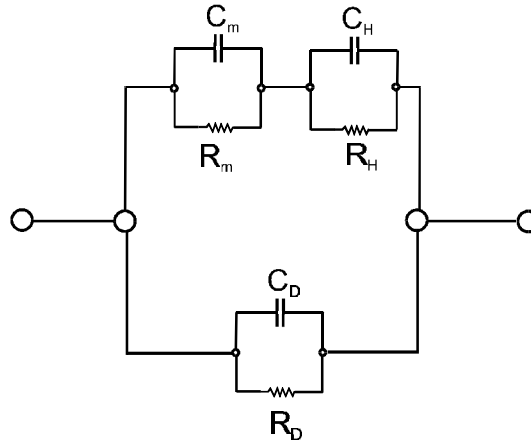


Abb. 6.5.4: Widerstände  $R_M$ ,  $R_S$  und  $R_D$  sowie Kapazitäten  $C_M$ ,  $C_S$  und  $C_D$  der Lipiddoppelschicht (M), der Thiopeptidschicht (S) beziehungsweise den Defekten (D).

Die unterschiedlichen Bestandteile des Schichtsystems sind beschrieben durch  $C_H$  und  $R_H$  für die Helmholtzschicht,  $C_M$  bzw.  $R_M$  für die Lipiddoppelschicht und  $C_D$  bzw.  $R_D$  für unbedeckte bzw. unorganisierte Bereiche auf der Elektrodenoberfläche (Defekte). Dabei werden die aus der Literatur bekannten elektrischen Daten bezogen auf eine Flächenverteilung von 30% für die Defekte und 70% für die Membran. (Angenommen für die Membran ist  $C_M=0,5\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $R_M=\infty$ , für die Helmholtzschicht und die Defekte  $C_H=C_D=25\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $R_H=R_D=50\text{k}\Omega\text{cm}^2$ ). Die Simulationen werden unter Verwendung der Gleichungen 3-6 durchgeführt.

$$(3) \quad Z_M(\omega) = \frac{R_M}{\omega R_M C_M i + 1}$$

$$(4) \quad Z_S(\omega) = \frac{R_S}{\omega R_S C_S i + 1}$$

$$(5) \quad Z_H(\omega) = \frac{R_H}{\omega R_H C_H i + 1}$$

$$(6) \quad Z(\omega) = \frac{Z_H(\omega)(Z_M(\omega) + Z_S(\omega))}{Z_M(\omega) + Z_S(\omega) + Z_H(\omega)}$$

Die aus der Berechnung resultierende Flächenverteilung korreliert mit den Ergebnissen der Röntgenreflektometrie [Bun97].

In Abb. 6.5.5 sind sowohl die gefitteten als auch die simulierten Kurven des Imaginär- und Realteils gegen die Frequenz dargestellt. Die Ergebnisse der Fitroutine bzw. der Simulation stimmen mit den Meßwerten hinlänglich überein.

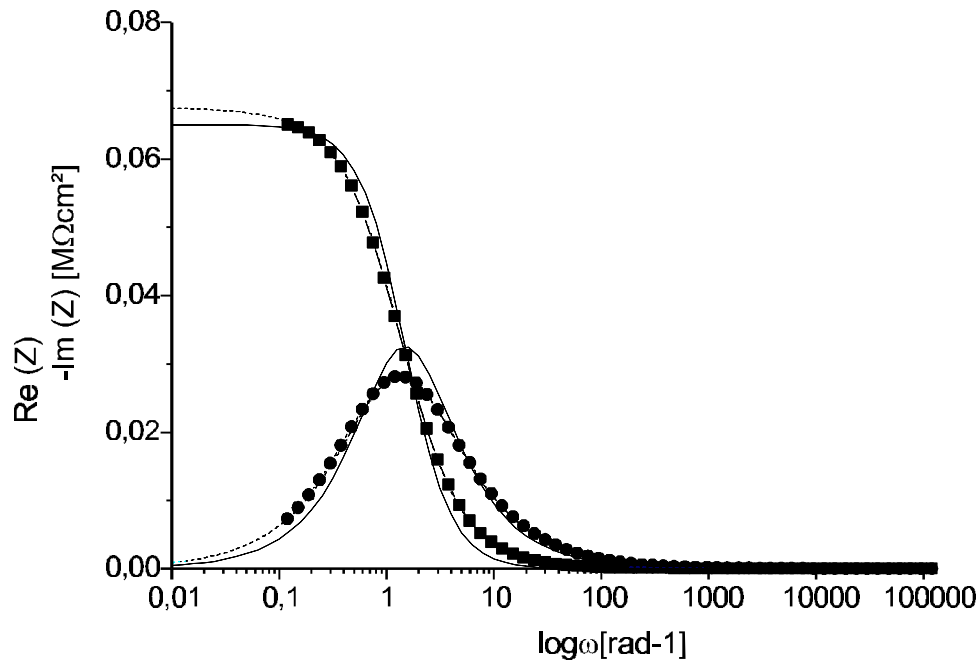


Abb. 6.5.5: -■- Realteil der Impedanz,  $Re(Z)$  und -●- Imaginärteil der Impedanz,  $-Im(Z)$ , aufgetragen gegen den Logarithmus der Kreisfrequenz ( $\omega = 2\pi f$ ). Gemessen wird die thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht, die gestrichelten Linien entsprechen den Fitdaten, gemäß Ersatzschaltkreis (Abb. 6.5.3), die durchgezogenen Linien den simulierten Daten, gemäß Ersatzschaltkreis (Abb. 6.5.4).

An Hand der gefitteten Kurve kann  $\alpha$  und somit die Verteilung der Relaxationszeiten  $\tau$  bestimmt werden, während die Simulation Hinweise auf die Flächenverteilung gibt. Nach der Inkorporation der Cytochrom c Oxidase erhält man ein ähnliche Kurven, wie in Abb. 6.5.5.

Nach der Aktivierung der Cytochrom c Oxidase ist zu beobachten, daß bei den (unter Verwendung des CPE) gefitteten Ergebnissen,  $\alpha$  signifikant größer wird (s. Tabelle 6.5.1), was auf eine noch größerer Verteilung der Relaxationszeiten hindeutet.

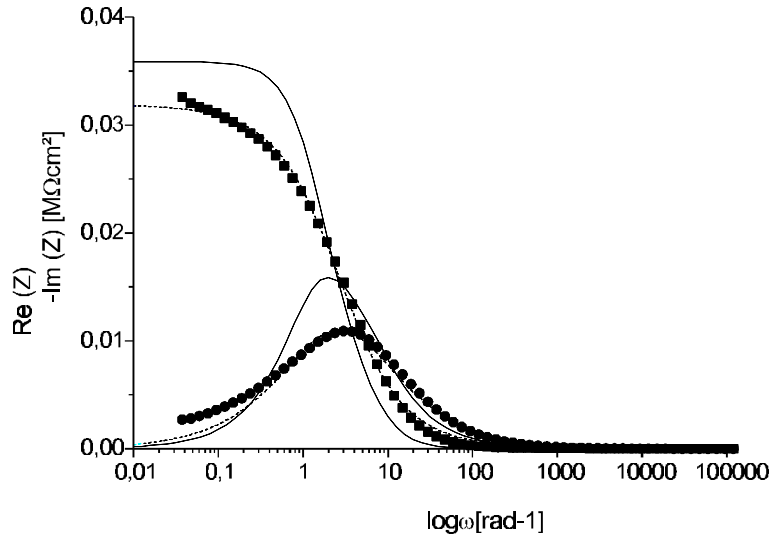


Abb. 6.5.6: -■- Realteil der Impedanz,  $Re(Z)$  und -●- Imaginärteil der Impedanz,  $-Im(Z)$ , aufgetragen gegen den Logarithmus der Kreisfrequenz ( $\omega = 2\pi f$ ). Gemessen wird die Cytochrom c Oxidase, inkorporiert in die thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht, aktiviert mit  $12 \mu M$  Cytochrom c., die gestrichelten Linien entsprechen den Fitdaten, gemäß Ersatzschaltkreis (Abb. 6.5.3), die durchgezogenen Linien den simulierten Daten, gemäß Ersatzschaltkreis Abb. 6.5.4

Die Fitkurve stimmt mit den gemessenen Daten überein, während die Simulation keine Übereinstimmung mit den gemessenen Daten zeigt. Eine Erklärung wird in der abschließenden Diskussion des Kapitels gegeben.

Die elektrischen Daten aus Fitroutine sind in Tabelle 6.5.1 aufgelistet:

	$R/M\Omega \text{ cm}^2$	$\tau/\text{sec}$	$\alpha$	$C/\mu F \text{ cm}^{-2}$
Lipid bilayer	0.88	13.3	0.23	15.1
Lipid bilayer with COX + 50 mV	0.75	8.83	0.13	11.8
Lipid bilayer with COX +50 mV + cytochrome c	0.03	0.49	0.28	14.7

Tabelle 6.5.1: Mit der Fitroutine berechnete Werte für die Lipiddoppelschicht, der inkorporierte Enzymkomplex und seiner Aktivierung durch die Zugabe von Cytochrom c, gemessen bei einem Polarisationspotential von 50mV.

Der Widerstand der Lipiddoppelschicht sinkt durch den Einbau der COX von  $0,8$  auf  $0,7M\Omega \text{ cm}^2$ . Der Widerstand fällt durch die Aktivierung des Enzymkomplexes auf  $0,03M\Omega \text{ cm}^2$ , während sich die Kapazitäten der Systeme verhältnismäßig wenig ändern. Dieser Effekt ist eindeutig erkennbar und auf die Enzymaktivität zurückzuführen. Dabei hängt das Ausmaß des Abfalls im Bereich von +50 bis -200mV von dem angelegten Polarisationspotential ab [Nau98].

### 6.5.3 Abhängigkeit der Aktivität der Cytochrom c Oxidase von der Substratkonzentration

Durch Zugabe von reduziertem Cytochrom c als Substrat wird die inkorporierte COX aktiviert. In Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates ändert sich der Widerstand der Schicht.

Eine Sättigung des Effektes wird bei einer Substratkonzentration von ca.  $7\mu\text{M}$  beobachtet. Wird das Substrat entfernt, steigt der Widerstand der Schicht nahezu auf den ursprünglichen Wert an. Die Referenzmessung (Substratzugabe ohne inkorporierte COX) zeigt nahezu keinen Effekt auf den Widerstand der Schicht.

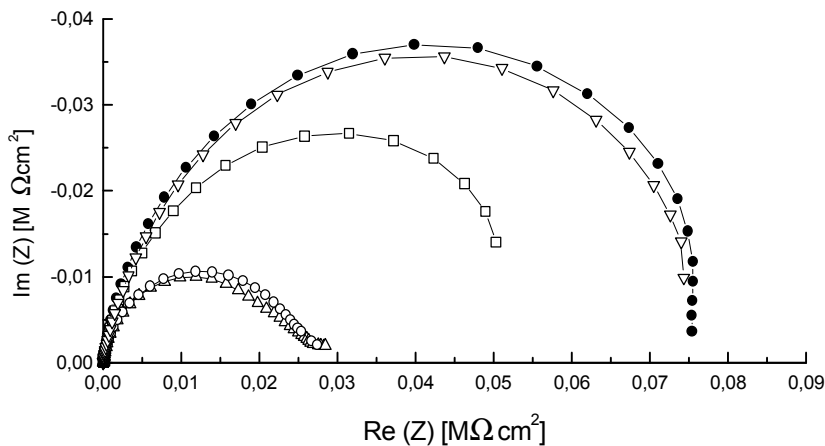


Abb. 6.5.7: Effekt ansteigender Cytochrom c Konzentration bei einem konstanten Polarisationspotential ( $-0,2\text{V}$ ). -●- Lipiddoppelschicht mit eingebauter Cytochrom c Oxidase, -□- Zugabe von  $10\mu\text{l}$  Cytochrom c (Endkonzentration  $1,8\mu\text{M}$ ), -○- Zugabe von  $20\mu\text{l}$  Cytochrom c (Endkonzentration  $5,4\mu\text{M}$ ), -△- Zugabe von  $30\mu\text{l}$  Cytochrom c (Endkonzentration  $10,8\mu\text{M}$ ), -▽- Abspülen des Substrates. (Cytochrom c Stammlösung:  $0,32\text{mM}$ )

### 6.5.4 Inhibition der Cytochrom c Oxidase durch Cyanid

Die Cytochrom c Oxidase wird durch Cyanidzugabe inhibiert. Durch die irreversible Bindung wird der Elektronentransfer von dem Substrat Cytochrom c an die COX verhindert. Der von diesem Reduktionsschritt abhängige Protonentransport wird beendet, demzufolge steigt der Widerstand der Schicht an.

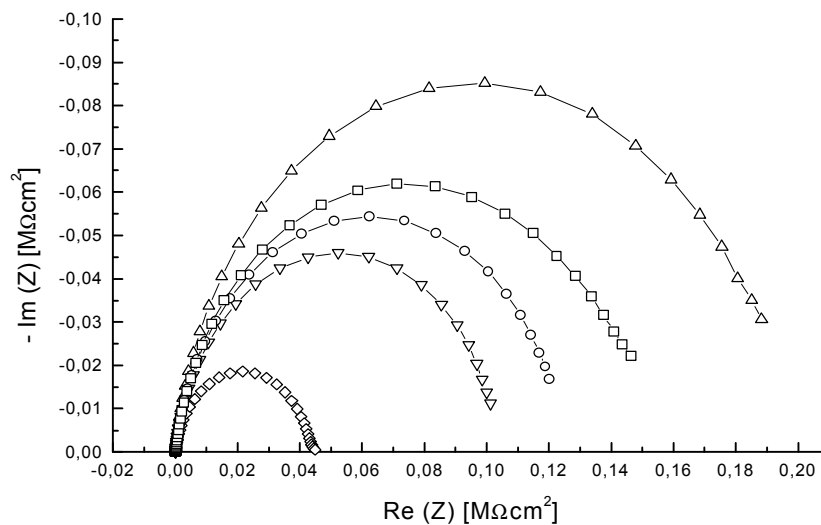


Abb. 6.5.8: Einfluß steigender Konzentrationen des Inhibitors Cyanid auf die aktivierte Cytochrom c Oxidase.  $-\Delta-$  Lipiddoppelschicht mit inkorporierter COX,  $-\diamond-$  Zugabe von  $5,4\mu\text{M}$  Cytochrom c,  $-\nabla-$  Zugabe von  $1,7\mu\text{l}$  CN, Endkonzentration:  $0,1\text{mM}$   $-\circ-$  Zugabe von  $1,7\mu\text{l}$  CN, Endkonzentration  $0,2\text{mM}$  CN,  $-\square-$  Zugabe von  $8,5\mu\text{l}$  CN, Endkonzentration  $0,7\text{mM}$  CN. (Stammlösung:  $100\text{mM}$  CN in  $1\text{M}$  NaOH)

Die experimentellen Daten zeigen den Abfall des Schichtwiderstandes nach Aktivierung der Cytochrom c Oxidase von  $0,2\text{M}\Omega\text{cm}^2$  auf  $0,045\text{M}\Omega\text{cm}^2$ . Die sukzessive Cyanidzugabe von  $0,1\text{mM}$  über  $0,2\text{mM}$  bis  $0,7\text{mM}$  führt zu einem Anstieg des Widerstandes bis auf  $0,155\text{M}\Omega\text{cm}^2$ .

Die Referenzmessung besteht in der Zugabe von Cyanid, ohne inkorporierte COX. Dabei zeigt sich nahezu kein Effekt auf den Widerstand einer reinen Lipiddoppelschicht.

### 6.5.5 Simultanmessung der elektrischen und optischen Eigenschaften der Cytochrom c Oxidase

Die Vorteile der Kombination optischer und elektrischer Meßmethoden werden anhand eines Beispiels gezeigt:

Der bereits vorgestellte spontane Einbau der Cytochromoxidase wird mit der Oberflächenplasmonen - bzw. Impedanzspektroskopie gemessen. Abb. 6.5.9 zeigt den Schichtaufbau durch Vesikelspreitung und anschließender Inkorporation der COX. Wird das Substrat Cytochrom zugegeben, ist kaum eine Schichtdickenzunahme erkennbar. Das bedeutet, daß Cytochrom c ( $3,4\text{nm}$  Durchmesser) durch seine Anbindung keine deutlich

meßbare Änderung der Gesamtschichtdicke bewirkt. Die elektrischen Messungen hingegen geben einen deutlichen Hinweis auf die Bindung und Aktivierung der inkorporierten COX.

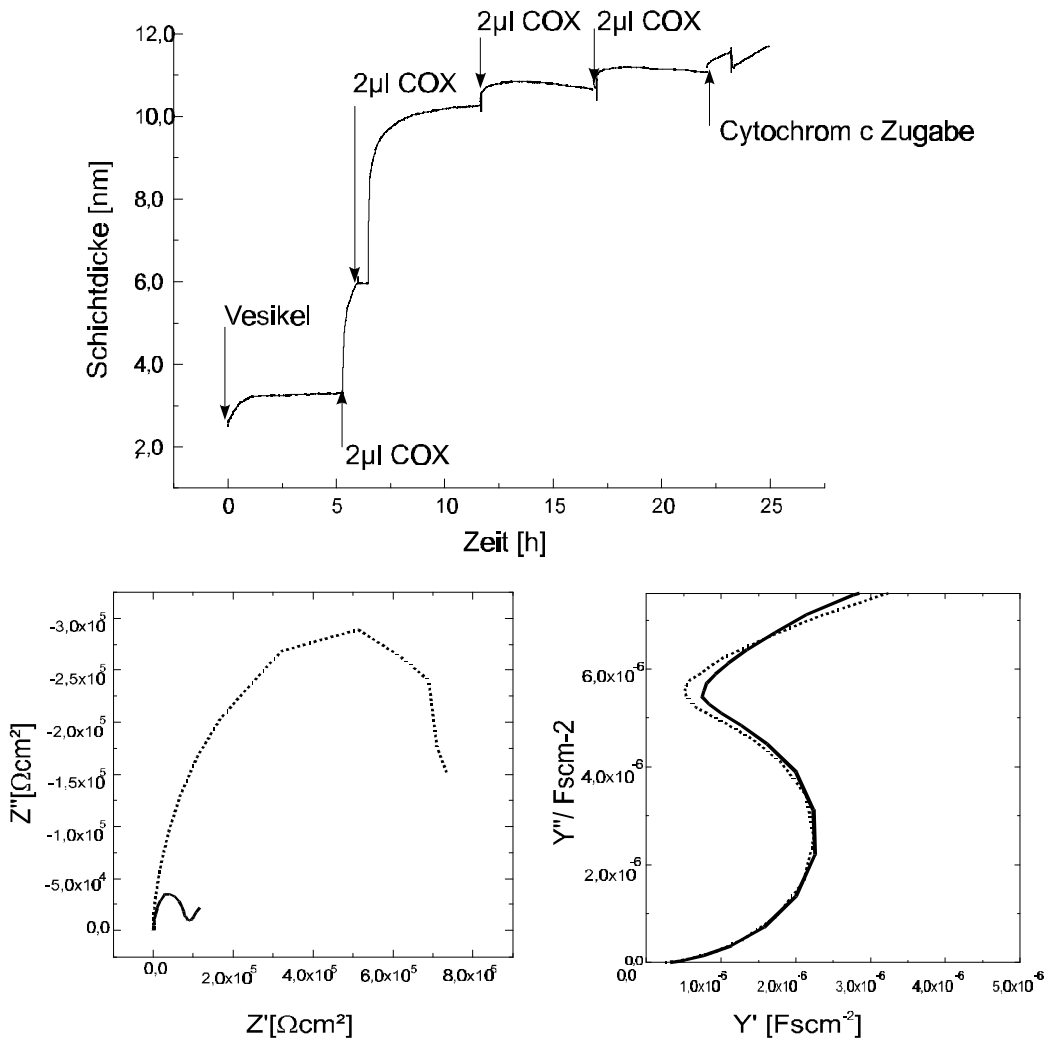


Abb. 6.5.9: Simultanmessung der optischen und elektrischen Eigenschaften der Cytochrom c Oxidase. Die SPS Messung zeigt die spontane Inkorporation der COX durch Unterschreiten der CMC, die Impedanzmessungen zeigen den Abfall des Widerstandes durch Cytochrom c in der Ortskurve, während die Kapazität nahezu gleichbleibt. Die gepunktete Kurve ist vor der Substratzugabe gemessen worden, die Kurve mit durchgezogener Linie danach.

Die Abb. 6.5.9 zeigt die Ergebnisse der Impedanzmessung, aus denen die Änderung des Widerstandes durch Substratzugabe deutlich wird.

Die Ergebnisse der optischen und elektrischen Messung ergänzen sich in ihrer Aussage. Die SPS Messung zeigt den Schichtaufbau, die Impedanzmessung hingegen die Aktivierung der inkorporierten COX.



## 6.6 Diskussion

Die Cytochrom c Oxidase, ein Enzymkomplex der Atmungskette, wird in die thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht inkorporiert und mit optischen und elektrischen Methoden untersucht.

### **Inkorporation der Cytochrom c Oxidase in die thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht**

Die Methode, Membranproteine durch Vesikelspreitung auf der thiopeptidunterstützten Lipidmonoschicht zu immobilisieren, ist auch auf die Cytochrom c Oxidase anwendbar. Effizienter und mit geringerem Aufwand verbunden ist jedoch die spontane Inkorporation des detergenzsolubilisierten Enzymkomplexes. Die Cytochromoxidase wird mit dem Detergenz Cholat aus der Mitochondrienmembran isoliert. Die Detergenzmoleküle bilden Mizellen, in denen die Proteinmoleküle integriert sind. Durch Verdünnen in wäßriger Lösung, lösen sich die Detergenzmoleküle aus ihrer mizellaren Organisation. Die dadurch freiwerdenden Proteinkomplexe inkorporieren in die Lipidschicht, angetrieben durch die hydrophoben Wechselwirkungen an den Außenseiten der Moleküle.

Die Kinetik dieser Inkorporation wird mit der Oberflächenplasmonenspektroskopie gemessen. Die Zugabe detergenzsolubilisierter Cytochrom c Oxidase führt zu einem starken Anstieg der optischen Schichtdicke. Durch Spülen werden die Detergenzmonomere entfernt, um zu verhindern, daß sie die Eigenschaften der Lipiddoppelschicht beeinflussen, bzw. diese zerstören.

Nach wiederholter Zugabe solubilisierter Enzyms wird eine stationäre Phase erreicht, in der keine weitere Inkorporation von Proteinmolekülen stattfindet. Es wird also eine Sättigung der Lipidschicht mit Cytochrom c Oxidase erreicht, was auf einen geordneten Einbau der Proteinmoleküle in die Schicht hindeutet. Eine unspezifische Anlagerung der Moleküle an die Oberfläche der Lipiddoppelschicht hätte hingegen zu einem weiteren Anstieg der Kinetik geführt. Ein weiterer Hinweis für eine organisierte Inkorporation ist die gleichbleibende Halbwertsbreite der zugehörigen Plasmonenkurven - ein Maß für die Rauheit der gemessenen Schicht - (s. Kap.7). Die Rauheit auf der Oberfläche (im Nanometermaßstab) nimmt demzufolge durch den Inkorporationsvorgang nicht wesentlich zu, wie es bei einer Aggregatbildung der Proteinmoleküle zu beobachten

wäre. Die erreichte optische Schichtdicke von 12nm entspricht der Länge eines einzelnen Enzymkomplexes, bestimmt mit der Röntgenstrukturanalyse [Tsu95], [Tsu96]. Es muß berücksichtigt werden, daß für die Berechnung der optischen Schichtdicke ein durchschnittlicher Brechungsindex von  $n = 1,5$  angenommen wird. Insofern stimmen die optischen nicht mit den geometrischen Schichtdicken überein. Der große Anstieg der optischen Schichtdicke durch Proteinzugabe gibt jedoch einen Hinweis auf eine dichte Belegung der Oberfläche mit COX Molekülen.

Die Methode der spontanen Inkorporation detergentsolubilisierter Membranproteine ist effizient und ergibt reproduzierbare Ergebnisse. Für die  $H^+$ ATPase bzw. den Acetylcholinrezeptor ist jedoch der Umweg über die Vesikelrekonstitution unvermeidlich, da die Detergentsolubilisierung nicht zu einer Inkorporation führt. Offensichtlich entsprechen nicht alle Membranproteine den Anforderungen an Stabilität und Konformation, um aus der solubilisierten Form funktional in eine Lipiddoppelschicht zu inkorporieren.

### **Antikörperbindung an den inkorporierten Enzymkomplex**

Die oberflächenspezifische Methode der Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie (SPFS) ermöglicht den Nachweis von fluoreszenzmarkierten Molekülen an Oberflächen. Im Rahmen dieser Arbeit werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, um nachzuweisen, daß die Cytochrom c Oxidase in die thiopeptidunterstützte Lipidschicht inkorporiert ist.

Der primäre, monoklonale Antikörper bindet spezifisch an die cytosolische Domäne der transmembranen Untereinheit IV der COX [Sch91]. Übertragen auf das Membranmodell Antikörper bindet sich die Antikörper bindende Domäne der Untereinheit IV auf der von der Goldoberfläche abgewandten Seite. Zumindest ein Teil der inkorporierten COX befindet sich in dieser Orientierung, da die Bindung des Antikörpers erfolgt.

Pro inkorporiertem Rezeptor bindet ein monoklonales Antikörpermolekül. Verstärkt werden kann die resultierende Schichtdickenzunahme durch die zusätzliche Verwendung eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers. Dieser bindet in größerer Zahl an den primären Antikörper. Diese Art der Verstärkung ist besonders durch den klassischen ELISA ('enzyme linked immunosorbent assay') bekannt. Diese Nachweismethode verwendet ebenfalls primäre und sekundäre Antikörper für die Verstärkung eines

Bindungssignals. Der zweite, markierte Antikörper ist mit einem Enzym verbunden, das eine Farbreaktion katalysiert oder einen Fluoreszenzfarbstoff trägt. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine solche gebundene Fluoreszenz durch das evaneszente Feld der Plasmonen zusätzlich verstärkt und damit die Sensitivität erhöht.

Das bei der Messung der Fluoreszenz auftretende Intensitätsmaximum entspricht dem Reflektivitätsminimum der Plasmonenkurve. Die beobachtete Winkelabhängigkeit zeigt den Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und dem erzeugten evaneszenten Feld des Plasmons und ist damit ein Hinweis für die Oberflächenspezifität der Meßmethode. Dieser Vorteil wird in der Referenzmessung deutlich, in der keine Cytochrom c Oxidase in der Lipidschicht inkorporiert ist. Die durch die markierten Antikörper in der Lösung auftretende Fluoreszenz ist im Vergleich zu dem Signal der oberflächennahen, gebundenen Antikörper vernachlässigbar. Vergleicht man den verhältnismäßig geringen Effekt, der in der SPS Messung auftritt mit dem hohen Fluoreszenzsignal, wird deutlich, daß die SPFS Messung um mehrere Größenordnungen sensitiver ist.

Ist jedoch kein monoklonaler Antikörper verfügbar, bzw. handelt es sich um eine Voruntersuchung, kann eine Detektion auch mit der SPS Methode ohne Fluoreszenz durchgeführt werden. Hierbei empfiehlt es sich, einen polyklonalen Antikörper zu verwenden, der mehrere Bindungsstellen des zu detektierenden Moleküls erkennt. Dadurch ist die Schichtdickenänderung in der SPS Kinetik deutlich erkennbar. Eine Aussage über die Orientierung der detektierten Moleküle in der Lipidschicht läßt sich hierbei jedoch nicht machen.

Die durchgeführten Bindungsassays zeigen die Inkorporation - und bei Verwendung monoklonaler Antikörper - auch die Orientierung der Membranproteine in der thiopeptidunterstützten Lipiddoppelschicht. Generell zeigt eine Antikörperbindung, daß die jeweilige Bindungsstelle in ihrer Konformation erhalten und zugänglich ist. Ein Funktionsnachweis der inkorporierten Cytochrom c Oxidase ist durch die Antikörperbindung nicht erbracht, sondern wird mit elektrischen Methoden durchgeführt.

### **Elektrochemischer Funktionsnachweise der inkorporierten Cytochrom c Oxidase**

Die Cytochrom c Oxidase wird durch Zugabe der reduzierten Form von Cytochrom c aktiviert. Die Aktivität besteht in einem Protonentransport von der Matrixseite über die Lipiddoppelschicht in das umgebende Medium, bzw. in einem Elektronentransfer vom

Cytochrom c zur Goldoberfläche über den inkorporierten Enzymkomplex. Mit der Methode der Rechteckwellenvoltammetrie (*'Square Wave Voltammetrie', SWV*) wird dieser Elektronentransfer bzw. der Protonentransport gemessen. In Abhängigkeit von der zugegebenen Substratmenge steigt die gemessene Strom-Spannungskurve bei 0,3V durch den Elektronentransfer von der Goldoberfläche zur Cytochrom c Oxidase an. In Anbetracht des großen Abstandes zwischen Hämzentren und Goldfläche ist anzunehmen, daß das Cytochrom c dabei als Mediator wirkt.

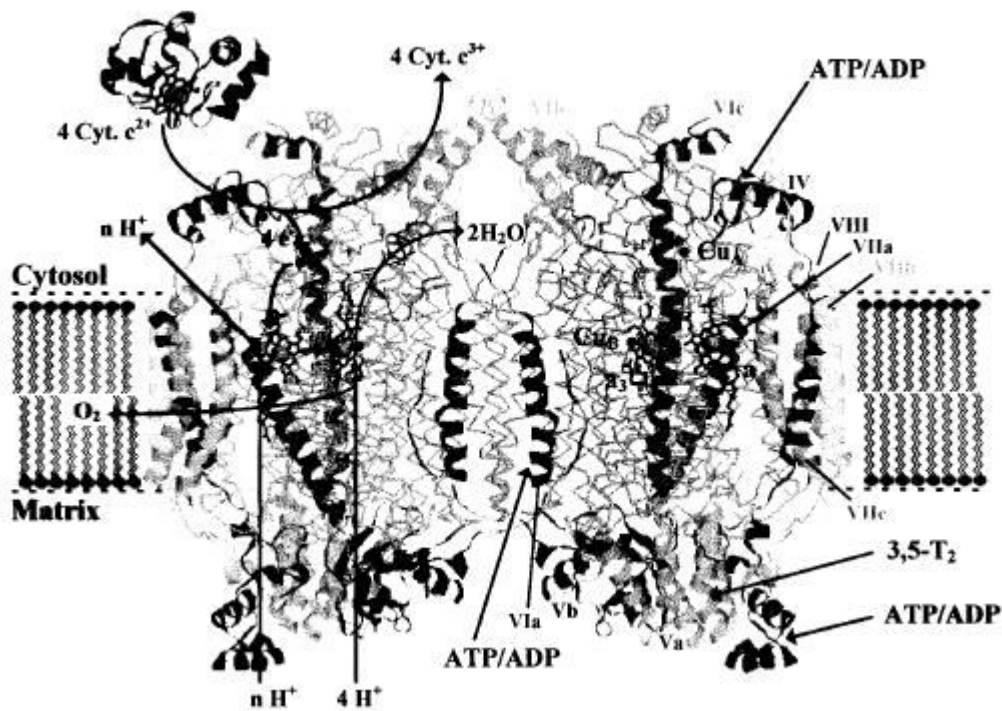


Abb. 6.6.1: Kristallstruktur der dimeren Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz (und von Cytochrom c), von Prof. Kadenbach bearbeitete Darstellung von Tsukihara et al.[Tsu96]. Die gegenwärtigen Mechanismen zur Katalyse des Enzyms sind in dem einen Monomer, die Mechanismen der Regulation durch ATP Bindung, bzw., 3,5-Dijodthyronin, sind in dem anderen Monomer schematisch angedeutet.

Die Enzymaktivität besteht darin, daß Elektronen vom Ferrocycytochrom c über  $Cu_A$  über Häm a zum sauerstoffbindenden binuklearen Zentrum, bestehend aus Häm  $a_3$  und  $Cu_B$  fließen. Beim Elektronentransport von Ferrocycytochrom c zum Sauerstoff wird pro Elektron ein Proton von der Matrixseite (Goldseite) zur cytosolischen Seite transportiert. Dadurch und durch die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser verarmt der Zwischenraum zwischen Goldoberfläche und Lipiddoppelschicht an Protonen. Insofern entladen sich, in Abhängigkeit von der Enzymaktivität, weniger Protonen an der Goldoberfläche und die

Strom-Spannungskurve sinkt bei -0,7V. Über die Prozesse des Elektronentransportes innerhalb des Enzyms und den Zusammenhang mit der Protonentranslokation geben die Messungen jedoch keinen Aufschluß. Der Nachweis der Enzymaktivität besteht in der Messung des vektoriellen Protonentransportes, eine Aussage über den Mechanismus kann an dieser Stelle nicht erfolgen.

### **Impedanzspektroskopischer Nachweis der Enzymaktivität**

Die Impedanzmessungen geben nicht nur Hinweise auf die Aktivität der inkorporierten Cytochrom c Oxidase, sondern ebenfalls über die Qualität der verwendeten thiopeptid-unterstützten Lipiddoppelschicht. Um elektrochemische Prozesse zu verhindern, wird für die Impedanzspektroskopie ein Potentialbereich von +0,05V bis -0,2V gewählt (basierend auf den Ergebnissen der SWV).

Sowohl der Widerstand als auch die Leitfähigkeit der gemessenen Schichten entsprechen nicht einer intakten Lipiddoppelschicht. Die Kapazität einer intakten Lipiddoppelschicht, die die Elektrode vollständig bedeckt, wird mit  $0.5\mu\text{F}/\text{cm}^2$  [Lan94, Lin97, Cor97] beschrieben. Die gemessenen Daten entsprechen einer unvollständigen Bedeckung der Elektrode mit einer Lipiddoppelschicht (ca. 70%). Die restliche Fläche ist von der reinen Peptid, bzw. Peptid-Lipidmonoschicht bedeckt, die zusammenfassend als 'Defekte' bezeichnet werden. Diese Aufteilung der Elektrodenoberfläche entspricht früheren Ergebnissen der Röntgenreflektometrie [Bun98].

Die Zusammensetzung des Schichtsystems aus Bereichen einer vollständigen Lipiddoppelschicht bzw. aus defekten Strukturen führt zu einem Ersatzschaltkreis, der dieser Komplexität des Systems entsprechen muß. Durch die Einführung eines *Constant Phase Element* (CPE) nach MacDonald [Mac87] wird der Verteilung der Relaxationszeiten dieser heterogenen Schicht Rechnung getragen.

Um eine Aussage über das elektrische Verhalten einzelner Komponenten des Systems zu machen, werden Simulationsrechnungen durchgeführt. Der entsprechende komplexe Schaltkreis beschreibt das Verhalten der verschiedenen Bereiche des Schichtsystems. Dazu sind folgende Annahmen zu treffen:

Die Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht wird vernachlässigt, solange die Cytochrom c Oxidase nicht aktiviert wird.

Die Kapazität der Bereiche mit einer intakten Lipiddoppelschicht wird mit  $0,5\mu\text{Fcm}^{-2}$  angenommen.

- Die Kapazität defekter Domänen wird mit der Kapazität der Helmholtzschicht gleichgesetzt ( $25\mu\text{Fcm}^{-2}$ ), während die Leitfähigkeit der Defekte der einer Monoschicht entspricht.
- Für die Widerstände bzw. Kapazitäten des Ersatzschaltkreises werden Werte angenommen, deren Größe sich auf die Zusammensetzung der Elektrodenoberfläche beziehen (70% Lipiddoppelschicht, 30% Defekte).

Die Simulationsrechnung mit diesen angenommen Parametern korreliert weitgehend mit den gemessenen Daten. Insofern entspricht das theoretische Modell des Ersatzschaltkreises dem tatsächlichen System.

Die Schicht mit der aktivierten Cytochrom c Oxidase kann dagegen nur mit der Fitroutine und dem Ersatzschaltbild Abb. 6.5.3 beschrieben werden. Dabei beobachtet man eine Zunahme der Verteilung der Relaxationszeiten, die jedoch nicht mit der Zunahme der Inhomogenität der Schicht erklärt werden kann. Viel wahrscheinlicher ist ein nichtlineares Verhalten des Protonenstroms in Abhängigkeit vom angelegten Potential. Ein solches Verhalten erklärt auch, warum sich die Daten nicht mit dem Ersatzschaltkreis Abb. 6.5.3 simulieren lassen, da die angegebenen Gleichungen 3-6 alle von linearen (ohm'schen) Spannungskurven ausgehen. Weil diese nicht von dem entsprechenden Ersatzschaltkreis erfaßt werden, weicht das Ergebnis der Simulation von den experimentellen Daten ab. Diese Abweichung nach Aktivierung des Enzyms entspricht entweder einem Anstieg der Inhomogenität des Schichtsystems oder einem nichtlinearen Verhältnis zwischen Aktivität und resultierendem Membranpotential der Cytochrom c Oxidase. Dieses nichtlineare Verhalten von ionentransportierenden Membranproteinen ist bereits zahlreich in der Literatur beschrieben worden [Läu91]. Ein sigmoidale [Jun91] bzw. exponentielle [Stev93] Abhängigkeit zwischen Pumpaktivität und Membranpotential wird für die  $\text{H}^+$ ATPase und die COX, rekonstituiert in Vesikel, beschrieben.

### **Substratabhängigkeit der Cytochrom c Oxidase**

Weitere impedanzspektroskopische Untersuchungen der inkorporierten Cytochrom c Oxidase ergeben eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Bereits mit der

Methode der Rechteckwellenvoltammetrie beobachtet). Die Impedanzmessungen werden bei einem konstanten Polarisationspotential von  $-0,2V$  durchgeführt. Bei einer Cytochrom c Konzentration von  $12\mu M$  wird eine Sättigung der Enzymaktivität beobachtet, die weitgehend unabhängig vom angelegten Polarisationspotential ist [Nau98]. Der Membranwiderstand fällt durch die Enzymaktivität auf einen Wert von  $30 k\Omega cm^2$ , wobei die Leitfähigkeit in Anwesenheit des aktiven Enzymkomplex mit der bekannten 'turn over' - Rate der COX korreliert. Wird das Substrat durch Spülen entfernt steigt der Membranwiderstand nahezu auf den ursprünglichen Wert an. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis auf die Reversibilität des Systems, eine wichtige Voraussetzung für die Anwendbarkeit als Sensorsystem.

### **Inhibition der Cytochrom c Oxidase durch Zugabe von Cyanid**

Die Sensitivität des inkorporierten Cytochrom c Oxidase Systems wird gegenüber einem Inhibitor untersucht. Cyanid ist ein bekannter Inhibitor der Cytochrom c Oxidase, der durch die irreversible Bindung an den Enzymkomplex den Elektronentransfer vom Substrat Cytochrom c zu molekularem Sauerstoff verhindert. Demzufolge wird der Protonentransfer unterbunden und der Membranwiderstand steigt an. Die experimentellen Daten zeigen die Abhängigkeit des Membranwiderstandes von der Cyanidkonzentration. Die Referenzmessung besteht in der Zugabe von Cyanid zu einer Lipidschicht ohne inkorporierte Cytochrom c Oxidase. Im angegebenen Konzentrationsbereich gibt es keinen meßbaren Effekt. Höhere Konzentrationen führen zur Umkehrung der o.g. Effektes, nämlich zu einer scheinbaren Erniedrigung des Membranwiderstandes (aufgrund der elektrochemischen Reaktion des Cyanids mit der Goldelektrode, was letztendlich zur Auflösung der Goldschicht führt). Deshalb ist es wichtig, die Einwirkung der Cyanidkonzentration auf die Cytochrom c Oxidase nur bei sehr geringen Konzentrationen zu untersuchen. Die thiopeptidunterstützte Lipidschicht bietet für die Cytochrom c Oxidase ein sensitives System für den Nachweis dieses wichtigen Inhibitors, wobei unspezifische Bindungen an die Lipidschicht vernachlässigbar klein sind.

### **Simultanmessung optischer und elektrischer Methoden**

Abschließend wird die Simultanmessung der optischen Messung mit der Impedanzspektroskopie diskutiert. Durch die gleichzeitige Anwendung der Plasmonenspektroskopie und der Impedanzspektroskopie können wesentliche Parameter des Schichtsystems gleichzeitig bestimmt werden. In dem gewählten Beispiel wird in der Plasmonenspektroskopie die Inkorporation der Cytochromoxidase in die peptid-unterstützte Lipiddoppelschicht beobachtet. In der zeitabhängigen Kinetik wird der sukzessive Schichtaufbau gemessen. Während der Prozeß der Inkorporation deutlich sichtbar ist, wird durch die Zugabe des Substrates kaum ein Effekt erzielt. In der simultan durchgeführten Impedanzspektroskopie ist der Effekt der Enzymaktivierung durch das Cytochrom c hingegen deutlich meßbar; so sinkt der Membranwiderstand, wie zu erwarten, nach der Substratzugabe deutlich ab. Die Ergänzung dieser Meßmethoden wird anhand dieses Beispiels deutlich gezeigt.



## 7 Untersuchungsmethoden

### 7.1 Oberflächenplasmonenspektroskopie

Die Methode der Plasmonenspektroskopie (*Surface Plasmon Spectroscopy*, SPS) wird im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um molekulare Architekturen auf Oberflächen zu charakterisieren. Der Aufbau ultradünner Schichten sowie Bindungsvorgänge an der Oberfläche können, basierend auf der Anregung von Oberflächenplasmonen, nahezu in Echtzeit betrachtet werden.

Bei der Plasmonenspektroskopie wird die Intensität des reflektierten Lichtes in Abhängigkeit vom Einfallswinkel gemessen. Der Verlust an reflektiertem Licht durch Anregung eines Oberflächenplasmons an einem System aus z.B. LaSFN9-Glas/Gold/Dielektrikum gibt Aufschluß über die Bindung von Molekülen an der Goldoberfläche.

Bei einem bestimmten Einfallswinkel koppelt das eingestrahlte Laserlicht mit einem Plasmon. Die Intensität des reflektierten Lichtes wird in Abhängigkeit vom Einfallswinkel gemessen und ein Intensitätsminimum beobachtet (Abb. 7.1.1).

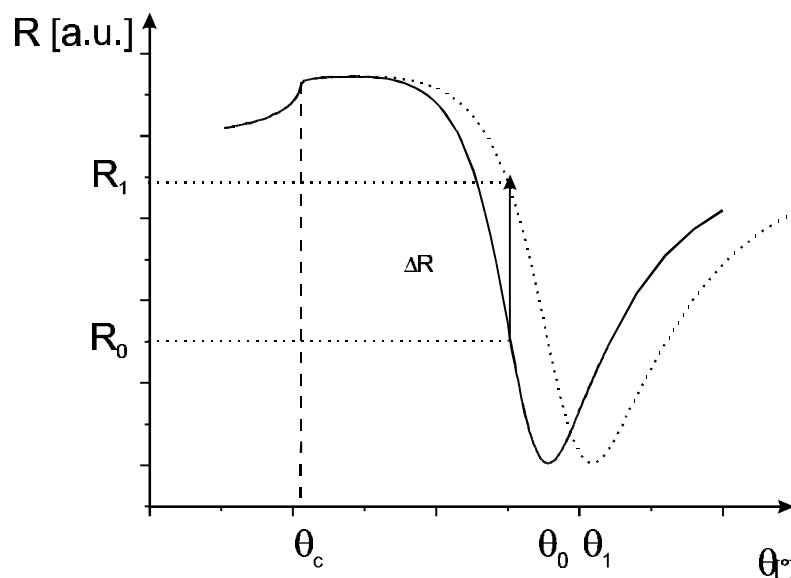


Abb. 7.1.1: Die Reflektivität der resonanten Anregung von Oberflächenplasmonen.  $R$  beschreibt das Verhältnis von eingestrahelter zu reflektierter Lichtintensität.  $\theta_0$  ist der Einfallswinkel außerhalb des Glasprismas (s.u.),  $c$  der kritische Winkel der Totalreflexion. Das Intensitätsminimum beim Resonanzwinkel  $\theta_0$  resultiert aus der Existenz eines Oberflächenplasmons an der Grenzfläche Metall/ Dielektrikum. Die Verschiebung des Resonanzwinkels nach  $\theta_1$  wird durch eine zusätzliche dielektrische Deckschicht verursacht.

Dieses Minimum entsteht, weil bei diesem Winkel das Licht mit maximaler Effizienz seine Energie in das Plasmon überträgt. Adsorbieren Moleküle an der Substratoberfläche, ändert sich der Brechungsindex an der Oberfläche. Diese Änderung bewirkt eine Winkelverschiebung des Minimums des reflektierten Lichtes (Abb. 7.1.1). Ist der Brechungsindex einer Schicht bekannt, läßt sich die Dicke dieser Schicht bestimmen.

### 7.1.1 Theoretische Grundlagen

Oberflächenplasmonen sind elektromagnetische Wellen, die entlang einer Metall/Dielektrikumsgrenzfläche propagieren und dessen Felder von der Grenzfläche aus in beide Medien exponentiell abfallen. Ein Plasmon wird an einer Metalloberfläche angeregt, wenn eine planare elektromagnetische Welle (Licht) in diese Grenzfläche einkoppelt. Solche Wellen können in eine p- bzw. s-polarisierte Komponente zerlegt werden. Bei der s-Polarisation steht der Vektor des Feldes senkrecht zur Einfallsebene, so daß kein Oberflächenplasmon angeregt werden kann. Bei der p-Polarisation ist die Richtung des elektrischen Feldes parallel zu der Einfallsebene des Lichtes.

Für eine Anregung müssen die Energie und Impuls der Lichtwellen mit denen des Plasmons übereinstimmen. Folgende geometrische Überlegungen zeigen die Bedingungen, die erfüllt sein müssen, um ein Plasmon anzuregen:

In Ausbreitungsrichtung, parallel zur Oberfläche, verhält sich das Oberflächenplasmon wie eine Lichtwelle, mit einem sinusförmigen Verlauf des elektromagnetischen Feldes (E):

$$E = E_0 \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda_p} x\right)$$

dabei wird  $\left(\frac{2\pi}{\lambda_p}\right)$  als Wellenvektor  $\vec{k}$  bezeichnet. Bei einem bestimmten Einfallswinkel sind die Bedingung für die  $\vec{k}$ -Vektoren erfüllt und das eingestrahlte Laserlicht koppelt mit einem Plasmon. Dabei wird Energie des Lichtes an das Plasmon übertragen, was in einem Intensitätsminimum des reflektierten Lichtes resultiert. Der Winkel bei dem dieses Minimum auftritt hängt von dem  $\vec{k}$ -Vektor des Plasmons ab. Die Projektion des Wellenvektors des einfallenden Lichtes ( $\vec{k}_0$ ) muß mit der des Wellenvektors des Plasmons ( $\vec{k}_{Plasmon}$ ) übereinstimmen. Man kann sich vorstellen, daß dann 'die Lichtwellenberge die Plasmonenwellenberge anschieben können'. Ändert sich dieser durch eine Änderung des

Brechungsindex an der Grenzfläche, wie z.B. durch Adsorption von Molekülen an der Metalloberfläche, so verschiebt sich auch das Minimum des reflektierten Lichtes.

In der Abb. 7.1.2a) und Abb. 7.1.3 wird gezeigt, daß die Bedingungen für die Anregung eines Plasmons an Luft nicht möglich ist: Die Projektion des Wellenvektors  $\vec{k}_0$  ist zu kurz im Vergleich mit dem Wellenvektor des Plasmons  $\vec{k}_{\text{Plasmon}}$  (Abb. 7.1.2a). Abb. 7.1.3 zeigt die entsprechenden Dispersionsrelationen, wobei in Luft die Dispersionsrelation des Lichtes nicht die des Plasmons schneidet - was bedeutet, daß keine Kopplung zustandekommen kann.

Wird jedoch Licht durch ein Dielektrikum mit einem höheren Brechungsindex auf die Metalloberfläche gelenkt, so vergrößert sich der Wellenvektor des Lichtes und erreicht die Länge des Plasmonenwellenvektors (Abb. 7.1.2), bzw. die Dispersionsrelation des Lichtes im Prisma die die Dispersionsrelation des Plasmons überschneidet (Abb. 7.1.3). Ist die Metallschicht ausreichend dünn, so setzt sich das elektromagnetische Feld des Plasmons durch das Metall hindurch auf der rückseitigen Grenzfläche fort (Kretschmann Konfiguration [Kre71]). Dort kann das Oberflächenplasmon zur Detektion von molekularen Schichten, die an dieser Metalloberfläche adsorbieren und dadurch den Brechungsindex an der Oberfläche ändern, verwendet werden.

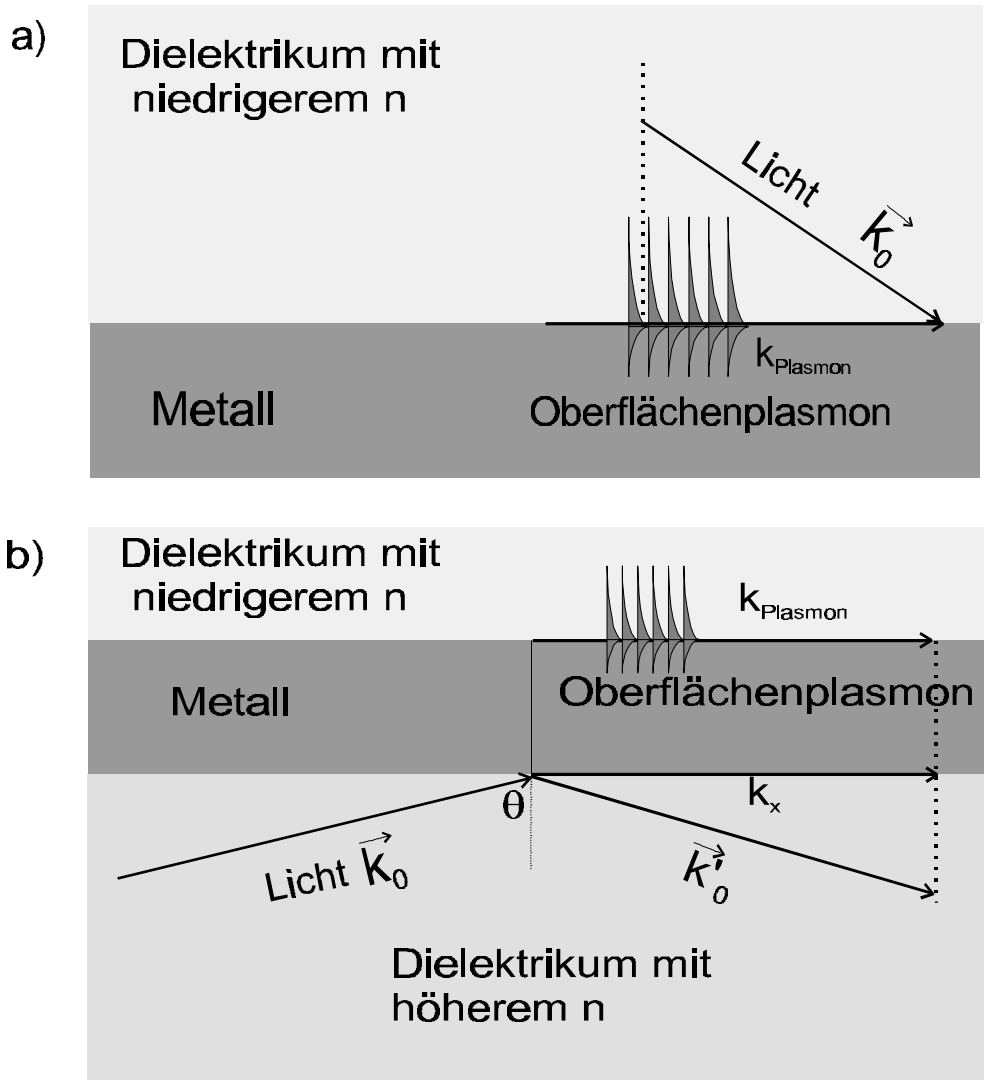


Abb. 7.1.2: Abbildung a) zeigt, daß die Kopplung des Lichtwellenvektors nicht erfolgt, wenn ein Lichtstrahl auf eine Metalloberfläche fällt, unabhängig vom Einfallswinkel, da  $\vec{k}_{\text{Plasmon}}$  immer größer bleibt als die Projektion des Wellenvektors des Lichtes ( $\vec{k}_0$ ) im Dielektrikum. b) zeigt eine Möglichkeit, Licht in ein Oberflächenplasmon zu koppeln: Die Verstärkung des Wellenvektors der einfallenden Strahlung durch Verwendung eines hochbrechenden Mediums, wodurch die  $k_x$  Komponente des Wellenvektors des Lichtes in ihren Eigenschaften an  $\vec{k}_{\text{Plasmon}}$  angeglichen wird.

Die Reflektivität an einem Multischichtsystem kann unter Berücksichtigung der Stetigkeitsbedingungen des elektrischen und magnetischen Feldes an dieser Grenzfläche aus den Fresnelschen Gleichungen abgeleitet werden [Bor59].

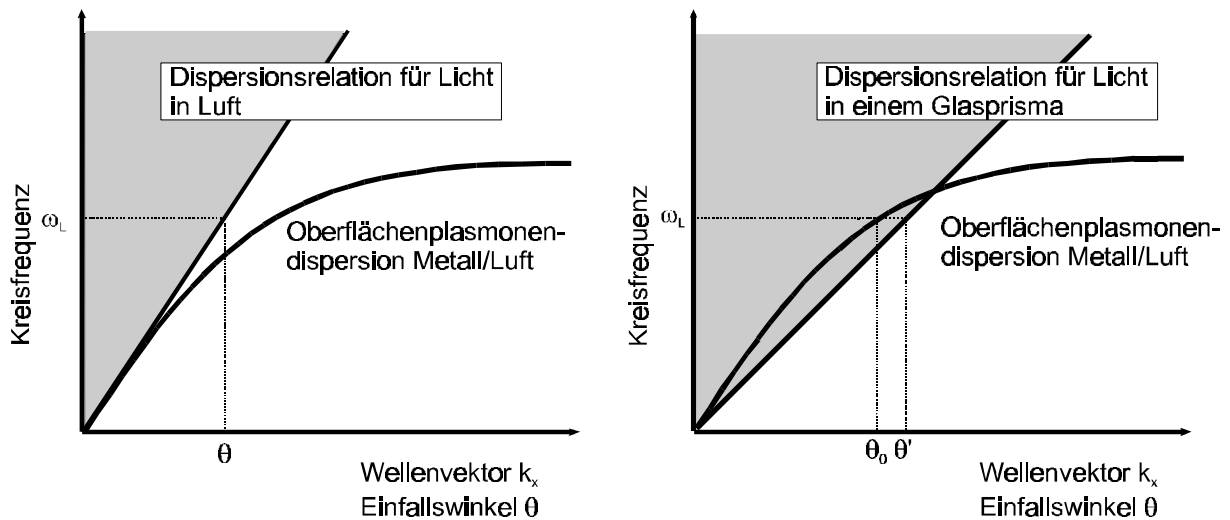


Abb. 7.1.3: Dispersionsdiagramme, a) für Dispersionsrelationen für Oberflächenplasmonen und für Licht im Vakuum, b) mit Prismenkopplung: unter einem bestimmten Einfallswinkel kann bei gegebener Frequenz  $\omega_L$  die resonante Anregung von Plasmonen erfolgen, wenn der Wellenvektor des Lichtes in einem hochbrechenden Prisma in Richtung der Oberfläche vergrößert wird.

Das Laserlicht wird an der Basis des Prismas gemäß den Frenelschen Gleichungen reflektiert und transmittiert. Ab einem kritischen Winkel  $\theta_c$  tritt Totalreflexion ein (Abb. 7.1.1). Im Bereich dieses Winkels kommt es zu einem exponentiellen Abfall des evaneszenten Feldes und ein Plasmon - auch an der dem Prisma abgewandten Seite des Metalls - wird angeregt, wenn die Projektion der Feldvektoren des Lichtes mit denen des Plasmons übereinstimmen.

### 7.1.2 Meßanordnung

Die folgende Abbildung (Abb. 7.1.4) zeigt die Meßanordnung für die Plasmonenspektroskopie, in der die Reflektivität an einem Multischichtsystem für einen bestimmten Winkelbereich bestimmt wird. Der Strahl eines HeNe Lasers ( $\lambda = 633\text{nm}$ ) wird durch einen Frequenzmodulator periodisch moduliert (Frequenz: 1193 Hz). Diese Frequenz wird als Referenzsignal an einen Lock-In Verstärker (EG&G, 5210) gegeben, um Störsignale zu filtern.

Der Lichtstrahl durchläuft zwei Glan-Thompson Polarisatoren (Berliner Glas), von denen ersterer zur Intensitätsregelung dient, der zweite, um die Polarisationsrichtung festzulegen.

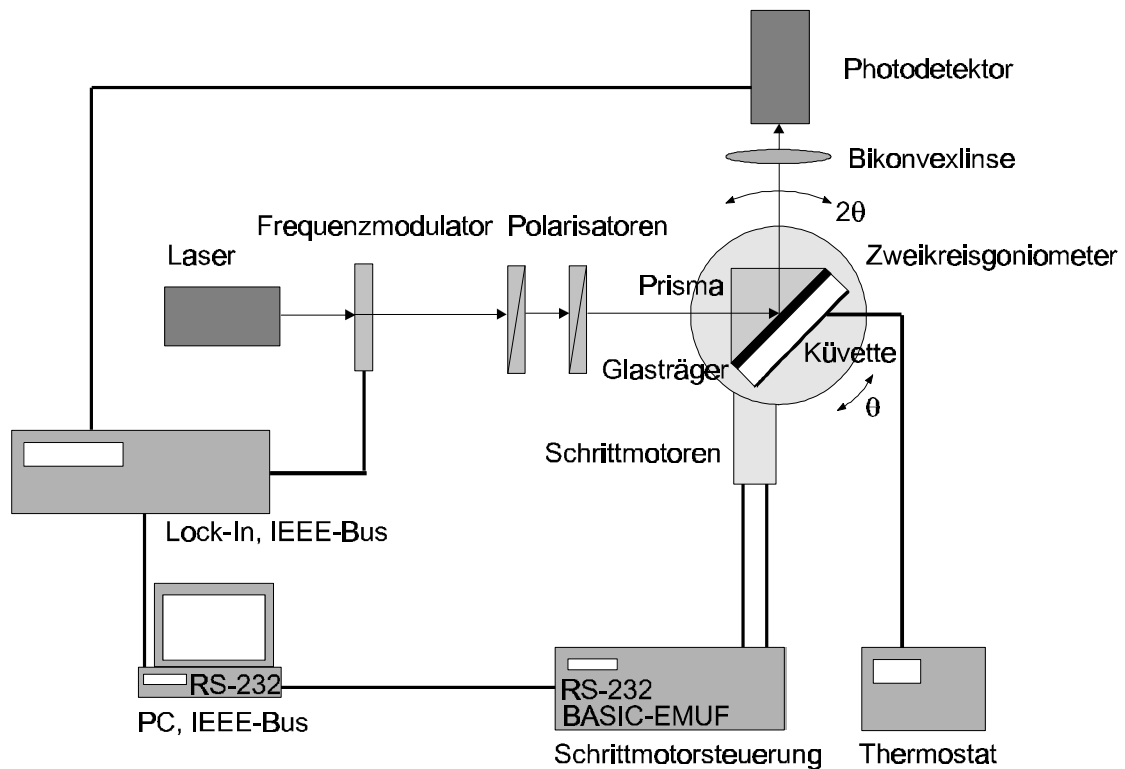


Abb. 7.1.4: Vereinfachte Darstellung des experimentellen Aufbaus.

Anschließend gelangt der Laserstrahl in ein  $90^\circ$  Prisma (es wurde ausschließlich ein hochbrechendes, metallhaltiges LaSFN9 Glas verwendet (Fa. Berliner Glas, Hamburg), welches mit Immersionsöl ( $n = 1,680$ ) an einen LaSFN9 Glasträger optisch gekoppelt ist.

Auf der Rückseite des Glasträgers befindet sich die aufgedampfte Goldschicht ( $d = 50\text{nm}$ ) an deren Oberfläche die Plasmonen angeregt werden und an der sich aus einer Pufferlösung geeignete Moleküle anlagern können. Das Prisma/Glasträger/Küvetten-System ist auf einem Zweikreis-Goniometer (Fa.Huber) montiert, dieses wird über zwei Schrittmotoren mit einer Winkelauflösung von  $1/1000^\circ$  im  $\theta / 2\theta$ -Modus ( $\theta$  : Probenmotor;  $2\theta$  : Detektormotor) angesteuert.

Der reflektierte Anteil des Lichtes wird durch eine Bikonvexlinse ( $f = 100\text{mm}$ ) auf eine Si-Photodiode fokussiert, deren Ausgangsspannung der reflektierten Lichtintensität proportional ist.

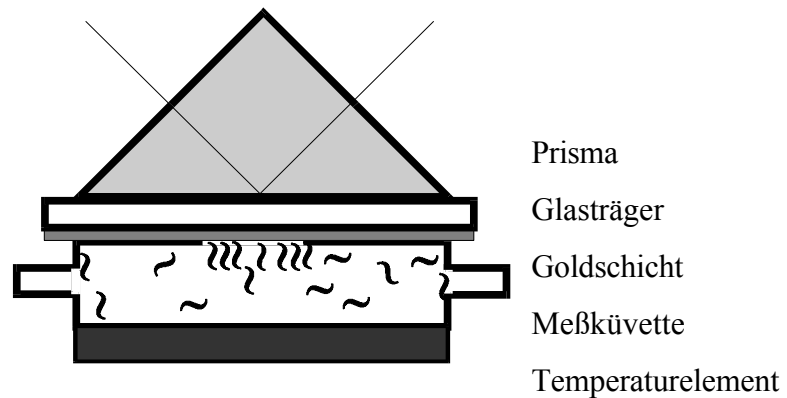


Abb. 7.1.5: Modifizierte Kretschmann-Anordnung. Glasprisma mit Strahlengang des Laserlichtes. An dem mit Gold bedampften Glasträger ist die Anlagerung einer Schicht aus einer Lösung heraus modellhaft dargestellt.

Eine temperierbare Messingküvette, montiert an der Rückseite der Meßküvette, vermeidet Brechungsindexänderungen durch Temperaturschwankungen.

Die Steuerungssoftware besteht aus einem Windows-Meßprogramm zur Datenaufnahme, entwickelt von Andreas Scheller, EDV-Abteilung MPIP. Der Computer ist ausgestattet mit einem 486 Prozessor, 8MB Arbeitsspeicher, 420MB Festplatte und einer IEEE Karte (Keithley).

Die Auswertung erfolgt in einer Anpassungsrechnung (EDV-Abteilung MPIP), basierend auf dem Transfer-Matrix-Algorithmus, wobei an die Meßkurve eine berechnete Kurve optisch angeglichen wird, deren Parameter gespeichert werden. Die graphische Aufarbeitung erfolgt mittels einer Windows-Datenanalyse-Software (Origin 4.1, bzw. 5.0).

### 7.1.3 Einfluß von ultradünnen Schichten auf die Dispersion von Plasmonen

Werden von der Metalloberfläche (in der Regel höherbrechende) Moleküle aus der Umgebung adsorbiert, bewirken diese eine Verschiebung des resonanten Einfallswinkels (Abb. 7.1.6). Ursache hierfür ist der Einfluß dieser Schicht auf die Feldverteilung an der Metallgrenzfläche [Vei95]. Der durchschnittliche Brechungsindex des Dielektrikums, der in der Wechselwirkungszone des Plasmonenfeldes 'gesehen' wird, hat sich durch diese Schicht erhöht.

Gemessene Resonanzkurven können quantitativ mit Hilfe des Transfer-Matrix Algorithmus [Vei95] ausgewertet werden. Dabei ist zu beachten, daß weder der Brechungsindex noch die Schichtdicke der adsorbierten Schicht bekannt sind, so daß der Wert für einen dieser Parameter nur unter der Kenntnis des Wertes für den zweiten

Parameters bestimmt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Brechungsindex für die Thiopeptidschicht ermittelt (s. Kap. 2.2.1), für Lipid/Proteinschichten wird ein Brechungsindex von  $n=1,5$  angenommen [Ulm91]. Werden mehrere Schichten aufgebracht, muß die Probe vor und nach jeder Modifizierung vermessen werden, so daß die Parameter der vorangehenden Schicht vor der Messung der nächsten Schicht bekannt sind. Eine möglicherweise auftretende Vergrößerung der Halbwertsbreite einer Resonanzkurve deutet auf eine Zunahme der Oberflächenrauheit hin. Die Verschiebung des Resonanzwinkels kann dann durch Variation der geometrischen Dicke und des Brechungsindex dieser Schicht in der Anpassungsrechnung beschrieben werden, während die entsprechenden Werte der bereits vorher gemessenen Schicht konstant gehalten werden. Auftretende Streuverluste zeigen sich durch eine Verschiebung des Reflexionsminimums zu höheren Reflektivitäten, verglichen mit dem Ergebnis der Anpassungsrechnung.

Die hauptsächliche Fehlerquelle bei dieser Methode ist die Referenzmessung. Sind zum Zeitpunkt der Messung bereits Verunreinigungen an der Substratoberfläche adsorbiert, so sind die aus der Messung hervorgehenden Parameter für die Goldschicht unsicher. Dieser Fehler wurde untersucht, indem ein Goldsubstrat in mehreren Zeitintervallen gegen die Raumluft vermessen wurde, bzw. mehrere Substrate miteinander verglichen wurden. Verglichen mit den Schichtdicken, die in dieser Arbeit diskutiert werden, ist der Fehler vernachlässigbar.

#### 7.1.4 Kinetik-Messungen

Ein großer Vorteil der Plasmonenspektroskopie gegenüber anderen spektroskopischen Methoden ist die zeitabhängige Untersuchung von Adsorptionsprozessen, die *in situ* an einer fest/flüssig Grenzfläche durchgeführt werden kann. Dazu wird ein fester Winkel im linearen Steigungsbereich der Resonanzkurve ausgewählt und dort die reflektierte Intensität als Funktion der Zeit während der chemischen Reaktion gemessen. (Abb. 7.1.6). Da im linearen Steigungsbereich ein proportionaler Zusammenhang zwischen Reflektivitätssteigerung und Dickenzunahme der absorbierenden Schicht besteht, kann aus der Zunahme der Reflektivität die Schichtdicke berechnet werden.

Die Adsorptionskinetiken biologischer Moleküle können in einer hohen Zeitaufösung nahezu in Echtzeit gemessen werden.



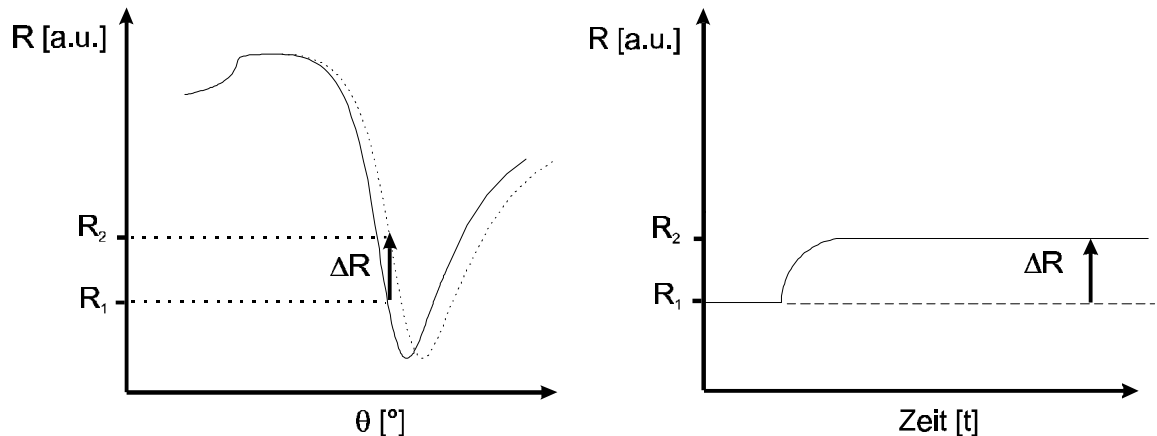


Abb. 7.1.6: Schematische Darstellung kinetischer Messungen: a) Reflexionsspektren vor und nach der Adsorption einer Monolage, b) Kinetikmessung der Adsorption bei konstantem Winkel  $q$  [Spi93a,b]

### 7.1.5 Substratpräparation

Für optische Messungen wurden beidseitig polierte LaSFN9-Glasträger (Berliner Glas AG) mit dem Brechungsindex  $n = 1,855$  verwendet. Die Planität der Oberfläche betrug auf 50mm (Länge des Substrates)  $5\lambda$ . Verändert wurde jedoch die Vorschrift für die Reinigung bereits verwendeter Gläser. Dabei wurden Goldreste von der Oberfläche mit einer stark oxidierenden Jodlösung entfernt (20g Jod 80g Kaliumjodid in 1l  $H_2O$ ). Dazu wurden die Glasträger in der Jodlösung für 5min mit Ultraschall behandelt und mit Wasser gespült. Anschließend wurde mit 2% Hellmanex (Fa. Hellma) Lösung gespült und beschallt. Entgegen der Herstellerangabe der Firma Helma, die MQ-Wasser vorsieht, wurde das Detergenz mit Leitungswasser entfernt, da mit MQ-Wasser Detergenzreste auf der Glasoberfläche zurückzubleiben scheinen. Der übrige Reinigungsprozeß, der für die Reproduzierbarkeit anschließender Präparationen maßgeblich ist, wurde ausführlich in den Arbeiten von Spinke, J. [Spi92] bzw. Lawall [Law92] beschrieben.

### 7.1.6 Theoretische Grundlagen

Durch die resonante Einkopplung des einfallenden Lichtes mit der Intensität  $E_i^2$  ergibt sich im Bereich des Reflektivitätsminimums eine Verstärkung der Feldintensität  $E_s^2$  an der Metalloberfläche. Der Betrag dieser Feldverstärkung ist von den dielektrischen Eigenschaften des Metalls abhängig, insbesondere von seinen Dämpfungseigenschaften. Aufgrund dieser Verstärkung des evaneszenten Feldes wird mit der Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie eine oberflächensensitive Methode

etabliert, welche nur die an der Oberfläche adsorbierten Farbstoffmoleküle aktiviert. Gegenüber der reinen Oberflächenplasmonenspektroskopie ist die Sensitivität der Erkennung von gebundenen Molekülen an der Oberfläche um mindestens zwei Größenordnungen gesteigert.

Um eine Abschwächung der emittierten Fluoreszenz durch den Effekt des Förstertransfers zu verhindern, muß jedoch ein bestimmter Abstand ( $\geq 5nm$ ) von der Metalloberfläche eingehalten werden. Dieses wird durch die Verwendung des Thiopeptid/Lipid-Systems erreicht, welches einen ausreichenden Abstand anbindender Fluorophore zu der Metalloberfläche gewährleistet.

### 7.1.7 Meßanordnung

Zur Messung der Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie wird im wesentlichen der Meßaufbau verwendet, der bereits für die reine Oberflächenplasmonenmessung beschrieben wurde.

Zusätzlich befindet sich an der Rückseite des Prisma/Glasträger/Küvetten-Systems ein Interferenzfilter (LOT 670nm, 10nm FWHM), der die zu erwartenden Wellenlänge der emittierten Fluoreszenz selektiert. Diese Fluoreszenz wird von einem Photomultiplier (Hamamatsu) als Anzahl auftreffender Photonen pro Sekunde gemessen. Das Signal des Photomultipliers wird von einer Zählinheit (HP 5335A) quantifiziert.

## 7.2 Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie ist besonders geeignet um die elektrischen Eigenschaften komplexer Systeme zu bestimmen. In vielerlei Hinsicht ist die Impedanzspektroskopie die Methode der Wahl, wenn es sich um die Charakterisierung von Materialien handelt, deren elektrische Eigenschaften sich aus einer Vielzahl gekoppelter Prozesse zusammensetzen, von denen jeder mit einer eigenen Zeitkonstante abläuft [Mac87].

Zusätzlich ist die Impedanzspektroskopie eine sehr empfindliche Methode, um Veränderungen der Ionenpermeabilität an Schichtsystemen zu messen. Insofern ist diese Meßmethode für die Charakterisierung von Ionentransportvorgängen in Lipiddoppelschichten besonders gut geeignet.

### 7.2.1 Theoretische Grundlagen

Wird an eine Schicht eine sinusförmige Wechselspannung mit der Frequenz  $\omega$  angelegt, so ergibt sich ein komplexer, frequenzabhängiger Wechselstromwiderstand: die Impedanz. Die phasenverschobene Stromantwort setzt sich aus den verschiedenen Zeitkonstanten zusammen, mit denen die gestörten Gleichgewichtszustände eines komplexen Systems in ein neues Gleichgewicht relaxieren.

Definiert wird die Impedanz ( $Z(\omega)$ ) als ein Vektor mit Richtung und Größe:

$$Z(\omega) = \frac{v_0 \sin(\omega t + \varphi)}{i_0 \sin \omega t}$$

dabei ist  $v_0$  die Amplitude der Spannung,  $\varphi$  und  $i_0$  ist die Phasenverschiebung und die Amplitude des resultierenden Antwortstromes. Im kartesischen Koordinatensystem dargestellt, entspricht  $Z(\omega)$ :

$$Z(\omega) = \text{Re}Z + j\text{Im}Z, \text{ (mit } j^2 = -1)$$

$\text{Re}Z$  und  $\text{Im}Z$  geben dabei den realen bzw. imaginären Anteil der komplexen Größe der Impedanz wieder. Den Zusammenhang zwischen diesen Größen gibt folgende Gleichung wieder:

$$|Z|^2 = (\text{Re}Z)^2 + (\text{Im}Z)^2$$

Dargestellt werden die gewonnenen Impedanzspektren in einem Bode-Graph in dem  $\log(|Z(\omega)|)$  und  $\varphi(\omega)$  über  $\log(\omega)$  aufgetragen werden, oder in einem Nyquist-Graph (auch als Ortskurven bezeichnet) mit  $-\text{Im}(Z(\omega))$  über  $\text{Re}(Z(\omega))$ .

### 7.2.2 Impedanzmeßzelle

Die elektrochemische Meßzelle wird als Querschnitt in Abb. 7.2.1 gezeigt. Die Zelle besteht aus einem Plexiglaskörper in die ein Teflonzylinder eingesetzt wird, der den Meßraum bildet. Das Puffervolumen der Meßzelle, umgeben von diesem Teflonblock beträgt  $800\mu\text{l}$ . Der Elektrodendurchmesser wird durch eine kreisförmige Öffnung des Teflonzylinders begrenzt. Durch die angesetzte Dichtlippe wird zur Abdichtung kein zusätzlicher O-Ring benötigt. Temperiert wird die Zelle durch eine Küvette, auf deren Oberseite die Elektrode aufliegt (nicht gezeigt). Gemessen wird in einer Drei-Elektroden-Anordnung, mit einer Gegenelektrode aus Platin und einer Referenzelektrode aus  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ,  $3,5\text{M KCl}$ .

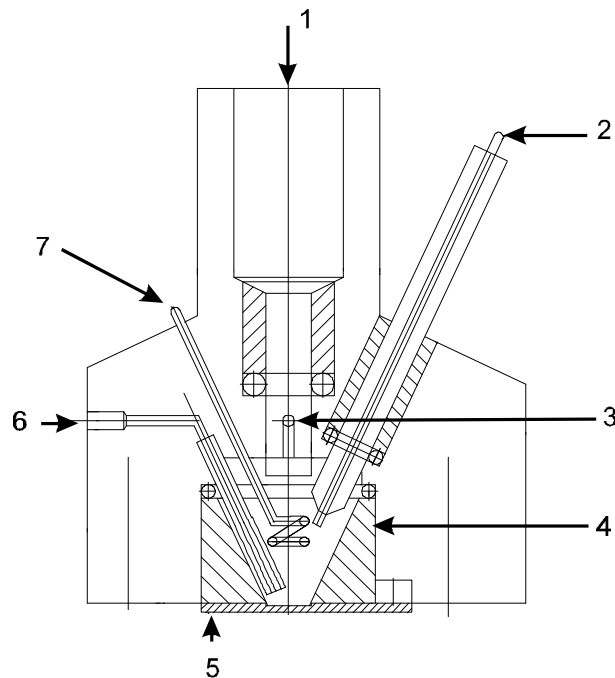


Abb. 7.2.1: Folgende Elemente der Meßzelle sind hervorgehoben: 1: Öffnung für eine Substratzugabe mit einer Mikropipette, 2: Referenzelektrode (Ag/AgCl), 3: Ablauf mit Schlauchanschluß, 4: auswechselbarer Teflonblock mit konus-förmiger Aussparung: Meßraum, 5: Glassubstrat mit Goldelektrode, 6: Zufluß mit Schlauchanschluß, 7: Gegenelektrode aus Platindraht

Jedes Elektroden-Material System in einer Meßzelle verfügt über eine geometrische Kapazität und dazu - in Parallelschaltung - einem Materialwiderstand. Diese Elemente führen zu der Zeitkonstante  $\tau = R \cdot C$ , der dielektrischen Relaxationszeit der Zelle. Ein wichtiger Punkt bei der Konstruktion einer Meßzelle ist, den Einfluß der Elektroden bzw. ihrer Geometrie auf das Meßergebnis zu minimieren.

### 7.2.3 Interpretation der Meßergebnisse

Die gemessenen Daten werden mit Schaltkreisen gefittet, deren Schaltkreiselemente die möglichen physikalischen Prozesse des jeweiligen Experimentes repräsentieren. Jedoch ist Vorsicht geboten bei der Verwendung von idealen Schaltkreisen zur Beschreibung eines realen Systems: Ein reales System entspricht seinem entsprechenden idealen Pendant bestenfalls in einem begrenzten Frequenzbereich. Beschrieben werden diese realen Elemente jedoch mit Schaltkreiselementen, wie idealen Widerständen, idealen Kapazitäten bzw. idealen induktiven Elementen.

Aufgrund der realen Eigenschaften eines Systems kann seine Impedanz mit einer endlichen Anzahl von Schaltkreiselementen nicht exakt berechnet werden, sondern nur in ihrer Tendenz beschrieben werden. Vergleiche mit Messungen, die auf anderen Methoden basieren, sind bei der Auswahl der entsprechenden Schaltkreiselemente oft hilfreich. Zwei häufig verwendete Schaltkreise werden vorgestellt und die entsprechenden Ortskurven gezeigt:

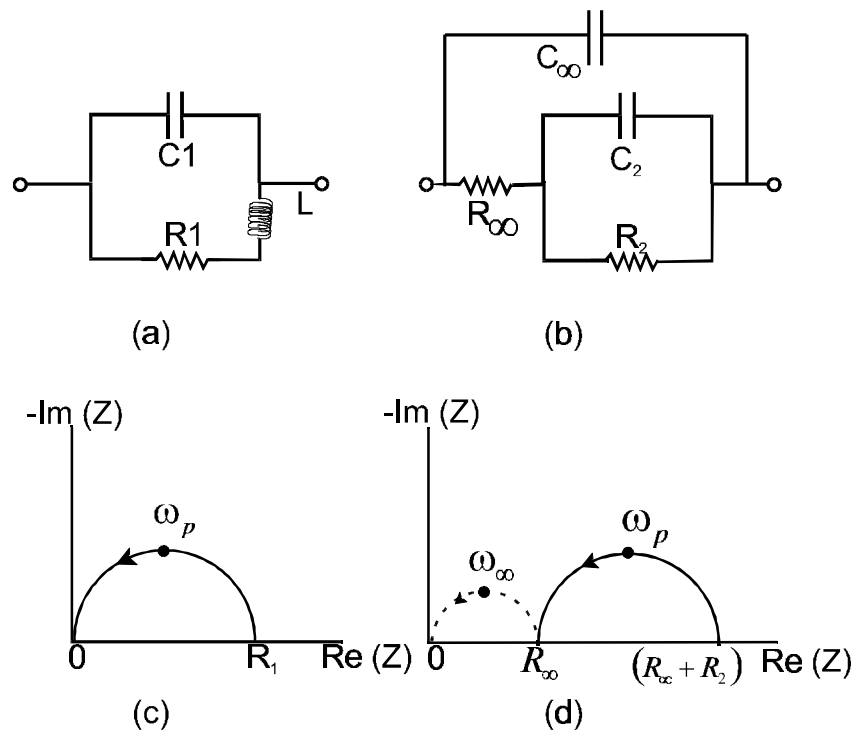


Abb. 7.2.2: Figuren a) und b) zeigen zwei oft verwendete RC Schaltkreise. c) und d) zeigen die entsprechenden Nyquist-Graphen (Ortskurven), in denen die Richtung zu höheren Frequenzen durch Pfeilspitzen markiert ist.

Abb. 7.2.2 a) zeigt die Grundausstattung eines Schaltkreises, dabei wird das induktive Element  $L$  aufgrund seines geringen Einflusses in allen folgenden Messungen vernachlässigt. Abb. 7.2.2 b) zeigt die Erweiterung des Schaltkreises um ein RC Glied, welches eine zusätzliche Impedanz ergibt.

Die experimentellen Daten zeigen zumeist keinen idealen Halbkreis. Drei besonders häufig auftretende Abweichungen der Kurvenform vom Idealfall lassen sich aufzählen:

1. Die Ortskurven beginnen nicht im Ursprung, die Erklärung dafür ist, daß bei höheren Frequenzen weitere Kurven entstehen.
2. Das Zentrum der Kurve liegt unter der Achse, sobald es sich um eine sehr inhomogenen Schicht handelt. Insofern ist diese Beobachtung ein wichtiger

Parameter, weil er die Aussage zuläßt, daß sich entweder eine Mischung aus Materialien unterschiedlichster Zeitkonstanten auf der Elektrode befindet oder das Elektrodenmaterial sehr rauh ist. [Don87]

3. Mehrere Kurven können sich überlagern: Wie in Punkt 2. beschrieben, beeinflussen sich die unterschiedlichen Impedanzen eines Materialgemisches gegenseitig. Besonders, wenn deren durchschnittliche Zeitkonstanten weniger als zwei Größenordnungen voneinander entfernt sind.

Der Widerstand  $R$  eines Materials bestimmt den Durchmesser der Ortskurve (s. Beispiel in Abb. 7.2.2 a)). Ebenso kann der Widerstand und die Kapazität ermittelt werden, wenn der Realteil der Impedanz gegen die Kreisfrequenz aufgetragen wird (Bode-Plot) und mit der entsprechenden Funktion angefittet wird:

$$\operatorname{Re}(Z) = \frac{R}{1 + (\omega\tau)^2}$$

wobei  $\tau$  der Relaxationszeit des Schaltkreises  $R \cdot C$  entspricht. Mit diesem einfachen Modell können die Meßdaten nur sehr unzureichend angefittet werden. Deshalb wird ein ‘distributed impedance element’ (CPE) anstelle des kapazitiven Elementes eingeführt [Don87]. Das CPE entspricht weitaus komplexeren Systemen als ein einfaches RC Glied. Eine Parallelanordnung eines Widerstandes und eines CPE wird in folgender Funktion beschrieben [Don87]:

$$\operatorname{Re}(Z) = \frac{R[1 + (\omega\tau)^{1-\alpha} \cos \frac{\pi}{2}(1-\alpha)]}{[1 + (\omega\tau)^{1-\alpha} \cos \frac{\pi}{2}(1-\alpha)]^2 + [(\omega\tau)^{1-\alpha} \sin \frac{\pi}{2}(1-\alpha)]^2}$$

$\alpha$  ist ein phänomenologischer Parameter, der die Verteilung der Relaxationszeiten beschreibt. Für  $\alpha=0$  kann diese Gleichung auf die oben genannte reduziert werden, die einem einfachen RC-Kreis entspricht, in dem das CPE dem Widerstand entspricht.

Für die heterogenen Schichten, die in dieser Arbeit untersucht werden, ist die Verwendung eines CPEs erforderlich. In die Lipiddoppelschichten eingebaute Membranproteine ändern mit ihrer spezifischen Zeitkonstante die Ionenpermeabilität der Membran, womit sie die Impedanz des gesamten Systems entscheidend beeinflussen. Dieser Effekt kann nur mit einem CPE befriedigend angefittet werden.

### 7.2.4 Experimentelle Durchführung

Die Impedanzmessungen werden mit einem 1286 Interface und einem 1260 Frequenzanalysator (Solartron Instruments) durchgeführt. Die Daten werden mit einem 486 Prozessor und blue chip EC Software registriert und ausgewertet. Die Frequenz wird von 30kHz bis 1mHz variiert, die Amplitude beträgt 50mV. Das sogenannte Polarisationspotential (i.e. das bias Potential gegen Ag/AgCl, sat. KCl), das während der Messung an der Goldelektrode konstant gehalten wird, liegt im Bereich von +50 bis -200 mV, je nach Angabe.

Die Goldelektroden werden, wie in Kap. 7.4 beschrieben, elektrothermisch auf Glasträger aufgedampft.

## 7.3 Zyklische Voltammetrie

### 7.3.1 Theoretische Grundlagen

Die zyklische Voltammetrie ist ein elektrochemisches Verfahren zur Untersuchung elektrochemischer Vorgänge redoxaktiver Substanzen in Lösung. Mit dieser Methode kann das Redoxverhalten chemischer Substanzen in einem bestimmten Potentialbereich gemessen werden. Neben der Bestimmung von thermodynamische Oxidations- bzw. Reduktionspotentialen können elektrochemische Reaktionsmechanismen und Kinetiken von heterogenen und homogenen Elektronentransferschritten gemessen werden. Ein zyklisches Voltammogramm stellt die Stromantwort der Arbeitselektrode auf das angelegte Anregungspotential dar.

Die Meßanordnung ist schematisch in Abb. 7.3.1 dargestellt. Sie besteht aus einer Dreielektrodenanordnung von Arbeitselektrode, AE (Material: Au), Gegenelektrode, GE (Material Pt) und einer Referenzelektrode, RE (Material: Ag/AgCl). Diese drei Elektroden sind in einer Meßzelle, gefüllt mit einem Elektrolyten, angeordnet. Als elektrochemische Sonde wurde  $K_3Fe(CN)_6$  gewählt, welches ein reversibles Einelektronen - Redoxpaar darstellt.

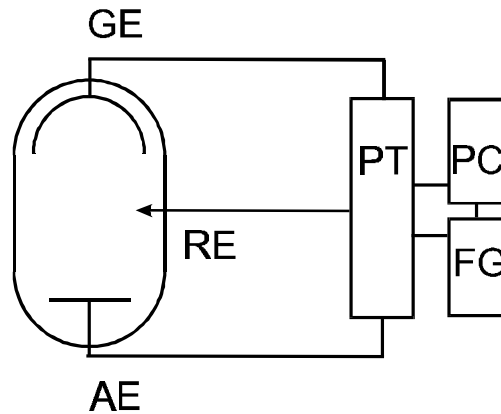


Abb. 7.3.1: Meßanordnung für die zyklische Voltammetrie, FG: Funktionsgenerator, PT: Potentiostat, PC: Computer, RE: Referenzelektrode, GE: Gegenelektrode, AE: Arbeitselektrode

Der Arbeitselektrode wird ein linear mit der Zeit sich änderndes Potential  $E_{(t)}$  aufgeprägt, das nach Erreichen eines Umkehrpotentials  $E_u$  wieder auf den Anfangswert  $E_{(i)}$  zurückgeführt wird Abb. 7.3.2.

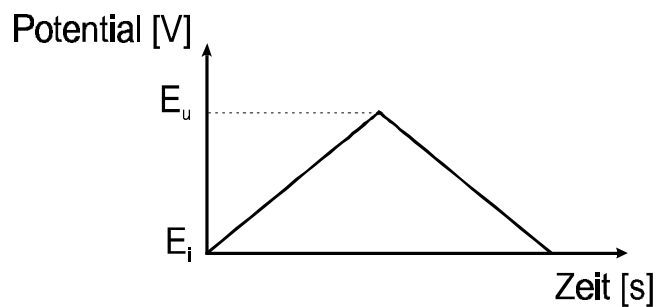


Abb. 7.3.2: Verlauf des angelegten Potentials, wie es vom Funktionsgenerator erzeugt wird

Das zyklische Voltammogramm einer elektrochemisch aktiven Substanz, wie  $K_3Fe(CN)_6$ , wird in Abb. 7.3.2 dargestellt. Der Strom an der Arbeitselektrode steigt an, sobald das angelegte Potential in die Nähe des Redoxpotentials kommt. In der Nähe des Oxidationspotentials  $E_{1/2}$  beginnt ein faradayscher Stromfluß (Elektronenübertragung Elektrode/Substrat), der zunächst als Funktion des angelegten Potentials anwächst. Dabei verstärkt sich jedoch der Konzentrationsgradient von reduzierten zu oxidierten Molekülen an der Oberfläche der Elektrode. Nach Überschreiten eines kritischen Potentials, dem Spitzenpotential, sinkt die Konzentration der elektroaktiven Moleküle an der Elektrodenoberfläche durch den erhöhten Umsatz ab. Der aufgezeichnete Strom fällt ab, da die unmittelbare Umgebung der Elektrode an elektroaktiven Molekülen verarmt,



bis schließlich ein konstanter Grenzstrom erreicht wird. Dieser resultiert aus dem diffusionskontrollierten Massentransport. Wird das Potential in entgegengesetzter Richtung verändert, wird das an der Elektrode reduzierte Redoxpaar zurückoxidiert. Für diesen Vorgang gelten sinngemäß die gleichen Überlegungen.

Aufgrund der Überlagerung der Stromspannungskurven für die oxidierte und reduzierte Form des Substrates sind die Spitzenpotentiale für die Oxidation ( $E_{pa}$ ) und die Reduktion ( $E_{pc}$ ) auf charakteristische Weise zueinander verschoben.

Zur Auswertung der gemessenen Voltammogramme dienen die Spitzenpotentiale  $E_{pc}$  und  $E_{pa}$ , sowie die zugehörigen Stromwerte  $i_{pc}$  und  $i_{pa}$ . Aus der Distanz der Spitzenpotentiale  $\Delta E_p$  ergibt sich der Wert für  $E_{1/2}$ . Es entspricht dem Redoxpotential  $E^\circ$ , wenn der elektrochemische Vorgang nicht kinetisch gehemmt ist. In diesem Fall spricht man von einem reversiblen elektrochemischen Vorgang.

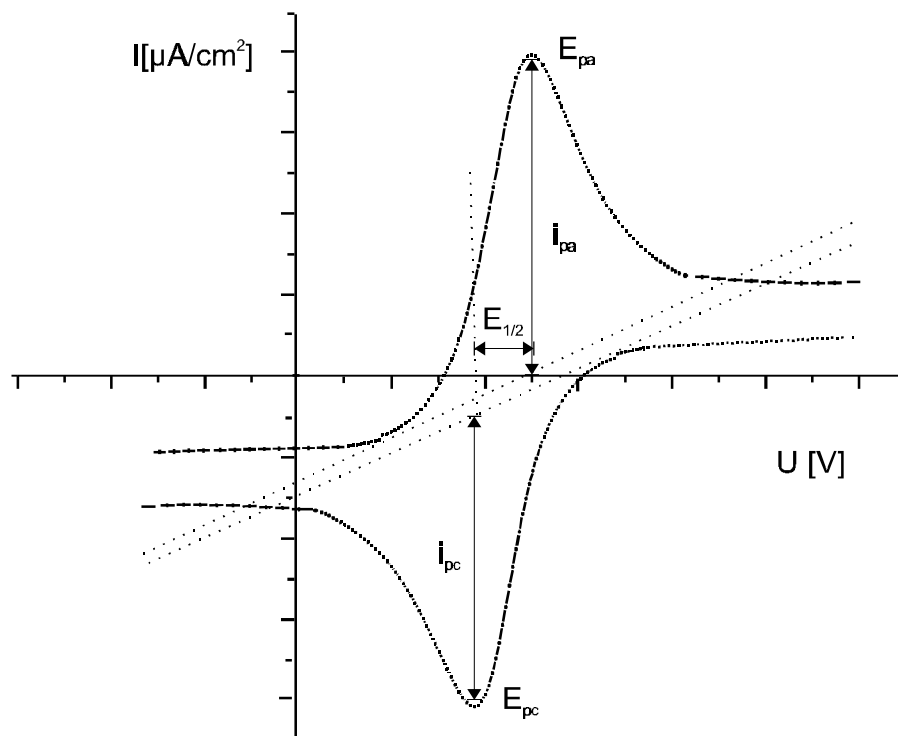


Abb. 7.3.3: Zyklisches Voltammogramm bei (reversiblen) Ladungstransfer,  $E^\circ$ =Standardpotential,  $E_{1/2}$ : Redoxpotential,  $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$ :Spitzenpotentiale, 'anodic bzw. cathodic',  $i_{pa}$ ,  $i_{pc}$ , Strom, 'anodic bzw. cathodic'.

Befindet sich eine dielektrische Schicht auf der Goldelektrode, wird der Zutritt der redoxaktiven Substanz zur Elektrodenoberfläche gehemmt. Dadurch verändert sich das zyklische Voltammogramm in charakteristischer Weise:  $\Delta E_p$  wird größer und  $i_{pc}$  und  $i_{pa}$  werden kleiner. Ist die Goldoberfläche vollständig bedeckt, ist der Elektronentransfer

blockiert und es kann kein faradayscher Strom mehr gemessen werden. Auf diese Weise dient die CV als Methode zur Abschätzung des Bedeckungsgrades der Goldschicht.

### 7.3.2 Experimentelle Durchführung

Als Arbeitselektrode dient eine 50nm dicke Goldschicht, elektrothermisch aufgedampft auf Objektträger (Marienfeld AG) in dem Format 78 x 25 x 1mm. Die für die Formgebung der Elektroden verwendete Maske wird in Abb. 7.3.4 gezeigt.

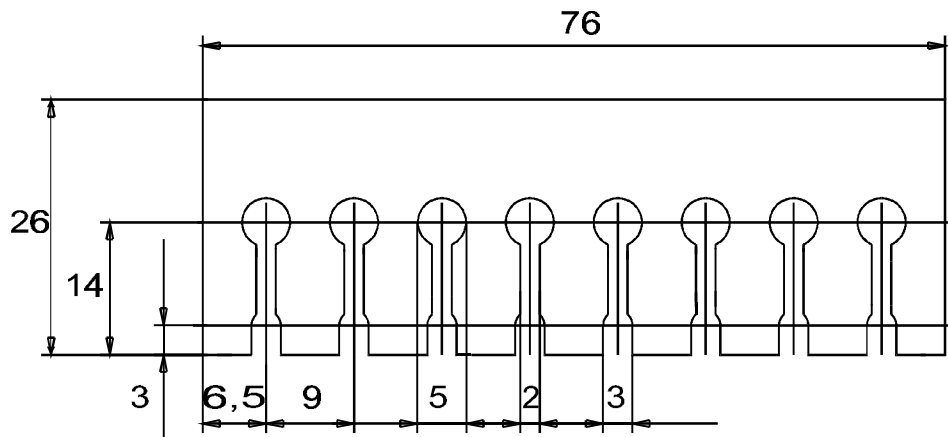


Abb. 7.3.4: Aufdampfmaske, alle Größenangaben sind in mm.

Zur besseren Haftung des Goldes auf der Glasoberfläche wurde eine 5nm dicke Chromunterlage aufgedampft. Die Glasträger wurden, wie in Kap.7.1.5 beschrieben, vor dem Aufdampfprozeß gereinigt.

Die Elektroden sind gemäß der Abb. 7.3.1 in einer Teflonküvette angeordnet. Der Elektrolyt entspricht der in der jeweiligen Versuchsdurchführung verwendeten Pufferlösung. Die  $K_3Fe(CN)_6$  Konzentration entspricht 1mM. Die zyklischen Voltammogramme wurden mit einem Potentiostaten (Autolab, ECO Chemie) mit einer Geschwindigkeit von 0,1V/s gemessen und von einem PC mit GPES3 Software registriert.

## 7.4 Rechteckwellenvoltammetrie (‘Square Wave Voltammetrie’ SWV)

Die Methode der Rechteckwellenvoltammetrie wird für qualitative und quantitative Analysen verwendet. Eine rechteckförmige Wechselfspannung wird auf die sich zeitlich ändernde Spannungsdifferenz zwischen Arbeits- und Referenzelektrode aufmoduliert.

Durch diese Methode wird der durch Ladungstrennung entstehende faradaysche Strom wirkungsvoll vom kapazitiven Strom abgetrennt. Durch die entsprechende Verstärkung kann man den Ladungstransfer empfindlich und durch die hohe Frequenz des Wechselstromes sehr schnell messen.

## 7.5 Die Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (*'atomic force microscopy'*) ist eine Methode zur Analyse der Oberflächentopographie. In molekularer Auflösung können Oberflächenstrukturen abgebildet werden, Materialien werden weitgehend unabhängig von ihren Materialeigenschaften in Luft bzw. wäßriger Lösung abgebildet. Einige wenige Beispiele sind die Untersuchung von magnetischen Festplattenschichten, biologischen Makromolekülen, elektrochemischen Reaktionen *in situ* und kristalline Festkörperoberflächen [Sar91].

Eine Spitze (*'tip'*), bestehend aus Si, SiO<sub>2</sub> oder Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, befestigt an einer Feder (*'cantilever'*) mit kleiner Federkonstante, wird über die Probenoberfläche bewegt. Die zwischen der Spitze und der Probe wirkenden Kräfte sind anziehend oder abstoßend und lenken deshalb die Feder aus. Bewegt wird die Probe durch einen positionssensitiven Scanner, bestehend aus einem piezoelektrischen Kristall.

Man spricht von *'constant force'* bzw. *'height mode'*, wenn die Kräfte zwischen Probe und Spitze durch Nachregulieren in z-Richtung (Abb. 7.5.1) konstant gehalten werden. Werden die auftretenden Kräfte ohne diese Regulation vollständig auf die Spitze übertragen, spricht man vom *'constant'* bzw. *'deflection'* Modus.

1. Es gibt drei prinzipiell verschiedene Methoden die Spitzen/Probenoberfläche Wechselwirkungen in ein möglichst kontraststarkes Bild umzusetzen:
2. *'contact mode'*: während des Scanvorgangs befindet sich die Spitze in Kontakt (Kontakt, definiert als repulsiver Bereich der intermolekularen Kraftkurve) zu der Oberfläche.
3. *'tapping mode'*: die Feder wird in Oszillation versetzt und in der Nähe der Oberfläche positioniert, sodaß sie nur für einen kleinen Bruchteil ihrer Schwingungsperiode mit der Probe in Kontakt kommt. Besonders die in 1. auftretenden Scherkräfte werden weitgehend vermieden. Messungen in wäßriger Umgebung werden im *'tapping mode'* durchgeführt.

4. 'Non-contact mode': Die Feder schwingt über der Oberfläche in einer Distanz, die nicht in Kontakt mit der Oberfläche kommt. Besonders für sehr ebene Proben, die in hoher Auflösung gemessen werden sollen, ist dieser Modus geeignet. Die vertikale Auslenkung wird in einem Computer ausgewertet und in einem - dem Grad der Auslenkung entsprechenden Farbgradient - die Topographie der gescannten Oberfläche abgebildet.

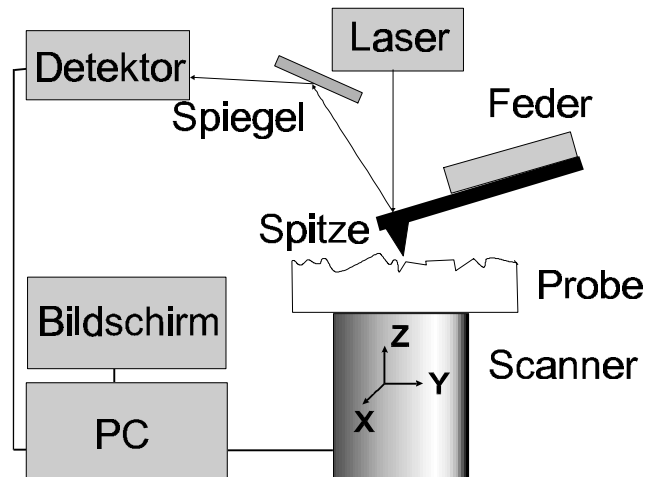


Abb. 7.5.1: Dargestellt ist das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie. Die vertikale Auslenkung der Spitze in z-Richtung durch die Oberfläche, bzw. in x/y-Richtung wird durch den piezoelektrischen Kristall des Scanners kontrolliert. Das von der Spitze reflektierte Licht wird mit einer positionsempfindlichen Photodiode (Detektor) gemessen.

## 8 Diskussion und Ausblick

### **Die Entwicklung von Membranmodellen**

Ziel der Entwicklung von Membranmodellen ist ein besseres Verständnis des Zusammenspiels von Struktur, Dynamik und Funktion biologischer Makromoleküle. Gegenwärtig findet man in den Datenbanken mehrere tausend Strukturdatensätze. Auch die biologische Rolle einer großen Anzahl von Proteinen ist biochemisch charakterisiert. Hingegen gibt es auf die Frage, wie biologische Makromoleküle in lokale und globale Wechselwirkungen involviert sind, bislang keine zufriedenstellende Antwort.

Das Verständnis einzelner dynamischer Prozesse bildet die Grundlage für das Verständnis komplexer Stoffwechselwege. Dem Verständnis der Protein-Umgebungs-Wechselwirkung kommt eine besondere Relevanz zu, da für den technischen Einsatz von Proteinen (z.B. in der Biosensorik oder Katalyse) diese oft in eine artifizielle Umgebung gebracht werden müssen. Die Untersuchung membrangebundener Prozesse ist deshalb auf die Entwicklung von Modellsystemen angewiesen, um die funktionalen Elemente der Membran - die Membranproteine - isoliert betrachten zu können.

### **Die thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht**

Als Membranmodell wird in dieser Arbeit eine thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht verwendet. Entwickelt wurde dieses System, um komplexe, integrale Membranproteine inkorporieren zu können und dabei deren native Konformation und damit ihre Funktionalität zu erhalten. Daraus ergeben sich bestimmte Grundanforderungen an die Architektur des Modellsystems. Eine dieser Anforderungen ist, daß ein Zwischenraum zwischen der planaren Oberfläche und der Lipidschicht eingefügt wird. Dieser Zwischenraum wird durch eine Peptidschicht als 'Abstandhalter' aufrechterhalten - in Anlehnung an das natürliche Zytoskelett einer Zelle. Durch diese Zwischenschicht wird der direkte Kontakt der Proteindomänen, die nicht in die Lipidschicht integriert sind, mit der Oberfläche verhindert. Durch die starken Oberflächenenergien besteht nämlich die Gefahr, daß die Proteine von der Oberfläche adsorbiert werden und ihre native Konformation verändern (denaturieren). Die Peptidschicht, als Basis für die Lipiddoppelschicht, wird durch Inkubation einer Goldoberfläche in einer

thiopeptidhaltigen Lösung gebildet. Die Moleküle ordnen sich auf der Oberfläche zu einer Schicht an.

Die Aminosäuresequenz, die den verwendeten Thiopeptiden zugrunde liegt, ist aus der Literatur als eine helixbildende Sequenz bekannt. Diese Konformation soll die Thiopeptide, durch Bildung supramolekularer Strukturen, zu einer dichten Packung auf der Oberfläche befähigen. Kraftmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß die Peptidmoleküle keine kristalline Anordnung bilden. Aufgrund der Unlöslichkeit fast aller verwendeten Sequenzen in nahezu allen Lösungsmitteln wird die Entwicklung zu anderen als der bisher verwendeten Sequenz gehen. Dabei wären - in Anlehnung an die Natur - besonders zuckerhaltige Derivate interessant, die einen höheren Grad an Hydrophilie aufweisen. Kombiniert mit den im folgenden beschriebenen Eigenschaften der hier verwendeten Peptidsequenzen, könnten sich ideale Eigenschaften für die Verwendung in einem Membranmodell ergeben.

Verschiedene Aminosäuresequenzen werden auf ihre schichtbildenden Eigenschaften getestet. Bedingt durch die Thiolgruppe, deren starke Wechselwirkung mit Gold seit langem bekannt ist, und die hohe Mobilität der kurzem Peptidmoleküle bilden alle untersuchten Sequenzen eine Schicht, deren Ausmaß den berechneten Dimensionen entspricht. Untersuchungen mit der Kraftmikroskopie ergeben eine Passivierung der Oberfläche durch die Thiopeptidschicht, die die Oberfläche vor unspezifischen Belegungen schützt. Dieses ist eine wichtige Bedingung für die Lagerfähigkeit bereits präparierter Substrate. Weitere Vorteile bei der Verwendung von Thiopeptiden ergeben sich im Vergleich zu alternativ verwendeten Polymeren in bezug auf die Reproduzierbarkeit, Stabilität und Handhabbarkeit der Thiopeptidschicht.

Durch Vesikelfusion auf der thiopeptidunterstützten Lipidmonoschicht bildet sich spontan eine Lipiddoppelschicht, vorausgesetzt, die Phasenübergangstemperatur der Lipide wird überschritten. Die Fähigkeit zur 'Selbstheilung' einer Lipidschicht basiert auf ihrer Fluidität und ist ein wichtiges Kriterium für die Verwendbarkeit von Membranmodellen. Inkorporationsexperimente zeigen, daß nachträglich in eine thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht komplexe Proteinmoleküle inkorporieren, was einen Hinweis auf den fluiden Zustand der Lipidmoleküle gibt.

Die elektrischen Eigenschaften des peptidunterstützten Membranmodells entsprechen nicht denen einer natürlichen Lipidmembran, eignen sich jedoch für den Nachweis von enzyminduzierten Effekten. So kann der vektorielle Protonentransport der Cytochrom c

Oxidase und der  $H^+$ ATPase gezeigt werden. Für die Quantifizierung der beobachteten Effekte reicht die elektrische Dichte der Schicht jedoch noch nicht aus. Diese Problematik kann durch die Entwicklung anderer Peptidderivate gelöst werden, die als Unterlage für eine intakte Lipiddoppelschicht geeigneter sind. In einer optimierten Schicht wäre das beobachtete Signal mit der Enzymaktivität korrelierbar. Aus den bereits gemessenen Ergebnissen geht jedoch eindeutig hervor, daß von dem verwendeten System die gewünschte Architektur einer festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht bis zu einem gewissen Grad gebildet wird.

### **Die Inkorporation von Membranproteinen**

Durch die Fusion proteinhaltiger Vesikel mit der thiopeptidunterstützten Lipidmonoschicht, werden die enthaltenen Proteine in die sich bildende Lipiddoppelschicht inkorporiert. Mit dieser Methode wird zunächst die  $H^+$ ATPase, isoliert aus den Thylakoidmembranen des Blattspinats, in das Modellsystem rekonstituiert.

Anhand dieses Beispiels werden verschiedene Experimente durchgeführt, die die Inkorporationsbedingungen von Membranproteinen mit der Methode der Vesikelfusion untersuchen. Die Fusion proteinhaltiger Vesikel führt zu einer Schichtdicke, die auf eine dichte Belegung der Oberfläche mit  $H^+$ ATPase hindeutet. Die Menge an Enzym in der planaren Lipiddoppelschicht kann allerdings nicht durch die Enzymmenge kontrolliert werden, die in der Vesikelpräparation enthalten ist. Aufgrund von sterischen Wechselwirkungen wird der Fusionsprozeß behindert, sobald das Verhältnis zwischen Protein und Lipidanteil der Vesikel zu hoch ist. Sind nur wenige Enzyme in den Vesikeln enthalten, so führt der Fusionsprozeß zu einer Anreicherung der planaren Lipiddoppelschicht mit Enzymen.

Die Aktivität der inkorporierten  $H^+$ ATPase wird elektrochemisch nachgewiesen. Der Entladungsstrom der Protonen an der Goldoberfläche wird in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratmenge gemessen. Die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Startpotential wird in dem System der thiopeptidunterstützten Lipiddoppelschicht bestätigt.

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens wird ebenfalls mit der Methode der Vesikelfusion in das Modellsystem inkorporiert. Der Anteil des Rezeptors an der Lipiddoppelschicht ist (ebenso wie in den  $H^+$ ATPase

Experimenten) hoch. Um eine Aussage über die Orientierung der Rezeptoren in der Lipiddoppelschicht treffen zu können, werden Bindungsstudien mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Die Bindung der monoklonalen Antikörper zeigt, daß zumindest ein Teil der inkorporierten Rezeptoren sich in der gewünschten Orientierung befindet, und zwar mit der ligandenbindenden Domäne auf der zugänglichen Seite. Eine Verstärkung des Bindungssignals wird mit der Plasmonenfluoreszenzspektroskopie erzielt. Das evaneszente Feld erzeugter Plasmonen verstärkt die oberflächennahe Fluoreszenz gebundener sekundärer Antikörper. Die hohe Sensitivität dieser Methode in Kombination mit der Bindung von primärem und sekundärem Antikörper eröffnet zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Sensorik. Gegenüber dem klassischen ELISA wird das Signal durch die Plasmonenanregung zusätzlich verstärkt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß sich die Antikörperbindungen zeitabhängig verfolgen lassen, wodurch der Bindungsvorgang kontrollierbarer wird. Eine Quantifizierung der Proteine in der Lipidschicht mit der Methode der Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie war zum Zeitpunkt der Durchführung noch nicht möglich. Ein interessanter Ansatz wäre an dieser Stelle, einen quantitativen ELISA parallel zu den Fluoreszenznachweisen durchzuführen. Die daraus gewonnenen Daten könnten für die Eichung des Fluoreszenzsignals verwendet werden.

Die Cytochrom C Oxidase aus Rinderherzmitochondrien wird als drittes Beispiel in die thiopeptidunterstützte Modellmembran inkorporiert. Anhand dieses Enzymkomplexes gelingt die Inkorporation auf einem anderen Weg. Alternativ zu der Vesikelfusion enzymhaltiger Vesikel, wird die Cytochrom c Oxidase durch Unterschreiten der kritischen Mizellkonzentration des solubilisierenden Detergenz in die planare Lipidschicht inkorporiert. Diese Methode erspart die Rekonstitution der Proteine in Vesikel, ist jedoch nicht universal auf alle Proteine anwendbar, da die Anforderung an die Stabilität des jeweiligen Proteins sehr hoch sind.

Der spontane Einbau der Cytochrom c Oxidase wird mit der Plasmonenspektroskopie zeitabhängig gemessen. Die resultierende Schichtdicke und die Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zeigt, daß die planare Lipidschicht dicht mit Protein gepackt ist. Weiterführende Experimente mit der Kraftmikroskopie könnten die Packung der Enzyme in der Lipidschicht möglicherweise genauer beschreiben.

Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase wird mit der Methode der Rechteckwellenvoltammetrie und der Impedanzspektroskopie durchgeführt. Durch Substrat-



zugabe werden die inkorporierten Enzyme aktiv und katalysieren den Protonentransfer über die Membran. Dadurch verarmt der Raum zwischen Goldoberfläche und Lipidschicht an Protonen, was in der Rechteckwellenvoltammetrie deutlich sichtbar ist.

Zusätzlich verändert sich der Membranwiderstand, während die Kapazität konstant bleibt, was in der Impedanzspektroskopie deutlich sichtbar ist. Durch die sukzessive Substratzugabe resultiert der Effekt in einer Sättigung. Wird das Substrat entfernt, steigt der Membranwiderstand wieder an, d.h. die Reversibilität der Aktivierung wird in diesem Zusammenhang nachgewiesen, worin ein wichtiges Charakteristikum eines Sensorsystems besteht. Um Rückschlüsse auf die Anzahl der inkorporierten Proteine pro Fläche zu ziehen, müßte die Anzahl transportierter Protonen in Relation zu der bekannten Umsetzungsgeschwindigkeit des jeweiligen Enzyms gesetzt werden. Durch die Defekte in der Membran ist die quantitative Auswertung zunächst nur begrenzt möglich, die erhaltenen Werte entsprechen zumindest in der Größenordnung denen aus der Literatur.

Durch Zugabe von Cyanid wird die Enzymaktivität inhibiert. Cyanid, ein bekannter Inhibitor der Cytochrom c Oxidase, verhindert durch irreversible Bindung die Enzymaktivität. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, daß das verwendete System sensitiv auf Zugabe biologisch aktiver Substanzen reagiert.

In der Funktionalität der inkorporierten Proteine zeigt sich die Biokompatibilität des Schichtsystems. Die Kombination verschiedener Meßmethoden ermöglicht eine umfassende Charakterisierung von oberflächenspezifischen Wechselwirkungen. Dadurch können Substanzen über ihre reine Bindung hinaus auf ihre Wirkung auf die Membranproteine in dem Modellsystem untersucht werden.

## 9 Literatur

- [Abr94] Abrahams J.P., Leslie A.G.W. Lutter R., Walker J.E. (1994) The structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria determined at 2.8Å resolution. *Nature*, 370:621-628]
- [Abr94] Abrahams JP., Leslie AG., Lutter R., Walker JE. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*. 370(6491):621-8
- [Aki92] Akiyama S.K., Yamada S.S., Chen W-T. (1992) Analysis of fibronectin receptor with monoclonal antibodies roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organisation, *J. Cell Biol.* 109:863-875
- [Ako85] Akoev IG., Tyazhelov V.V., Kolomytkin O.V., Alekseev S.I., Grigorev P.A. (1985) Study of the Mechanism of the Effect of Microwaves on Model Membrane Systems, *Izvestiya Akademii Nauk SSSR Seriya Biologicheskaya* (1) : 41-52
- [Alb90] Albelda SM., Buck CA. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules, *Review, Academic] FASEB Journal*, 4(11):2868-80
- [Alb94] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994) *Molecular Biology of the cell*, Garland Publishing, New York
- [Alv92] Alves C A., Smith E L., Porter M D (1992) Atomic Scale Imaging of Alkanethiolate Monolayers at Gold Surfaces with Atomic Force Microscopy, *Journal of the American Chemical Society* 114 (4) 1222-1227.
- [Arn97] Arnold S. Kadenbach B. (1997) Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of Cytochrome c Oxidase, *European Journal of Biochemistry*, 249(1):350-354
- [Arn98] Arnold S. Goglia F. Kadenbach B. (1998) 3,5-Dijodthyronine binds to subunit Va of Cytochrome c Oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP, *European Journal of Biochemistry*, 252(2):325-330
- [Azz81] Azzi A. (1981) Cytochrome c oxidase Some new experiments on its purification, activity and structure, *Dev.Bioenerg. Biomembr.* 5:37
- [Bab92] Babcock G.T., Wikström M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration, *Nature*, 356: 301-309
- [Bai89] Bain C.D., Whitesides G.M. (1989) Modeling organic surfaces with self-assembled monolayers, *Adv. Mater.* 4: 110
- [Bar84] Barnard E.AA. (1984) Structure and properties of the brain GABA/benzodiazepine receptor complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 175:235
- [Boh81] Boheim G., Hanke W., Barrantes F.J., Eibl H., Sakmann B., Fels G., Maelicke A. (1981) Agonist-activated ionic channels in acetylcholine receptor reconstituted into planar lipid bilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:3586-3590
- [Bor59] Born M., Wolf E. (1995) *Principles of Optics*, Pergamon,
- [Bru85] Bruening G. Rommelspacher H. (1985) Solubilization of high-affinity [3H]tryptamine-binding sites from rat brain. *Eur. J. Biochem.* 153:95
- [Bun98] Bunjes N., Schmidt EK., Jonczyk A., Rippmann F., Beyer D., Ringsdorf H., Gräber P., Knoll W., Naumann R. (1997) Thiopeptide Supported Lipid Layers on Solid Substrates, *Langmuir.* 13(23):6188-6194
- [Bur74] Burstein E., Chen Y.J., Chen A., Hartstein J. (1974) *Vac. Sci. Technol.* 11: 1004

- [Bur88] Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C. (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 487-525
- [Bus92] Busk M., Pytela R., Sheppard D. (1992) Characterization of the integrin  $\alpha_5\beta_1$  as a fibronectin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 267:5790-5796
- [Cal91] Calvete J.J., Henschen A., Gonzalez-Rodriguez J. (1991) Assignment of disulphide bonds in human platelet GP3a. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem. J.* 274: 63-71
- [Cal92] Calahan M., Neher E. (1992) Patch clamp techniques: An overview. *Methods in Enzymology*, 207:3
- [Cap92] Capaldi R.A., Aggeler R., Gogol E.P., Wilkens S. (1992) Structure of the Escherichia coli ATP synthase and role of the gamma and epsilon subunits in coupling catalytic site and proton channeling functions, *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 24(5):435-9,
- [Car85] Carrell N.A., Fitzgerald L.A., Steiner B. (1985) Structure of human platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa as determined by electron microscopy, *J. Biol. Chem* 260:1743-1749
- [Cas82] Casey R.P., Ariano B.H., Azzi A. (1982) Studies on the transmembrane orientation of cytochrome c oxidase in phospholipid vesicles, *European Journal of Biochemistry*, 122(2):313-8,
- [Che87] Cheresh D.A., Spiro R.C. (1987) Biosynthetic and functional properties of an arg-gly-asp-directed receptor involved in human melanoma cell adhesion to vitronectin, fibrinogen and von Willebrand factor, *J.Biol.Chem.*, 262:17708-17711
- [Chi92] Chi L.F., Johnston R.R., Ringsdorf H., Kimizuka N., Kunitake T. (1992) Mobile supported monolayers of ionic amphiphiles: Variation of domain morphology via preadsorbed polyelectrolytes, *Langmuir*, 8: 1360
- [Cor86] Coronado R. (1986) Recent Advances in Planar Phospholipid Bilayer Techniques for Monitoring Ion Channels, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 15:259-77
- [Cor97] Cornell B.A., Braach-Maksyvtis V.L.B., King L.G., Osman P.D.J., Raguse B., Wieczorek L., Pace R.J (1997) A biosensor that uses ion-channel switches, *Nature*, 387:580-583
- [Cuk97] Cukierman S., Quigley E.P., Crumrine D.S. (1997) Proton conduction in gramicidin A and in its dioxolane-linked dimer in different lipid bilayers, *Biophysical Journal*, 73(5):2489-502
- [Dan95] Danen E.H., Van Muijen G.N., Ruitter D.J., (1995) Role of integrins as signal transducing cell adhesion molecules in human cutaneous melanoma, *Cancer Surveys*. 24:43-65
- [Del83] Deleage G., Penin F., Godinot C., Gautheron D.C. (1983) Correlation between ATP Hydrolysis, ATP Synthesis, Generation and Utilisation of Delta pH in Mitochondrial ATPase - ATP Synthase, *Biochem. Biophys. Acta*, 725: 464-471
- [Dem84] Demoliou-Mason C.D., Barnard E.A. (1984) Solubilization in high yield of opiod receptors retaining high-affinity d, m and k binding sites, *FEBS Lett.*, 170:378
- [Den93] Denhardt D.T., Guo X. (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.*, 7:1475-1482

- [Dun95] Duncan T.M., Bulygin V.V., Zhou Y., Hutcheon M., Cross R.L. (1995) Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F1.ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:10964-10968
- [Ebl97] Eble J.A. (1997) *Molecular Biology Intelligence: Integrin-Ligand Interaction*, R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA, Springer Verlag, Germany
- [Ele96] Elender G., Kuhner M., Sackmann E. (1996) Functionalisation of Si/SiO<sub>2</sub> and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers, *Biosensors & Bioelectronics*, 11(6-7):565-77
- [Eng86] Engelbrecht S., Lill H., Junge W. (1986) Reconstitution of CF1-depleted thylakoid membranes with complete and fragmented chloroplast ATPase. The role of the delta subunit for proton conduction through CF0. *European Journal of Biochemistry*. 160(3):635-43
- [Era95] Eray M., Dogan N.S., Reiken S.R., Sutisna H., Van Wie B.J., Koch A.R., Moffett D.F., Silber M., Davis W.C. (1995) A Highly Stable and Selective Biosensor Using Modified Nicotinic Acetylcholine Receptor (NACHR), *Biosystems*, 35(2-3):183-188
- [Err78] Errede B., Kamen M.O., Hatefi Y. (1978) Preparation and properties of complex IV (ferrocytochrome c: oxygen oxidoreductase EC 1.9.3.1), *Methods in Enzymology*, 53:40-7
- [Fel86] Fels G., Plümer-Wilk R., Schreiber M., Maelicke A. (1986) A Monoclonal Antibody Interfering with Binding and Response of the Acetylcholine Receptor, *J. Biol. Chem*, 261:15746-15754
- [Fol92] Folkers J.P., Laibinis P.E., Whitesides G. M. (1992) Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Gold: Comparisons of Monolayers Containing Mixtures of Short-and Long-Chain Constituents with CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub>OH Terminal Groups, *Langmuir* 8:1330.
- [Fro88] Fromme P. (1988) *Die ATP-Synthase aus Chloroplasten: Biochemische Untersuchungen zur Struktur und kinetische Messungen zum Mechanismus des Enzyms*, Dissertation, TU Berlin
- [Gai88] Gailit J., Ruoslahti E. (1988) Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations, *J. Biol. Chem.* 263: 12927-12933
- [Gol87] Gogol EP., Lucken U., Capaldi RA. (1987) The stalk connecting the F1 and F0 domains of ATP synthase visualized by electron microscopy of unstained specimens, *FEBS Letters*. 219(2):274-8
- [Ham81] Hamil O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981) Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Arch.* 391:85
- [Häu91] Häußling L. (1991) *Chemisorption von funktionellen und polymeren Amphiphilen*, Dissertation, Universität Mainz
- [Hen89] Henkel T., Mittler S., Pfeiffer W., Rotzer H., Apell H.J., Knoll W. (1989) Lateral order in mixed lipid bilayers and its influence on ion translocation by gramicidin: a model for the structure-function relationship in membranes, *Biochimie*, 71(1):89-98, 1989 Jan.
- [Hey98] Heyse S., Vogel H., Sanger M., Sigrist H. (1998) Covalent attachment of functionalized lipid bilayers to planar waveguides for measuring protein binding to biomimetic membranes, *Protein Science* 4(12):2532-2544.
- [Hia91] Hianik T., Laputkova G., Bajci A., Pavelkova J., Tichonov AN. (1991) The effect of cholesterol on parameters of gramicidin D ion channels and on the

- macroscopic and microscopic characteristics of lipid bilayers, *Ceskoslovenska Fysiologie*, 40(2):113-32
- [Hu95] Hu DD., Hoyer JR., Smith JW. (1995)  $\text{Ca}^{2+}$  suppressed cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *J. Biol.Chem*, 270:9917-9925
- [Huc96] Hucho F., Tselin V.I., Machold J. (1996) The emerging threedimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor, *Eur. J., Biochem.*, 239:539-557
- [Hyn92] Hynes R.O. (1992) Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion, *Cell* 69: 11-25
- [Joh92] Johnston R. (1992) Polymerregulierte Organisation an Grenzflächen, Dissertation, Johannes-Gutenberg Universität Mainz
- [Jos98] Joseph-Silverstein J., Silverstein RL. (1998) Cell adhesion molecules: an overview, *Cancer Investigation*, 16: 176-82
- [Jun89] Junesch J. (1989) Untersuchungen zum Mechanismus der Protonentransportgekoppelten ATP-Synthese/Hydrolyse an der ATPase in Chloroplasten, Dissertation, TU Berlin
- [Jun91] Junesch U., Gräber P. (1991) The rate of ATP-synthesis as a function of delta pH and delta psi catalyzed by the active, reduced  $\text{H}^{(+)}$ -ATPase from chloroplasts, *FEBS Letters*. 294, 275-8
- [Jun97] Junge W. Lill H. Engelbrecht S. (1997) ATP Synthase - an electrochemical Transducer with rotatory mechanics, *Trends in Biochemical Sciences*, 22(11):420-423,
- [Kad86] Kadenbach B., Stroh A., Ungibauer M., Kuhn-Nentwig L., Büge, U. and Jaransch, J. (1986) Isozymes of cytochrome-c oxidase: characterization and isolation from different tissues, *Methods Enzymol.*, 126:32-45
- [Kat95] Katagiri Y., Hiroyama T., Akamatsu N. (1995) Involvement of  $\alpha_v\beta_3$  integrin in mediateing fibrin gel retraction, *J. Biol. Chem*. 270:1785-1790
- [Kat97] Katz B.Z., Yamada K.M. (1997) Integrins in morphogenesis and signaling, *Biochimie*, 79(8): 467-76
- [Kel87] Kelly T., Molony L., Burrige K. (1987) Purification of two smooth muscle glycoproteins related to integrins. Distribution in cultured chicken embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 262:17189-17199
- [Kir90] Kirchhofer D., Gailit J., Ruoslahti E., Grzesiak J., Pierschbacher M.D. (1990) Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa, *J. Biol. Chem* 265: 18525-18530
- [Kir91] Kirchhofer D., Grzesiak J., Pierschbacher M.D. (1991) Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion, *J. Biol. Chem* 266: 4471-4477
- [Kno91] Knoll W. (1991) *MRS Bulletin*, 16: 29-39
- [Kre68] Kretschmann E., Raether H. (1968) *Z.Naturforsch*, 23a: 2135
- [Kre71] Kretschmann E., *Z.Physik* (1971) 216: 389
- [Kuk97] Kukol A. (1997) Elektrostatische Modulierung des Leitwerts und der Dynamik des Acetylcholinrezeptor - Ionenkanals aus *Torpedo californica*, Dissertation, Universität Bielefeld
- [Lan94] Lang, H., Duschl C., Vogel, H., (1994) A new class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold Surfaces, *Langmuir* 10, 197
- [Läu91] Läger P. (1991) *Electrogenic Ion Pumps*, Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA,

- [Läu91] Läger, P, Electrogenic Ion Pumps, Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA, 1991
- [Law92] Lawall, R. (1992) Oberflächenplasmonen-optische Untersuchungen an asymmetrischen Seifenfilmen, Dissertation, Universität Mainz
- [Lil86] Lill H., Engelbrecht S., Schonknecht G., Junge W. (1986) The proton channel, CF<sub>0</sub>, in thylakoid membranes. Only a low proportion of CF<sub>1</sub>-lacking CF<sub>0</sub> is active with a high unit conductance, European Journal of Biochemistry. 160(3):627-34
- [Lil89] Lill H., Junge W.(1989) CF<sub>0</sub>, the proton channel of chloroplast ATP synthase. After removal of CF<sub>1</sub> it appears in two forms with highly different proton conductance. European Journal of Biochemistry. 179(2):459-67
- [Lin97] Lingler, St., Rubinstein, I., Knoll, W., and Offenhäusser, A. (1997) Fusion of Small Unilamellar Lipid Vesicles to Alkanethiol and Thiolipid Self-Assembled Monolayers on Gold, Langmuir, 13 (26), 7085 -7091
- [Lu96] Lu, X.D., Ottova, A.L., Tien, H.T. (1996) Biophysical aspects of agar-gel supported bilayer lipid membranes: A new method for forming and studying planar bilayer lipid membranes, Bioelectrochem. Bioenerget., 39: 285-289
- [Mac87] Macdonald J.R. (1987) Impedance Spectroscopy, Emphasizing Solid Materials and Systems, John Wiley&sons, Inc.USA
- [Mit66] Mitchell P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Physiol. Rev. 41:445-502
- [Mit85] Mitzka- Schnable U. (1985) Carotenogenic enzymes from Neurospora, Pure. Appl. Chem. 57:667
- [Nap98] Napiwotzki J. Kadenbach B. (1998) Extramitochondrial ATP/ADP-Ratios regulate Cytochrome c Oxidase Activity VIa binding to the cytosolic domain of subunit IV, Biological Chemistry, 379(3):335-339
- [Nau95] Naumann R. Jonczyk A. Kopp R. Vanesch J. Ringsdorf H. Knoll W. Gräber P. (1995) Incorporation of membraneproteins in solid-supported lipid layers, Angewandte Chemie, 34(18):2056-2058
- [Nau97] Naumann R., Jonczyk A., Hampel C., Ringsdorf H., Knoll W., Bunjes N., Gräber P. (1997) Coupling of proton translocation through ATPase incorporated into supported lipid bilayers to an electrochemical process, Bioelectrochem. Bioenerget. 42, 241-247
- [Nau98] Naumann, R., Schmidt E.K., Jonczyk J., Fendler K., Kadenbach T., Liebermann T., Offenhäusser A., Knoll W. (1998) The Peptide - Tethered Lipid Membrane as a Biomimetic System to Incorporate Cytochrome c Oxidase in a Functionally Active Form, Biosensors and Bioelectronics, *in press*
- [Neh92] Neher E., Sakman B. (1992) Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp Technik. Spektrum der Wissenschaft 5:42
- [Neu85] Neugebauer J. (1985) A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry, Dissertation, Clarkson University, Potsdam, New York, Calbiochem Biochemicals
- [Neu96] Neumann E., Weber J., Schürholz T. (1996) The initiation of the Muscle Action Potential. Arch. Physiol. Biochem, 104:731-744.
- [Nic85] Nicholls P., Shaughnessy S. (1985) Effects of detergents and cytochrome c binding of scalar and vectorial proton ejection by proteoliposomes containing cytochrome oxidase. Biochem. J., 228:515

- [Nic95] Nicholls, P., Butko, P., Tattre, B. (1995) Topology of cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes: Probes, proteins and pH gradients, *J. Liposome Res.* 5(3), 371-398
- [Noj97] Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K. (1997) Direct observation of the rotation of F-ATPase. *Nature* 386:299-302
- [Par85] Parise L.V., Phillips D.R. (1985) Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex incorporated into phospholipid vesicles; preparation and morphology. *J. Biol. Chem.* 260:1750-1756
- [Poc78] Pockrand I. (1978) *Surf. Sci.* 72: 577
- [Por87] Porter M.D., Bright T.B., Allara D.L., Chidsey C.E.D. (1987) Spontaneously organized molecular assemblies.4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy and electrochemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:3559
- [Rae77] Raether H. (1977) *Physics of Thin Films*, Haas G. Francombe M.H., Hoffmann, R.W. eds., Academic Press, New York, 9, 145
- [Rae88] Raether H. (1988) *Springer Tracts in Modern Physics* 111, Springer Verlag Berlin
- [Ric91] Richard P. (1991) *Membranproteine als Energiekonverter*, Dissertation, TU Berlin
- [Rob90] Roberts G. (1990) *Langmuir-Blodgett Films*, Plenum Press, N.Y.
- [Rot89] Rothe U., Aurich H. (1989) Lipid-coated particles-a new approach to fix membrane-bound enzymes onto carrier surfaces, *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 11(1):18-30
- [Sab96] Sabbert D., Engelbrecht S., Junge W, (1996) Intersubunit rotation in active F-ATPase, *Nature* 381:623-626
- [Sal93] Salamon Z., Hazzard J.T., Tollin G. (1993) Direct measurement of Cyclic Current-Voltage Responses of Integral Membraneprotein at a Self-assembles Lipid-Bilayer-Modified Electrode: Cytochrome f and Cytochrome c Oxidase, *Proc. Natl. Acad Sci*, 90:6420-6423
- [Sal96] Salamon Z., Tollin G. (1996) Surface Plasmon Resonance Studies of Complex Formation Between Cytochrome c and Bovine Cytochrome c Oxidase Incorporated into a Supported Planar Lipid Bilayer. II Binding of Cytochrome c to Oxidase-Containing Cardiolipin/Phosphatidylcholine Membranes, *Biophys. J.* 71:858-867
- [Sal96] Salamon Z., Tollin G. (1996) Surface plasmon resonance studies of complex formation between cytochrome c and bovine cytochrome c oxidase incorporated into a supported planar lipid bilayer. II. Binding of cytochrome c to oxidase-containing cardiolipin/phosphatidylcholine membranes, *Biophys. J.* 71, 858-867
- [Sar91] Sarid D. (1991) *Scanning Force Microscopy*, Oxford University Press New York
- [Sch82] Schlodder E., Gräber P., Witt H.T. (1982) in *Electron Transport and Photophosphorylation*, Barber J., ed.) pp. 105-175 Elsevier, Biomed. Press Amsterdam
- [Sch85] Schmidt, G., Gräber, P. (1985) The rate of ATP synthesis by reconstituted CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 808: 46-51
- [Sch87] Schmidt G., Graeber P. (1987) The rate of ATP Synthesis Catalyzed by Reconstituted CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Liposomes Dependence on Delta pH and Delta PSI. *Biochimica et Biophysica Acta*, 890, 3:392-394.

- [Sch90] Schonknecht G., Althoff G., Junge W. (1990) The electric unit size of thylakoid membranes. *FEBS Letters*. 277(1-2):65-8
- [Sch91] Schneyder B., Mell O., Anthony G., Kadenbach B. (1991) Cross reactivity of monoclonal antibodies and complementary DNA hybridization suggest evolutionary relationships between cytochrome c oxidase subunits VIa and VIc and between VIIa and VIIb, *Europ. J. Biochem.*, 198:85-92
- [Sch94] Schröder B., Reinhardt-Marlicke S., Schrattenholz A., McLanes K. E., Kretschmer A., Conti-Tronconi B.M., Maelicke A. (1994) Monoclonal Antibodies FK1 and WF6 Define Two Neighboring Ligand Binding Sites on Torpedo Acetylcholine Receptor, *J. Biol. Chem.* 269:10407-10416
- [Sch96] Schürholz T. (1996) Critical Dependence of the Solubilization of Lipid Vesicles by the Detergent CHAPS on the Lipid Composition. Functional Reconstitution of the Nicotinic Acetylcholine Receptor into Preformed Vesicles above the Critical Micellization Concentration, *Biophys. J.*, 58:87-96
- [Sch98] Schmidt EK., Liebermann T., Kreiter M., Jonczyk A., Naumann R., Offenhäusser A., Neumann E., Kukol A., Maelicke A., Knoll W. (1998) Incorporation of the Acetylcholine Receptor Dimer from Torpedo Californica in a Peptide Supported Lipid Membrane Investigated by Surface Plasmon and Fluorescence Spectroscopy, *Biosensors & Bioelectronics*. 13(6):585-591
- [Sen94] Senger D.R., Perruzzi C.A. (1994) Papadopoulos-Sergiou A. (1993) Adhesive properties of osteopontin: Regulation by naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol. Biol. Cell*. 5:565-574
- [Set82] Setaka M., Yamamoto T., Sato N., Yano M., Kwan T. (1982) A stable planar bilayer membrane of phospholipid supported by cellulose sheets, *Journal of Biochemistry*. 91(1):79-85
- [Sha95] Sharom FJ., (1995) Characterization and functional reconstitution of the multidrug transporter, *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*. 27(1):15-22
- [Sin72] Singer SJ., Nicolson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*. 175(23):720-731
- [Smi94] Smith JW., Piotrowicz RS., Mathis D. (1994) A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins, *Journal of Biological Chemistry*, 269(2):960-7
- [Spi92] Spinke J., Yang J., Wolf H., Liley M., Ringsdorf H., Knoll W. (1992) Polymer-supported bilayer on a solid substrate, *Biophys. J.* 63
- [Spi92] Spinke J. (1992) Spezifische Proteinbindung an funktionalisierte, selbstorganisierte Adsorptionsschichten, Dissertation, Universität Mainz
- [Spi93a] Spinke J., Liley F.-J., Schmitt H.-J., Guder L., Angermaier L., Knoll W. (1993) *J. Chem. Phys.*, 99: 7012
- [Spi93b] Spinke J., Liley F.-J., Schmitt H.-J., Guder L., Angermaier L., Knoll W. (1993) *Langmuir*, 9: 1821
- [Ste91] Steverding, D., Kadenbach, B. (1991) Influence of N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline modification on proton translocation and membrane potential of reconstituted cytochrome-c oxidase support "proton slippage", *J. Biol. Chem.*, 266:8097-8101
- [Ste93] Steverding D., Köhnke D., Ludwig B. and Kadenbach B. (1993) Proton slippage in cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans*. Membrane-potential measurements with the two-subunit and three-subunit enzyme, *Eur. J. Biochem*, 212:827-831



- [Ste98] Steinberg Yfrach G., Rigaud J L., Durantini E N., Moore A L., Gust D., Moore T A. (1998) Light-driven production of ATP catalysed by F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase in an artificial photosynthetic membrane, *Nature*, 392(6675): 479-482
- [Str84] Strotmann H., Bickel-Sandkötter S. (1984) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:97-120
- [Str95] Stryer L. (1995) *Biochemistry*, 4<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Company, New York
- [Str98] Struglics A., Fredlund K.M., Moller I.M., Allen J.F. (1998) Two subunits of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase are phosphorylated in the inner mitochondrial membrane, *Biochem Biophys Res Commun*, 243(3):664-668
- [Sza98] Szabo I., Bathori G., Tombola F., Coppola A., Schmehl I., Brini M., Ghazi A., De Pinto V., Zoratti M. (1998) Double-stranded DNA can be translocated across a planar membrane containing purified mitochondrial porin, *FASEB Journal*. 12(6):495-502
- [Tam86] Tamkun JW., DeSimone DW., Fonda D. (1986) Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin, *Cell*, 46:271-282
- [Tap89] Tapley P., Horwitz A.F., Buck C.A., Burridge K., Duggan K., Hirst R., Rohrschneider L. (1989) Analysis of the avian fibronectin receptor (integrin) as direct substrate for pp60, *Oncogene* 4:325-333
- [Tho80] Thomas D.C., Christian S.D. (1980) Micellar and surface behavior of sodium deoxycholate characterized by surface tension and ellipsometric methods, *J. Coll. Int. Sci.*, 78:466
- [Toy88] Toyoshima C., Unwin N. (1988) Ion Channel of Acetylcholine Receptor Reconstructed from Images of Postsynaptic Membranes, *Nature (London)* 336 (6196):247-250.
- [Tsa95] Tsao P.W., Mousa S.A., (1995) Thrombospondin mediates calcium mobilization in fibroblasts via its arg-gly-asp-and carboxyl-terminal domains. *J.Biol.Chem.*, 270:23747-23753
- [Tsu95] Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R.A., Yoshikawa S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science*, 269:1069-1074
- [Tsu96] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R.A., Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science*, 272:1136-1144
- [Ulm91] Ulman A. (1991) An introduction to ultrathin organic films: From Langmuir Blodgett to Self-Assembly, Academic Press, San Diego
- [Vei95] Veith M (1995) Wechselwirkung von Oberflächenpolaritonen mit periodisch modulierten Grenzflächen, Dissertation, Universität Mainz
- [Wal96] van Walraven H.S., Strotmann H., Schwarz O., Rumberg B. (1996) The H<sup>+</sup>/ATP coupling ratio of the ATP synthase from thiol-modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four. *FEBS Lett.* 379:309-313.
- [Wol91] Wolf H. (1991) Adsorptionsschichten niedermolekularer und polymerer Thiole und Disulfide auf Gold, Johannes-Gutenberg Universität Mainz
- [Wol95] Wolf H., Ringsdorf H., Delamarche E., Takami T., Kang H., Michel B., Gerber C., Jaschke M., Butt HJ., Bamberg E. [1995] End-Group Dominated Molecular Order in Self-Assembled Monolayers, *Journal of Physical Chemistry*. 99(18):7102-7107

## 10 Anhang

### Verwendete Pufferlösungen

#### Antikörperbindungspuffer

0.005M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.005M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.25M NaCl

pH7.6

#### α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>- Puffer

25mM HEPES

1mM CaCl<sub>2</sub>

1mM MgCl<sub>2</sub>

pH7.4

#### AChR Puffer

500 mM NaCl

10 mM HEPES

2 mM CaCl<sub>2</sub>

0.02% NaN<sub>3</sub>

pH7,4

#### COX Puffer

100mM K-HEPES

50mM KCl

pH7,2.

### **Herstellung der H<sup>+</sup>ATPase Vesikel**

Die Vesikelpräparationen und Charakterisierung führte die Arbeitsgruppe Prof. Gräber (Universität Freiburg) durch [Jun89], [Fro88], [Sch85]. In der Dissertation von Peter Richard [Ric91] wird die Rekonstitution der CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>-ATPase in unilamellare Vesikel aus Phosphatidylcholin (Lipoid E PC, 8mg/ml) und Cholesterin beschrieben. Die durchschnittliche Größe der Vesikel vor dem Einfrieren beträgt 50nm. Unterschiedliche Durchschnittsmengen von Proteinen pro Vesikel von 1, 10 und 20 Enzymen pro Vesikel werden in den Experimenten verwendet, was einem Proteingehalt von 23 bis 461 µg/ml pro Vesikel entspricht.

Beispiel für die Herstellung von 9,4ml Phosphatidylcholin-Liposomen mit 10 CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPasen pro Vesikel:

10mM Na-Tricin pH8

2,5mM MgCl

0,25mM DTT

0,2mM EDTA

1,2µM CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>

22,4g/l Phosphatidylcholin entspricht ungefähr 0,12 $\mu$ M Liposomen

Die ATPase haltigen Vesikel werden bei -70°C gelagert und die entsprechenden Mengen für ein Experiment aufgetaut. Für die Messung werden die mit einer Peptid/Lipid Monolage beschichteten Goldsubstrate bei 30°C in einer vesikelhaltigen Pufferlösung inkubiert. Die Pufferlösung besteht aus K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1M; Tricin, 0,5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5mM; MgSO<sub>4</sub>, 0,2mM, pH7,4 und wird vor Verwendung durch einen Nylonmembranfilter (Millipore, GmbH) mit 0,2 $\mu$ m Porengröße sterilfiltriert.

### **Herstellung von AChR-haltigen Vesikeln**

Die Rezeptordimere werden aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens *Torpedo californica* gewonnen, wobei CHAPS als solubilisierendes Detergenz verwendet wird.

Nach [Sch96] werden die solubilisierten Rezeptoren in Vesikel rekonstituiert, die aus einem Sojabohnenlipidgemisch (Avanti 20, Avanti Polar Lipids, USA) mit 10% Cholesterin angefertigt sind. Dazu werden 180 mg Av20 mit 20 mg Cholesterin in Chloroform gelöst. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig entfernt und über Nacht gefriergetrocknet. Der Lipidfilm wird in 10 ml Pufferlösung, (500 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4) aufgenommen und für eine Minute im Ultraschallbad inkubiert. Nach fünf Frier-Tauzyklen wird die Emulsion elfmal durch einen 400 nm Polykarbonat-Filter extrudiert und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### **Reduktion von Cytochrom c**

Nach 30min Aufwärmen auf Zimmertemperatur werden 40 mg Cytochrom c (Sigma) in ein 2ml Eppendorfgefäß eingewogen. Diese Menge wird in 1ml COX-Puffer gelöst und mit wenigen Körnchen Natriumdithionit (Merck) reduziert (Farbumschlag von dunkelrot nach hellrot). Eine Sephadex PD10 Säule (Pharmacia) wird mit Puffer äquilibriert und die Cytochrom c Lösung auf die Säule gegeben. Die rotgefärbte Fraktion wird gesammelt und auf 10ml aufgefüllt (~0,3M).

## 11 Abkürzungsverzeichnis

AChR	Acetylcholinrezeptor
AFM	Kraftmikroskopie
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BLM	schwarze Membran
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
COX	Cytochrom c Oxidase
CV	zyklische Voltammetrie
ELISA	enzyme labeled immunosorbent assay
FT-IR	Fourier - transformierte - Infrarot - Spektroskopie
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl) piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IS	Impedanzspektroskopie
kD	kilo Dalton (Molekulargewicht)
l	Wellenlänge (in nm)
M	Mol pro Liter
MQ	Millipore™ bidestilliertes Wasser
M <sub>w</sub>	Molekulargewicht
sBLM	festkörperunterstützte Lipiddoppelschicht
SPFS	Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie
SPS	Oberflächenplasmonenspektroskopie
SV	Rechteckwellenvoltammetrie
tBLM	verankerte festkörperunterstützte Lipiddoppelschicht
Tricin	Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## 12 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1: Flüssig-Mosaik-Modell nach S.J. Singer und G.L. Nicolson.....	5
Abb. 1.2.1: Verschiedene Modellsysteme einer Biomembran.....	7
Abb. 2.2.1: Anbindung des Thiopeptides an die Goldoberfläche.....	10
Abb. 2.2.2: Lorentz-Fits der Wertepaare aus Brechungsindex und der Schichtdicke.....	12
Abb. 2.3.1: AFM Aufnahmen, nach Beschichtung mit Peptid.....	13
Abb. 2.3.2: AFM Aufnahme einer Gold(1:1:1)- Oberfläche. Gescannt wurde der Grenzbereich zwischen peptidbeschichteter, bzw. freier Oberfläche.....	14
Abb. 2.5.1: Kopplungsvorgang des immobilisierten Thiopeptides an ein Lipid.....	16
Abb. 2.7.1: FT-IR Spektren. FT-IR-Absorption der Peptidmonoschicht auf einer Goldoberfläche, bzw. Peptidmonoschicht nach der Kopplungsreaktion mit DMPE.....	18
Abb. 2.8.1: Darstellung fusionierender Vesikel an der Peptid-Lipidmonoschicht.....	19
Abb. 2.8.2: Temperaturabhängigkeit der Vesikelfusion.....	20
Abb. 2.9.1: Impedanzspektrum einer Peptid - Lipid Monoschicht. Vergleich der anschließend durch Vesikelfusion erhaltenen elektrischen Eigenschaften der peptidunterstützten Lipiddoppelschicht.....	22
Abb. 2.9.2: Zyklische Voltammogramme der verschiedenen Peptid-Lipidkonstrukte im Vergleich zu einer unbeschichteten Goldoberfläche.....	23
Abb. 3.1.1: Struktureigenschaften von Integrinen, abgeleitet aus elektronen- mikroskopischen Abbildungen.....	28
Abb. 3.1.2: Die Familie der Integrine.....	29
Abb. 3.3.1: Anlagerung von Thiopeptidmolekülen an eine Goldoberfläche.....	31
Abb. 3.4.1: Resultierende Schichtdicken unterschiedlicher RGD Peptide.....	32
Abb. 3.5.1: Bindungskinetik einer binären Mischung von RGD-Peptid (EMD73450) und 3Mercaptopropionyl-Ala-Ser-Ser-Ala-Ala-Ser-Ala-Lys-Lys x TFA an eine Goldoberfläche mit anschließender Antikörperbindung.....	33
Abb. 3.6.1: Zeitabhängige Bindung des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors an zwei RGD Peptide unterschiedlicher Konformation bzw. an die reine Goldoberfläche (Referenz), immobilisiert auf einer Goldoberfläche.....	34
Abb. 3.7.1: Rekonstitution des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors in eine peptidunterstützte Modellmembran mit anschließender Vitronectin - Bindung.....	35
Abb. 4.1.1: Vereinfachte Struktur der $CF_1F_0$ -ATPase, inkorporiert in eine thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht.....	39
Abb. 4.2.1.: Kinetiken der verschiedenen Vesikelpräparationen, die kein Enzym bzw. 20 Enzyme pro Vesikel, 10 Enzyme pro Vesikel, 1 Enzym pro Vesikel enthalten.....	40
Abb. 4.2.2: Modell der Fusion $H^+$ ATPase-haltiger Vesikel mit einer thiopeptidunterstützten Lipidschicht.....	41
Abb. 4.3.1: Aufbau einer Lipiddoppelschicht auf Peptid/Lipid Monoschichten.....	43
Abb. 4.4.1: Schematische Darstellung der $CF_1F_0$ -ATPase, inkorporiert in eine Lipiddoppelschicht.....	44
Abb. 4.4.2: Voltammogramme (80Hz), gemessen bei verschiedenen ATP Konzentrationen und verschiedenen Ausgangspotentialen.....	45
Abb. 5.1.1: Modell eines Acetylcholinrezeptordimers, $(\alpha_2\beta\gamma\delta)_2$ .....	50
Abb. 5.2.1: Fusion AChR-freier Vesikel bzw. AChR-haltiger Vesikel.....	50
Abb. 5.3.1: Fusion AChR-haltiger Vesikel mit der anschließenden Bindung von primärem, bzw. sekundärem Antikörper.....	52

Abb. 5.4.1: Schematische Darstellung des inkorporierten Rezeptordimers mit gebundenem primärem und sekundärem Antikörper.....	53
Abb. 5.4.2: Reflektivitätskurve (SPS) bzw. Fluoreszenzkurve (SPFS) Fluoreszenzkurven von der Thiopeptid - Lipiddoppelschicht mit und ohne inkorporiertem AChR, mit primärem, bzw. sekundärem Antikörper markiert.....	54
Abb. 5.5.1: Vesikel ohne AChR bzw. mit rekonstituiertem AChR. Gezeigt wird auch die Bindung des Antagonisten $\alpha$ - Bungarotoxin an den Rezeptor.....	55
Abb. 6.2.1: Dargestellt ist schematisch der Vorgang der spontanen Rekonstitution der COX als Dimer in eine planare Lipiddoppelschicht .....	59
Abb. 6.2.2: Strukturformel von Cholat.....	60
Abb. 6.2.3: Kinetikmessung der Vesikelspreitung auf einer thiopeptidunterstützten Lipidschicht mit anschließender Zugabe solubilisierter COX.....	61
Abb. 6.3.1: a) SPS bzw. b) SPFS Kurven der COX - Inkorporation in die thiopeptidunterstützte Lipidschicht mit anschließender Bindung des primären, bzw. sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers.....	63
Abb. 6.4.1: Kinetik der Bindung eines polyklonalen Antikörpers.....	65
Abb. 6.5.1: Rechteckwellenvoltammogramm, gemessen ohne Substrat bzw. mit reduziertem Cytochrom c.....	66
Abb. 6.5.2: Ersatzschaltkreis einer Lipiddoppelschicht.....	67
Abb. 6.5.3: Ersatzschaltkreis einer Lipiddoppelschicht mit CPE.....	68
Abb. 6.5.4: Widerstände $R_M$ , $R_S$ und $R_D$ sowie Kapazitäten $C_M$ , $C_S$ und $C_D$ der Lipiddoppelschicht, der Thiopeptidschicht beziehungsweise den Defekten .....	62
Abb. 6.5.5: Realteil der Impedanz, $Re(Z)$ und Imaginärteil der Impedanz, gemessen wird die thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht,.....	63
Abb. 6.5.6: Realteil der Impedanz, $Re(Z)$ und Imaginärteil der Impedanz, gemessen wird die Cytochrom c Oxidase, inkorporiert in die thiopeptidunterstützte Lipiddoppelschicht, aktiviert mit 12 $\mu$ M Cytochrom c .....	64
Abb. 6.5.7: Effekt ansteigender Cytochrom c Konzentration bei einem konstanten Polarisationspotential auf eine Lipiddoppelschicht mit eingebauter Cytochrom c Oxidase. Zugabe von ansteigenden Mengen Cytochrom c.....	72
Abb. 6.5.8: Einfluß steigender Konzentrationen des Inhibitors Cyanid auf die aktivierte Cytochrom c Oxidase.....	73
Abb. 6.5.9: Simultanmessung der optischen und elektrischen Eigenschaften der Cytochrom c Oxidase.....	74
Abb. 6.6.1: Kristallstruktur der dimeren Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz.....	78
Abb. 7.1.1: Die Reflektivität der resonanten Anregung von Oberflächenplasmonen.....	83
Abb. 7.1.2: Kopplung von Lichtenergie in Oberflächenplasmone.....	86
Abb. 7.1.3: Dispersionsrelationen für Oberflächenplasmonen und für Licht .....	87
Abb. 7.1.4: Experimenteller Aufbau der SPS.....	88
Abb. 7.1.5: Modifizierte Kretschmann-Anordnung.....	89
Abb. 7.1.6: Schematische Darstellung kinetischer Messungen .....	91
Abb. 7.3.1: Meßzelle für IS.....	94
Abb. 7.3.2: RC Schaltkreise.....	95
Abb. 7.4.1: Meßanordnung für die zyklische Voltammetrie .....	98
Abb. 7.4.2: Verlauf des angelegten Potentials, erzeugt vom Funktionsgenerator.....	98
Abb. 7.4.3: Zyklisches Voltammogramm bei (reversiblen) Ladungstransfer,.....	99
Abb. 7.4.4: Aufdampfmaske, alle Größenangaben sind in mm. ....	100
Abb. 7.6.1: Prinzip der Rasterkraftmikroskopie.....	102

## 13 Lebenslauf

Eva - Kathrin Schmidt

geboren am 09.03.1971 in Wolfsburg

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| 1977-1981                      | Grundschule Wasserkampstraße   |
| 1981-1983                      | Orientierungsstufe Luerstraße  |
| 1983-1990                      | Kaiser - Wilhelms Gymnasium Hannover   |
| 1990-1995                      | Studium der Biologie an der Universität Hannover   |
| April 1995 - Februar 1996:     | Diplomarbeit bei Dr. habil. Grimm, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben, Sachsen-Anhalt.<br>Thema der Arbeit: 'Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung von Isoformen der Ferrochelatase, einem Schlüsselenzym der Tetrapyrrolbiosynthese' |
| Februar 1996                   | Diplom der Biologie, Universität Hannover  |
| April 1996 bis September 1998: | Doktorand in der Arbeitsgruppe Prof. Knoll, Max-Planck Institut für Polymerforschung in Mainz in Kooperation mit der Firma Merck KGaA, Darmstadt   |
| Seit Oktober 1998:             | Frontier Researcher im Arbeitskreis Prof. Knoll, RIKEN, Japan  |

## 14 Danksagung

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Wolfgang Knoll für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die intensive Betreuung, sein Vertrauen und sein Interesse. Seine Offenheit gegenüber 'biologischen Denkansätzen' hat diese Arbeit überhaupt ermöglicht.

Frau Dr. Naumann, die diese Arbeit initiiert und betreut hat, danke ich sehr. In vielen interessanten Diskussionen hat sie meine Begeisterung für diese Thematik geweckt. Ihre Energie, Geduld und Humor haben einen Einfluß auf mich, der weit über diese Arbeit hinaus reicht.

Herrn Dr. Andreas Offenhäusser danke ich herzlich für die Betreuung in seiner Arbeitsgruppe. Seine Freundlichkeit und Geduld haben mich sehr unterstützt.

Herrn Prof. Hedrich danke ich für die Bereitschaft, diese externe Doktorarbeit zu betreuen.

Herrn Prof. Radunz gilt mein besonderer Dank, diese Arbeit bei der Firma Merck KGaA ermöglicht zu haben. Seine Unterstützung gab uns die Freiheit, die Ideen dieser Arbeit in die Tat umzusetzen.

Herrn Prof. Kolb danke ich für die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Müller danke ich für die Anregungen während meines Studiums die mein Interesse an der Biochemie geweckt haben.

Herrn Dr. Jonczyk danke ich herzlich für die Peptidsynthesen. Seine zahlreichen und sehr hilfreichen Ratschläge haben viele Gesichtspunkte dieser Arbeit initiiert. An dieser Stelle möchte ich ebenfalls Dr. Beate Diefenbach für ihre Unterstützung und Gesprächsbereitschaft danken.

Herrn Dr. Fendler danke ich für seine freundliche Diskussionsbereitschaft. Ihm habe ich die Interpretationsansätze der Impedanzdaten zu verdanken. Seine Anregungen haben zahlreiche Fragestellungen hervorgerufen, die ich hoffe, einst beantworten zu können.

Herrn Prof. Kadenbach danke ich für die Cytochrom c Oxidase und den Antikörper, Frau Dr. Viola Frank für die Präparation.

Herrn Prof. Neumann danke ich für den Acetylcholinrezeptor, die zahlreichen Anregungen und die Hilfestellungen. Herrn Dr. Kukol danke ich für die Präparation.



Bei Herrn Prof. Maelicke möchte ich mich für den Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor bedanken, ohne den die Fluoreszenzexperimente nicht entstanden wären. Für seine Geduld und seine Zeit möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Gräber möchte ich für die Bereitstellung unzähliger H<sup>+</sup>ATPase Vesikel danken.

Herrn Andreas Scheller möchte ich für die Hilfestellung bei dem Kampf gegen die Untiefen des Computers und die Entwicklung des anwenderfreundlichen WASPLAS Programms danken.

Herrn Volker Scheumann danke ich für die Geduld und Hilfsbereitschaft, mir die Methode der Kraftmikroskopie nahezubringen. Seine Ideen und seine Begeisterung sind Bestandteil dieser Arbeit.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung in guten und schlechten Zeiten.

Allen 'Knollis' möchte ich danken mit denen ich gelacht und gearbeitet habe, mit denen ich mich gestritten und mich vertragen habe, die mir Joggen, Squash, Plasmonen, Fußball und Doppelkopf (versucht) haben beizubringen. Und die nie in die 'Chauvi-Kasse' einzahlen.