

Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung für Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie
Laborgruppe Biophysik

**Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von
Membraneigenschaften
und
Membran-Protein-Wechselwirkungen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Stefanie Roes
Kiel
2004

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	9
1.1	Kurze Übersicht	9
1.2	Ausführliche Einführung	11
1.2.1	Gram-negative Bakterien.....	11
1.2.2	Chemische Struktur von Lipopolysacchariden (LPS)	13
1.2.3	Antimikrobielle Wirkstoffe	15
1.2.4	LPS-induzierte Aktivierung von humanen Immunzellen	16
1.3	Allgemeine Eigenschaften von Membranen.....	17
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	20
2.1.1	Allgemeines	20
2.1.2	Mica	33
2.1.3	Cantilever.....	33
2.1.4	Kraftkurven.....	35
2.1.5	Bestimmung der Federkonstante	37
2.1.6	Kopplung eines α LBP-Antikörpers an den Cantilever.....	39
2.2	Rekonstitutionssysteme von Membranen	40
2.2.1	Lipidmonolayer auf der Langmuir Filmwaage und auf festen Substraten	40
2.2.2	Erzeugung von Lipidbilayern durch Liposomenfusion	44
2.3	Lipopolysaccharide.....	47
2.4	Subphase.....	48
3	Biophysikalische Untersuchungen an LPS-Monolayern und ihrer Wechselwirkung mit antimikrobiellen Wirkstoffen.....	49
3.1	Einleitung.....	49
3.2	Druck-Flächenisothermen der LPS-Monolayer.....	50
3.3	Charakterisierung der LE/LC-Domänen.....	52
3.3.1	Der Fluoreszenzfarbstoff NBD-PE.....	52
3.3.2	Domänenbildung im Lipid A-Monolayer	52
3.3.3	Untersuchung der molekularen Organisation des Lipid A-Monolayers durch Charakterisierung attraktiver und repulsiver Kräfte	55

3.3.4	Druckabhängigkeit von Domänen in unterschiedlichen LPS-Monolayern	60
3.4	Wirkung antibakterieller Peptide auf Bakterien und LPS-Monolayer.....	65
3.4.1	Wechselwirkung von humanem β -Defensin 3 (hBD-3) mit einem R595 LPS Langmuir-Blodgett Film	65
3.4.2	Wechselwirkung von Polymyxin B (PMB) mit einem Lipid A-Langmuir-Blodgett Film.....	68
3.5	Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel 3	72
4	Biophysikalische Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen dem LPS-bindenden Protein LBP, Phosphatidylserin und LPS.....	74
4.1	Die Rolle des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins LBP	75
4.2	Lipopolysaccharid-bindendes Protein	78
4.3	Phosphatidylserin.....	79
4.4	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen	80
4.4.1	Charakterisierung von PS-Monolayern mit interkaliertem LBP und LPS	80
4.4.2	Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen PS-Liposomen, LBP und Lipid A- Aggregaten.....	83
4.5	Fluoreszenzspektroskopie mit polarisiertem Licht (Polarisationsmessungen) an Membransystemen	94
4.5.1	Beeinflussung des Phasenübergangs der Kohlenwasserstoffketten zweier Phospholipide durch LBP	97
4.6	CD-Spektroskopie.....	100
4.6.1	Untersuchung der Wechselwirkung von LBP mit amphiphilen Molekülen.....	101
4.7	Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel 4	104
5	Gesamtzusammenfassung	109
6	Literaturverzeichnis.....	112

Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic force microscope</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
biG33	anti-LBP Antikörper
BPI	<i>Bactericidal/permeability increasing Protein</i>
CD	Zirkulardichroismus
CD14	Cluster of Differentiation 14
CMC	<i>Critical Micellar Concentration</i>
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerol
DMPS	Dimyristoylphosphatidylserin
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
DSP	Digitaler Signalprozessor (<i>digital signal processor</i>)
F515 LPS	Tiefraummutanten LPS von <i>Escherichia coli</i> Stamm F515
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
hBD-3	humanes β -Defensin 3
HEPES	Hydroxyethylpiprazinylethan-sulfonsäure
HV	Hochspannung
IL	Interleukin
Kdo	3-Deoxy-D- <i>manno</i> -Oct-2-Ulonsäure
LB	Langmuir-Blodgett
LBP	LPS-bindendes Protein
LC	Flüssig kondensiert (<i>liquid condensed</i>)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LE	Flüssig expandiert (<i>liquid expanded</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
LVDT	<i>Linear Variable Differential Transformer</i>
MEMO	3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat
MFP-3D	AFM der Firma Asylum Research
MNC	mononukleare Zelle
NBD	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin

P-Etn	Phosphoethanolamin
PID	proportional, integral und derivativ
PMB	Polymyxin B
PS	Phosphatidylserin
R595 LPS	Tiefraumutanten LPS von <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R595
Re LPS	Tiefraumutanten LPS
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
STM	Rastertunnelmikroskop (<i>scanning tunneling microscope</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEN	Triethylammonium
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumor Necrose Faktor α
Verbindung 406	Lipid A Precursor IVa
WLC	<i>Worm-like chain</i>
α LBP-Ab	antiLBP-Antikörper

Abkürzungen der Bakterienspezies

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. minnesota</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota

Symbole

<i>A</i>	Amplitude
<i>a</i>	Fläche
<i>A</i> *	Kontaktfläche
<i>C</i>	Konzentration
<i>c</i>	spezifische molare Konzentration
<i>C</i> ₁ , <i>C</i> ₂	zwei Hauptkrümmungen
<i>d</i>	Tiefe
<i>Defl</i>	Deflection
<i>E</i> _a	Adhäsionsenergie
<i>E</i> _b	Bindungsenergie
<i>F</i>	Kraft

<i>InvOLS</i>	Invertierte optische Cantileversensitivität
<i>K</i>	Kraft
<i>k</i>	Federkonstante
<i>k_{Rig}</i>	Rigidität des gekrümmten Bilayers
<i>m</i>	Masse
<i>N</i>	Federbelastung
<i>Q</i>	Qualitätsfaktor
<i>R</i>	Radius
<i>R_a</i>	kritischer Radius
<i>R_r</i>	Bruchradius
<i>Sep</i>	Separation
<i>T</i>	Temperatur
<i>t</i>	Zeit
<i>V</i>	Volumen
<i>W</i>	effektives Kontaktpotential
<i>α</i>	Dämpfungskoeffizient
<i>ε</i>	Lennard-Jones Energie
<i>γ₀</i>	Oberflächenspannung von reinem Wasser
<i>φ</i>	Phase
<i>Θ</i>	Kontaktwinkel
<i>Π</i>	lateraler Druck
<i>θ</i>	Neigungswinkel
<i>ρ</i>	Dichte
<i>σ</i>	Lennard-Jones Durchmesser
<i>τ</i>	Zeitkonstante
<i>ω</i>	Frequenz

Konstanten

$k_B = 1,380 \cdot 10^{-23} \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$	Boltzmann-Konstante
$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	Avogadro-Konstante

Hinweis

Die in dieser Arbeit gezeigten AFM-Höhenbilder haben einen Grauwertebereich, dessen kleinster bzw. größter Wert dem dunkelsten bzw. hellsten Grauton des Grauverlaufs in Abb. 20 entspricht. Der Übersichtlichkeit halber wurde auf die Darstellung des Grauverlaufs in den restlichen Höhenbildern verzichtet. In Abb. 29 ist entsprechend der Farbverlauf der Abb. 26 verwendet worden.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Kurze Übersicht

Der Physiker versucht mit vereinfachten idealisierten Modellsystemen komplexe Systeme, wie sie in der Biologie in Form von komplexen Organismen und Abläufen auftreten, zu beschreiben. Zu solchen komplexeren Organismen gehören die Gram-negativen Bakterien, deren Zellwand u.a. aus zwei Doppelschichtmembranen aufgebaut ist. Die äußere Membran ist streng asymmetrisch und besteht auf der Innenseite aus Phospholipiden und auf der Außenseite aus Lipopolysaccharid (LPS). LPS besitzt in freigesetzter Form im Wirt toxische Eigenschaften und ist an der Pathogenese der Gram-negativen Sepsis beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit sind Eigenschaften von Membranen, ihre kooperativen Prozesse und Lipid-Protein Wechselwirkungen mit lateraler Auflösung untersucht worden. Hierfür sind die Rasterkraftmikroskopie (AFM) und ergänzend Fluoreszenzspektroskopie mit polarisiertem Licht zur Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen von Lipiden und CD-Spektroskopie zur Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften des LPS-bindenden Proteins (LBP) angewandt worden. Die Experimente wurden an vereinfachten rekonstituierten Membranen - sowohl Lipidmono- als auch Lipidbilayer - durchgeführt, die für die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen festkörperunterstützt wurden.

Die beiden biologischen Fragestellungen dieser Arbeit betreffen (i) die Funktion der LPS-Schicht Gram-negativer Bakterien als Permeationsbarriere und die Wechselwirkung mit antibakteriellen Peptiden und (ii) die Aktivierung mononukleärer Zellen (Immunzellen des Wirtes, MNC) im Immunsystem des Wirtes durch freigesetztes LPS.

Zur Beantwortung der ersten Frage sind Monolayer aus LPS präpariert und ihre Eigenschaften, wie Topographie und Phasenverhalten, aber auch ihre Wechselwirkungen mit antibakteriellen Peptiden mit dem AFM untersucht worden.

Bezüglich der zweiten Fragestellung wurde die laterale Organisation des LBP in Phospholipidmembranen als Rekonstitutionsmodell der Membran von MNC näher betrachtet. LBP ist an der Signalkaskade zur Aktivierung von MNC beteiligt und wird in der Literatur als Shuttleprotein beschrieben. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden. Für LBP wurde eine Funktion als Fusionsprotein zwischen Phospholipidmembranen und LPS nachgewiesen. Auch ist es durch kraftspektroskopische Bindungsmessungen zwischen LBP und einem antiLBP-Antikörper erstmals gelungen, ein Protein mit Hilfe von Antikörpern in einer Mehrfachlipidschicht zu detektieren.

The cell wall of Gram-negative bacteria consists of the cytoplasmic and an additional outer membrane. This outer membrane is an extremely asymmetric bilayer with respect to the lipid composition, the outer leaflet is composed of glycolipids, mainly lipopolysaccharides (LPSs), and the inner leaflet of a phospholipid mixture. When released from bacterial surface into the blood circulation of the host, LPS plays an important role in the pathogenesis and manifestation of gram-negative inflammation, in general, and of septic shock, in particular.

In this dissertation, the atomic force microscope (AFM) was used to investigate the properties of membranes, their cooperative processes and lipid-protein interactions with high molecular lateral resolution. Two complementing techniques were used: fluorescence spectroscopy with polarized light to determine phase transition temperatures of lipids and circular dichroism (CD) - spectroscopy to investigate physicochemical properties of the LPS-binding protein (LBP). Experiments were done on reconstituted model membranes – lipid monolayers and – bilayers – which were solid-supported for the AFM-measurements.

Two biological questions were important in this dissertation: (i) function of the LPS-layer in Gram-negative bacteria as a permeability barrier and its interaction with antibacterial peptides and (ii) activation of immune cells (mononuclear cells, MNC) of the host immune system by released LPS.

To answer the first question, LPS monolayers were prepared. Properties such as topography and phase behaviour and their interaction with antibacterial peptides were investigated.

With regard to the second question, the lateral organization of LBP in reconstituted phospholipid membranes mimicking the membrane of MNC was characterized. LBP is involved in the signalling cascade in the activation of MNC and has been described in the literature as a shuttle protein. Here it is shown that LBP has a function as a fusion protein for phospholipid membranes and LPS. Furthermore, force spectroscopy was successfully used for measuring binding forces between LBP and its antibody. This is the first time that a protein was detected in a lipid membrane utilizing antibodies attached to the tip of an AFM-cantilever.

1.2 Ausführliche Einführung

1.2.1 Gram-negative Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit waren Gram-negative Bakterien von besonderem Interesse. Bei diesen Bakterien handelt es sich um eine taxonomische Gruppe, die sich in dem sogenannten Gram-Test nicht anfärben lässt. Sie besitzen eine Zellhülle, die zusätzlich zu der Zytoplasmamembran einer Phospholipiddoppelschicht, aus einer weiteren Lipiddoppelschicht besteht. Zwischen diesen beiden Membranen liegt der periplasmatische Raum, in dem sich das Peptidoglykan, auch Murein genannt, befindet, das als mechanisches Stützgerüst dient.

Die äußere Doppelschichtmembran besitzt einen extrem asymmetrischen Aufbau: Ihre innere Schicht besteht aus einer Mischung von Phospholipiden, während die nach außen gerichtete durch Glykolipide gebildet wird, bei den meisten Gram-negativen Bakterien durch Lipopolysaccharide (LPS) (Nikaido und Vaara, 1987). Sie stellt eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere insbesondere für hydrophobe Substanzen dar und erhöht somit die Resistenz der Bakterien gegen eine Vielzahl therapeutischer Wirkstoffe, Gallensalze und Verdauungsenzyme (Bayston und Cohen, 1990). Neben der Erhöhung der Permeabilitätsbarriere wirkt das in der Membran verankerte LPS als Erkennungsstruktur für das Immunsystem des Wirtsorganismus. Kommt es durch das Absterben der Bakterien zu einer Freisetzung des LPS, so zeigt es im Wirt toxische Eigenschaften und ist an der Pathogenese der Gram-negativen Sepsis beteiligt (Khan et al., 1998). Die Freisetzung des LPS in das Blut des Wirtes kann die direkte Folge der Einwirkung von endogenen oder exogenen antibakteriellen Wirkstoffen sein, aber auch bei Wachstum, Teilung oder dem Absterben der Bakterien erfolgen.

In geringer Konzentration (pg/ml) kann das LPS die Aktivierung des Immunsystems des Wirtes verursachen (siehe Abb. 1). Dies hat eine verbesserte Immunabwehr zur Folge. Bei Makrophagen kommt es durch die Inkubation mit LPS zu einer Freisetzung von Zytokinen (Interleukin (IL)-1, -6, -10 und -12 sowie Tumor Necrosis Faktor α (TNF α)), die als Botenstoffe (Mediatoren) für andere Zellen des Immunsystems dienen, deren Zusammenspiel letztendlich die Immunabwehr des Körpers bewirkt. Die Freisetzung der Mediatoren wird durch verschiedene Zellarten des Wirtes bewirkt, z.B. von Monozyten, Makrophagen, polymorphonuklearen Zellen, vaskulären Zellen und T-Lymphozyten (Vogel und Hogan, 1990; Galanos et al., 1992; Haziot et al., 1993; Loppnow, 1994; Mattern et al., 1994). An der

transmembranen Signaltransduktion sind verschiedene Proteine beteiligt, wobei das sogenannte LPS-bindende Protein (LBP) eine initiale Rolle bei dem Transport von LPS an weitere Oberflächenstrukturen (Rezeptoren) spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Funktion des LBP eingehend untersucht.

Eine höhere Dosis LPS (ng/ml) hingegen kann schwere klinische Symptome und damit einen septischen Schock auslösen, der sogar zum Tod führen kann (siehe Abb. 1). Hierbei kommt es zu einer Hyperreaktion des Immunsystems. Die Folgen sind hohes Fieber, hämodynamische Instabilität, Aktivierung von Komplement- und Gerinnungskaskaden und schließlich Multiorganversagen. Vor allem postoperativ gehört Sepsis zu den Haupttodesursachen. Auf Grund dieser Aktivität von LPS wird es auch Endotoxin genannt. Die Sepsis ist für über 2% der Krankenhauseinweisungen und mehr als 400.000 Todesfälle jährlich verantwortlich (Bone, 1991).

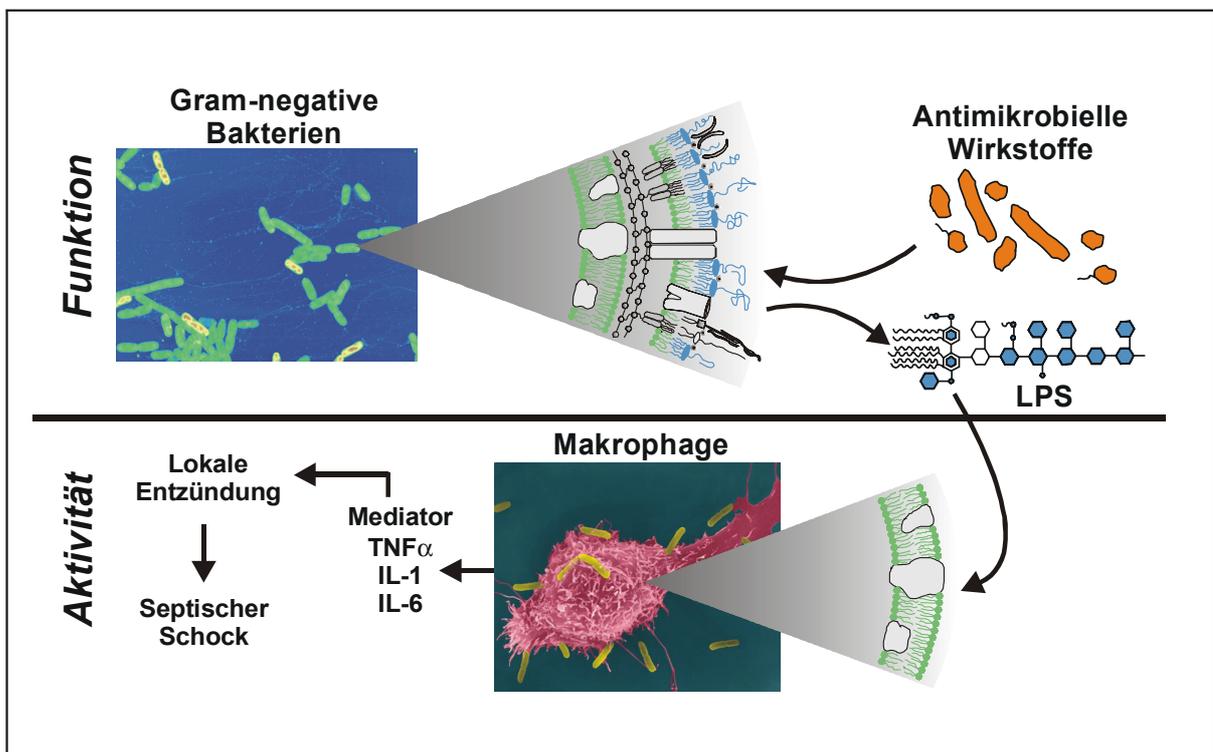


Abb. 1: Funktion und Aktivität von Lipopolysacchariden

Ein allumfassender Ansatz für mögliche Behandlungsstrategien gegenüber Sepsis bzw. einem septischen Schock kann nicht nur auf verschiedenen Abtötungsmechanismen von Bakterien aufbauen. Er sollte sich zudem mit der Aufklärung der Mechanismen beschäftigen, die zu der Aktivierung des Immunsystems beitragen.

Aufgrund der Komplexität eines solchen Systems war es im Rahmen dieser Arbeit sinnvoll, die Untersuchungen an rekonstituierten Membranen durchzuführen, die auf ihre wesentlichen Komponenten reduziert worden sind. Durch die Reduktion der Komponenten, war es einfacher, die rekonstituierten Membranen mit einem Rasterkraftmikroskop zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eine ausführliche Einführung in die verwendete Technik der Rasterkraftmikroskopie gegeben.

In Kapitel 0 dieser Arbeit geht es darum, ein generelles Verständnis für die membranbildenden Eigenschaften der Lipopolysaccharide der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zu gewinnen und außerdem ihre direkten Wechselwirkungsmechanismen mit antibakteriellen Wirkstoffen näher zu charakterisieren. Da die LPS-Moleküle die Strukturen sind, die sowohl das erste Target für antibakterielle Therapeutika darstellen als auch die Aktivierung der Immunzellen des Wirtes bewirken, ist ihre Funktion von besonderer Bedeutung. Es gibt zum einen endogene – also vom Wirtssystem gebildete – und zum anderen auch exogene antimikrobielle Wirkstoffe. Innerhalb der vergangenen 40 Jahre sind verschiedene endogene antimikrobielle Substanzen charakterisiert worden, die von den Epithelzellen und Phagozyten des Wirtsystems gebildet wurden. Dabei handelte es sich um kleine anorganischen Moleküle, z.B. Wasserstoffperoxid, bis hin zu großen Proteinkomplexen, wie sie bei der Aktivierung der Komplementkaskade vorkommen. Definiert sind antimikrobielle Peptide als antimikrobiell wirkende Polypeptide, deren Zusammensetzung in der DNS kodiert vorliegt und durch ribosomale Ablesung synthetisiert wird (Ganz und Lehrer, 1999).

Die Rolle des Serumproteins LBP (Schumann et al., 1990) bezüglich der Interaktion von LPS mit der Zytoplasmamembran der Immunzellen, die letztendlich zu deren Aktivierung führt (Gutsmann et al., 2001a; Gutsmann et al., 2001b; Gutsmann et al., 2000b), wird in Kapitel 0 und 4 beschrieben und diskutiert.

1.2.2 Chemische Struktur von Lipopolysacchariden (LPS)

Die äußere Schicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wird, wie bereits erwähnt, durch Lipopolysaccharide gebildet. Dies sind Glykolipide mit einem ausgeprägten amphiphilen Charakter. Bei sehr niedrigen Konzentrationen liegen sie in einer wässrigen Umgebung als Monomere vor. Steigert man die Konzentration, so kommt es bei der sogenannten *Critical Micellar Concentration* (CMC), deren Wert u.a. von der Ladung, der

Länge des Zuckerteils und der Anzahl und Länge der Fettsäureketten abhängt, zur Aggregatbildung (Israelachvili, 1991). Erste Messungen unserer Arbeitsgruppe ergeben für die in dieser Arbeit verwendeten Lipopolysacchariden einen Wert von etwa 10^{-8} M.

Das Lipopolysaccharidmolekül teilt sich in drei verschiedene Regionen auf, die O-spezifische Seitenkette, die Kernregion und das Lipid A (Rietschel et al., 1987) (siehe Abb. 2).

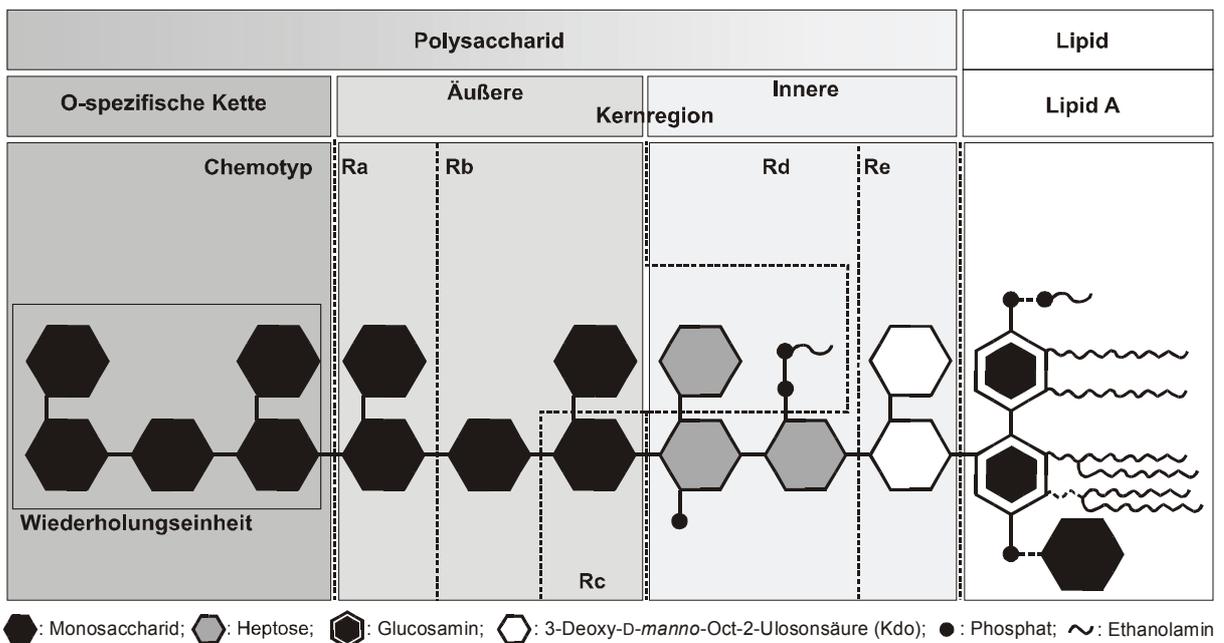


Abb. 2: Prinzipielle chemische Struktur eines LPS-Moleküls Gram-negativer Bakterien

Dabei bilden die O-spezifische Seitenkette, die Kernregion und Diglucosamin-Rückgrad des Lipid A den hydrophilen Teil des LPS Moleküls. Die O-spezifische Seitenkette besteht aus variierenden Glykosylresten. Innerhalb der Kernregion unterscheidet man zwischen dem äußeren und inneren Teil. Dabei besteht der äußere Kern zum größten Teil aus Hexosen (D-Galactose, D-Glucose und N-Acetyl-D-Glucosamin). Der innere Kern setzt sich aus D- oder L-Glycero-D-manno-Heptosen und 3-Deoxy-D-manno-Oct-2-Ulosensäure (Kdo) zusammen. LPS-Strukturen, die keine O-spezifische Seitenkette besitzen, werden je nach Kernregionlänge als Ra (längste Zuckerkette), Rb, Rc, Rd oder Re LPS bezeichnet.

Direkt kovalent an die Kdo's gebunden ist der hydrophobe Lipid A Teil des LPS Moleküls. Er wird aus einer Disaccharid-Kopfgruppe gebildet, die aus zwei β -(1→6)-verknüpften Glucosaminen besteht. Die Positionen 1 und 4' sind phosphoriliert (Zähringer et al., 1994) bzw. können mit anderen polaren oder unpolaren Gruppen besetzt werden. An das Disaccharid binden insgesamt vier gesättigte 3-Hydroxy-Fettsäuren (C 12 – C 14), deren 3-

Hydroxylgruppen mit weiteren gesättigten Fettsäuren verestert sein können, so dass bis zu sieben Fettsäuren vorhanden sein können (Zähringer et al., 1994).

Bakterien, die den gesamten Zucker synthetisieren, bilden glatte Kolonien und werden *smooth*, Wildtyp oder auch S-Form Bakterien genannt. Bakterien, die die O-spezifische Seitenkette nicht ausbilden, werden Raumutanten (ihre Kolonien haben eine raue Oberfläche) und solche, die nur die Kdo's synthetisieren, Tiefraumutanten genannt. Die entsprechenden Lipopolysaccharide werden Wildtyp oder S-Form LPS, Raumutanten LPS und Tiefraumutanten LPS (Re LPS) genannt.

Im Gegensatz zur variablen Zuckerkette stellt das Lipid A hinsichtlich seiner chemischen Struktur eine stark konservierte Komponente des LPS dar, die den entscheidenden Faktor für die biologische Wirksamkeit bzgl. der Aktivierung mononukleärer Zellen bildet. Das Lipid A wird auch *endotoxisches Prinzip* genannt (Pfeiffer, 1892). Die in dieser Arbeit verwendeten Re LPS, Lipid A und Lipid A Teilstrukturen werden aus Gründen der Übersichtlichkeit hier auch unter dem Begriff Endotoxin zusammengefasst.

1.2.3 Antimikrobielle Wirkstoffe

Die Verwendung von Antibiotika gegen Bakterien kann in kurzer Zeit zur Herausbildung resistenter Stämme führen, da es bereits vorhandene, präadaptiv resistente Mutanten gibt, die sich massenhaft vermehren können. Die rasche Auslese resistenter Formen zwingt zur ständigen Suche nach neuen wirksamen Antibiotika. Es ist notwendig, Ansätze für die Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen zu finden.

Es gibt es eine Vielzahl natürlicher antibakteriell wirkender Stoffe, die vom Immunsystem von Säugern synthetisiert werden, andererseits aber auch von Pflanzen oder von Pilzen stammen können. Auch wenn der eigentliche Wirkort vieler antimikrobieller Peptide nicht die bakterielle Membran ist, so ist sie in jedem Fall das erste Target und stellt eine Barriere dar, die überwunden werden muss.

Die Kathelizidine und Defensine bilden beispielsweise jeweils eine Gruppe antibakterieller Peptide, die im humanen Wirt synthetisiert werden. Der Pilz *Bacillus polymyxa* bildet Polymyxine, eine Gruppe antibiotisch wirkender Peptide. Das von diesen Peptiden am meisten untersuchte, ist das Polymyxin B (PMB). Die Kathelizidine, Defensine und auch Polymyxin sind membranaktive antimikrobielle Wirkstoffe, d.h. sie zerstören bei Gram-negativen Bakterien zunächst die äußere und anschließend die innere Membran durch Bildung

von Läsionen, die zur Permeabilisierung führen. Ein zusammenfassender Überblick hierzu ist in (Wiese et al., 2003) zu finden.

In dieser Arbeit dienen das humane β -Defensin 3 (hBD-3) und PMB als Modellsubstanzen für die Untersuchung der Wechselwirkungsmechanismen zwischen Antibiotikum und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (siehe Kapitel 3.4).

1.2.4 LPS-induzierte Aktivierung von humanen Immunzellen

Eine Infektion mit Gram-negativen Bakterien kann im Wirt immunstimulierende und pathophysiologische Prozesse auslösen. Erstere haben im menschlichen Organismus den Schutz vor den bakteriellen Erregern zum Ziel. Im ungünstigsten Fall können diese Prozesse jedoch auch zum Tod des Wirts führen.

Auslösender Bestandteil dieser Reaktion ist das LPS der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien. Zielzellen des LPS sind Monozyten bzw. Makrophagen im Blutkreislauf, welche eine übergeordnete Rolle beim Erkennen, Phagozytieren und Abtöten der eingedrungenen Bakterien spielen. Sie setzen nach einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden verschiedene Zytokine (Botenstoffe) frei. Dabei ist der Schritt, wie das LPS an die Zelle gelangt und von dort aus ein Signal ins Zellinnere generiert, das die Zytokinproduktion in Gang setzt, noch nicht völlig aufgeklärt. Die Beteiligung einiger Proteine konnte jedoch bereits nachgewiesen werden. Hierbei wird das LPS entweder an membranständige Oberflächenproteine wie z.B. CD14 (Kirkland et al., 1993; Ulevitch und Tobias, 1999), LBP, MD2, Scavenger Rezeptoren (SR) (Haworth et al., 1997), Toll-like Rezeptoren (TLR) (Yang et al., 1998; Kirschning et al., 1999), den purinergen Rezeptor P2X₇ (Hu et al., 1998) oder einen Ionenkanal (Blunck et al., 2000) weitergeleitet, wodurch die Signalkaskade in das Innere der Zelle angetriggert wird.

LPS befindet sich zunächst in monomerer oder aggregierter Form in der wässrigen Zellumgebung. Für seinen Transport zu den zellständigen Rezeptoren werden Transportproteine benötigt. Eines von diesen ist das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP). Dieses wurde bisher als Serumprotein, also als lösliches Protein beschrieben (sLBP) (Schumann et al., 1990). Es soll quasi als Shuttle LPS Monomere aus den Aggregaten herauslösen und an die Zellrezeptoren übergeben. Wir haben deutliche Hinweise, dass LBP auch in den Immunzellen transmembran angeordnet sein kann (mLBP) und so quasi als Fusionsprotein die LPS-Aggregate in die Zellmembran einbaut (Gutsmann et al., 2001a). Die molekulare Interaktion von LBP, LPS und Phospholipidmembranen als Modell für die

Makrophagenmembran soll in dieser Arbeit mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops näher untersucht werden. Hierbei standen die laterale Organisation und eine mögliche Domänenbildung des LBP und die Frage, ob ein LBP-vermittelter Einbau von Lipid A-Aggregaten existiert, im Vordergrund.

1.3 Allgemeine Eigenschaften von Membranen

Natürliche Membranen bestehen hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen. Die charakteristische Bilayerstruktur der Lipide dient als Matrix für Proteine und ist aus einer Vielzahl von Lipiden aufgebaut, die sich in ihrer Größe und Struktur unterscheiden. Das Verständnis der physikalischen Eigenschaften von Membranen, wie z.B. ihre Dynamik und Mikromechanik erfordert Wissen über die Interaktion zwischen verschiedenen Komponenten in Lipiddoppelschichten (Bilayer) auf molekularer Ebene.

Viele Komponenten von Zellmembranen bilden an einer Luft/Wasser Grenzfläche einen dichten Monolayer. Mit der Langmuir-Blodgett Technik ist es möglich, solche Monolayer auf einem festen Untergrund zu übertragen und dann näher zu untersuchen. Dabei wird der Film auf ein festes Substrat aufgetragen (Langmuir-Blodgett Film). Hierfür werden besonders häufig Glas, Graphit oder Glimmer (Mica) verwendet.

Die meisten membranbildenden Phospholipide besitzen pro Molekül zwei ca. 2,5 nm lange Kohlenwasserstoffketten mit 16-18 C-Atomen pro Kette (Israelachvili, 1991; Petty, 1996). An dem der Kopfgruppe zugewandten Ende dieser Kette befindet sich jeweils eine hydrophobe Methylgruppe (CH₃) und am äußeren Ende eine hydrophile Carboxylsäuregruppe (COOH). Sie sind beide essentiell wichtig für den Aufbau einer Membran, ihre Geometrie und ihre folgenden Eigenschaften:

- Kompartimentisierung: Biologische Lipide ordnen sich selbständig in dünnen Membranbilayern an, so dass es verschiedene Regionen innerhalb einer Zelle geben kann und das Zellinnere vor dem Zelläußeren geschützt ist.
- Stabilität: Durch die extrem geringe CMC-Werte bleiben die Phospholipidmembranen sogar dann noch intakt, wenn die Zellumgebung eine sehr geringe Lipidkonzentration besitzt.
- Fluidität: Durch ungesättigte bzw. veresterte Fettsäureketten sind die Membranen bei Zimmertemperatur in einem fluiden Zustand.

Die Kettenschmelztemperaturen von gesättigten C₁₈-Phospholipiden liegen weit über Raumtemperatur, während die in natürlichen Membranen am häufigsten vorkommenden ungesättigte Fettsäuren eine Schmelztemperatur unter 0°C besitzen können. Auf Grund dieser Fluidität sind biologische Membranen bis zu einem bestimmten Punkt leicht verform- und biegsam. Sie erlauben es, dass Moleküle und auch Proteine durch sie passieren können oder sich einbauen.

Der Organisation von Membranen in Mikrodomänen, wie sie bereits 1975 (Morrisett et al., 1975) postuliert wurde, wird mittlerweile eine Schlüsselrolle für die Expression und Regulation von Membranfunktionen zugewiesen (Glaser, 1993; Jacobson et al., 1995; Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998).

Mikrokalorimetrische Messungen (Lee, 1977; Lee, 1978) und Computersimulationen (Mouritsen, 1991; Pedersen et al., 1996) weisen auf eine Bildung von Lipidclustern (Domänen) aus gleichartigen Lipiden unter biologisch relevanten Bedingungen hin.

In neuerer Zeit sind mit Hilfe von Fluoreszenzmethoden, Einzelmolekülmessungen und optischen Pinzetten detergentresistente Membrandomänen (Detergent-resistant membranes (DRMs)) (Brown und London, 1998) nachgewiesen worden. Diese 50 – 1200 nm großen Domänen wurden aus Zell-Lysaten von verschiedenen Säugetieren als Mischung aus Vesikeln und Membranstückchen gewonnen. Sie enthalten eine bestimmte Gruppe von glycosylphosphatidylinositol (GPI-) verankerten Membranproteinen, die in die Signaltransduktion involviert ist, und sind mit Sphingolipiden und Cholesterol angereichert, die in der flüssig-kristallinen Phase Domänen bilden, was auf ihre Detergenzunlöslichkeit zurückgeführt wird (Brown und London, 1997; Brown und London, 1998; Harder und Simons, 1997).

Das Rasterkraftmikroskop ist hervorragend dazu geeignet, die Oberflächentopographie von Membranen und evtl. enthaltener Domänen genauer zu untersuchen, da es zum einen eine um mindestens zwei Größenordnungen höhere Auflösung besitzt als ein optisches Mikroskop (Hoh und Hansma, 1992) und zum anderen gegenüber den Elektronenmikroskopen den Vorteil bietet, dass die Messungen unter natürlichen Bedingungen in Flüssigkeit durchgeführt werden können.

In dieser Arbeit geht es zum einen darum, Domänen in LPS-Monolayern und den möglichen Einfluss antimikrobieller Peptide näher zu charakterisieren und zum anderen, ob sich LBP in Lipidmembranen in Domänen organisiert und in welcher Weise LBP mit Lipid A

wechselwirkt. Beide Komponenten spielen eine wichtige Rolle in der Signalkaskade bezüglich der Ausschüttung von Mediatoren, z.B. $\text{TNF}\alpha$.

2 Material und Methoden

2.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

2.1.1 Allgemeines

Mit dem von Binnig und Rohrer 1982 erstmals vorgestellten Rastertunnelmikroskop (STM) (Binnig et al., 1982) ist es möglich, die Oberfläche von elektrisch leitenden Materialien detailliert mit molekularer bzw. atomarer Auflösung aufzunehmen. Eine Weiterentwicklung dieses sogenannten STM (von engl.: *scanning tunnel microscope*) stellt das Rasterkraftmikroskop oder *atomic force microscope*, kurz AFM dar (Binnig et al., 1986). Da die Messungen nicht im Vakuum stattfinden, ist es möglich, Bilder von biologischen Proben zu erhalten, die dafür nicht zwangsläufig elektrisch bedampft werden müssen. Es sind sogar Aufnahmen in einer wässrigen Umgebung möglich.

Da die Rasterkraftmikroskopie noch eine relativ neue Möglichkeit zur biophysikalischen Untersuchung darstellt, soll im Folgenden die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Methode ausführlich vorgestellt werden.

Das Messprinzip des AFM beruht auf einer von Ort zu Ort wechselnden Kraft zwischen der Tastspitze und der Probe und ist in einem statischen und in einem dynamischen Mode anwendbar.

Im **statischen Mode**, der meistens *contact*, *repulsive* oder auch *DC mode* (Binnig et al., 1986) genannt wird, bringt man die Spitze, die sich am Ende eines sehr kleinen Federbalkens (*cantilever*) befindet, mit der zu untersuchenden Probe in direkten Kontakt. Während der ersten Berührung erfahren die Atome der Cantileverspitze eine repulsive Kraft, die durch den Überlapp ihrer Elektronenorbitale mit denen von den Atomen der Probe herrührt.

Der **dynamische Mode**, der *noncontact*, *tapping* oder *AC mode* genannt wird, zeichnet sich dadurch aus, dass die Spitze zwar in räumliche Nähe (einige Femtometer) zur Probe gebracht wird, sie jedoch noch nicht berührt. Der Cantilever wird dabei durch einen Anregungspiezo in eine Schwingung versetzt, die entweder amplituden- (Martin et al., 1987) oder frequenzmoduliert (Martin et al., 1987; Sarid und Elings, 1991; Anczykowski et al., 1996; Giessibl, 1995) sein kann. Zwischen der Spitze und der Probe wirken sehr schwache attraktive van der Waals Kräfte.

In beiden Modi wird die Oberflächentopographie durch laterales Abtasten der Probe in der x-y-Ebene unterhalb der Cantileverspitze gemessen, während gleichzeitig die Kräfte bzw. die Gradienten der Kräfte zwischen Spitze und Oberfläche aufgenommen werden. Um Informationen über die Topographie zu erhalten, werden die wirkenden Kräfte als Kontrollparameter für einen Regelmechanismus verwendet, der die Kraft bzw. den Kraftgradienten auf einem konstanten Wert hält.

Durch die veränderte Durchbiegung des Cantilevers mit einer bekannten Federkonstante, hervorgerufen durch die Interaktion mit der Probe, wird die auf den Cantilever wirkende Kraft erfasst. Zur Messung dieser Durchbiegung sind bereits verschiedene Methoden erfolgreich eingesetzt worden:

- Detektion eines Tunnelstroms zwischen dem Cantilver und einer Spitze, die sich über dem Cantilever befindet (Binnig et al., 1986)
- Detektion einer Kapazitätsänderung zwischen dem Cantilever als die eine und einer weiteren Elektrode als die zweite Kondensatorplatte (Neubauer et al., 1990; Goddenhenrich et al., 1990)
- Detektion einer Auslenkung des Cantilevers durch eine Piezo-Beschichtung (Stahl et al., 1994; Kassing und Oesterschulze, 1997)
- Optische Detektion, z.B.
 1. Interferometrische Detektion (Erlandsson et al., 1988; Jarvis et al., 1993; Mate, 1992; Mate et al., 1987)
 2. optische Polarisierung (Schoenenberger und Alvarado, 1989; Schoenenberger und Alvarado, 1990),
 3. Laserdioden-Rückkopplung (Sarid et al., 1988) und
 4. Laserstrahlauslenkung (*laser beam deflection*) (Meyer und Amer, 1990b; Meyer und Amer, 1990a; Meyer und Amer, 1988; Marti et al., 1990; Alexander et al., 1989) (siehe Abb. 3)

Bei der Anwendung der **Laserstrahlauslenkung** (Abb. 3) wird ein Laserstrahl auf den Cantilever gerichtet und von dort auf einen Photodetektor reflektiert, der die Auslenkungen des Cantilevers registriert. Diese Methode hat den größten Arbeitsabstand, ist am insensitivsten gegenüber Abstandsänderungen, gleichzeitig aber hochsensitiv bzgl. der Auflösung und ist außerdem dafür geeignet, Winkeländerungen, die durch Reibungskräfte

hervorgerufen werden, zu messen (sogenannte *friction force* Messungen) (Sarid und Elings, 1991; Meyer, 1992). Aus diesem Grund wird bei kommerziell erhältlichen Rasterkraftmikroskopen diese Art der Messung der Kraft zwischen Spitze und Probe am häufigsten genutzt. Die Auslenkung des Laserstrahls auf den Photodetektor wird als *Deflection* bezeichnet. Einige englische Begriffe in der Rasterkraftmikroskopie finden auch im Deutschen Verwendung und werden deshalb in dieser Arbeit nicht übersetzt.

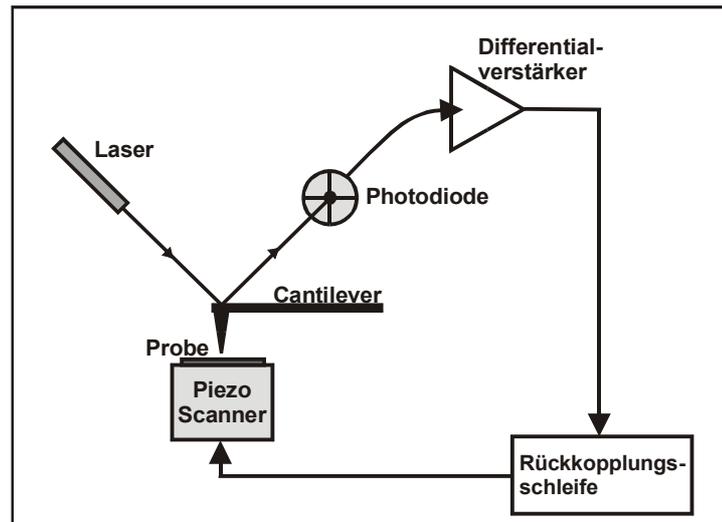


Abb. 3: Detektion der Auslenkung des Cantilevers durch die Reflexion eines Laserstrahls (*laser beam deflection*)

In der vorliegenden Arbeit sind das MFP-3D (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) und das Nanoscope III (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) verwendet worden. Beide Rasterkraftmikroskope haben einen Photodetektor, der in Segmente aufgeteilt ist. Von dort wird das Rohsignal an einen Vorverstärker weitergeleitet, der wiederum seine Information über eine Translationsbox an den Controller gibt. In dieser Translationsbox wird das analoge Signal des auf den Photodetektor treffenden Laserstrahls für die in dem Controller befindlichen DSPs (*digital signal processors*) in ein digitales Signal konvertiert. Der vierte Teil dieses Regelkreises ist der Hochspannungs (HV) - Verstärker. Der Input dieses Verstärkers kommt von dem analogen Signal der Translationsbox. Das kleine Spannungssignal wird auf typischerweise ± 150 V verstärkt und steuert wiederum einen piezoelektrischen Scanner an. Die Ansteuerungseinheit für den Laser befindet sich meistens zusammen mit dem Vorverstärker in einer von der Translationsbox und dem HV-Verstärker

abgeschirmten Einheit, um deren elektrische Störungen zu entkoppeln. Der schematische Aufbau eines AFM ist in Abb. 4 abgebildet.

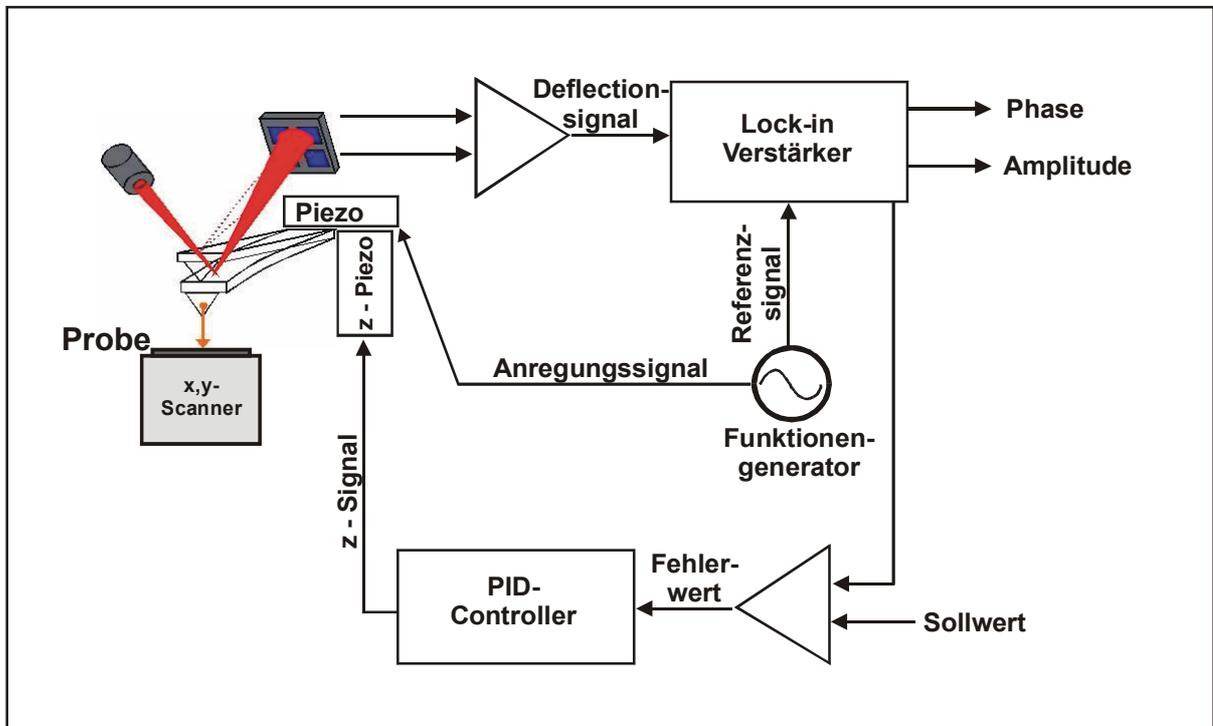


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines im AC Mode betriebenen Rasterkraftmikroskops. Der reflektierte Laserstrahl wird von einer Photodiode detektiert. Über ein externes Modul, das den AC-Piezo ansteuert, wird die Anregungsfrequenz gewählt. Ein Lock-in Verstärker analysiert Amplitude und Phase der Cantileverschwingung. Um die z-Höhe des Cantilevers richtig einzustellen, wird die Amplitude als Rückkopplungssignal für den Abstand zwischen Spitze und Probe genutzt.

Zum Scannen der Probe werden **Piezos** benutzt. Dabei verursacht ein angelegtes elektrisches Feld eine Strukturveränderung des Piezokristalls, so dass es in bestimmten Richtungen zu einer Ausdehnung und in anderen Richtungen zu Kontraktionen kommt. Im ersten STM ist mit einem Piezo-Dreibein (*Tripod Piezo*) gecannt worden (Binnig et al., 1982). Diese Tripod Piezos waren relativ groß (ca. 50 mm) und sehr temperaturempfindlich.

Heute werden in den meisten AFMs sogenannte Tube Scanner verwendet (Binnig und Smith, 1986; Chen, 1992). Diese haben bei kleiner Größe einen großen Ausdehnungsbereich, so dass ein großer Scanbereich gewährleistet ist. Piezoelektrische Tube Scanner besitzen eine relativ niedrige Resonanzfrequenz um 5-10 kHz. Aus diesem Grund sind sie nicht für schnelles Arbeiten geeignet, da dann Resonanzschwingungen auftreten. Der mögliche Scanbereich nimmt mit der Länge des Piezos zu. Andererseits verschiebt sich die Resonanzfrequenz mit

zunehmender Länge zu niedrigeren Werten. Man kann also nicht mit jedem Piezo jeden Bereich gleich schnell abtasten. Je größer der Scanner ist, desto langsamer muss man scannen, um eine gute Auflösung zu erzielen.

Auch die Auflösung des Piezos nimmt mit seiner Länge ab. Je länger der Kristall ist, desto größer ist auch seine Ausdehnung bei einer angelegten Spannung, so dass jedes Störsignal eine große Auslenkung des Scanners verursacht. Deswegen kann man bei einigen AFMs je nach Probengröße die Scanner austauschen und es auf die individuellen Eigenschaften der Probe anpassen. Im verwendeten MFP-3D wurde der Scanner durch sogenannte Piezo-Stacks, d.h. gestapelte Piezokristalle realisiert, die die Probe in einer Ebene bewegen. Der Vorteil an diesem Aufbau ist, dass die Probe in einer planen Ebene bewegt wird und nicht wie bei dem Tube Scanner auf einem Kugelsegment. Außerdem ist die Messung der Auslenkung mittels Sensoren deutlich vereinfacht. Sensoren können z.B. Änderungen von Kapazitäten oder Induktivitäten (mit Hilfe von LVDTs (*Linear Variable Differential Transformer*)) ausnutzen, um die Position des Piezos zu bestimmen. Mit dieser Information werden Drift- und Hystereseeffekte kompensiert.

Damit die Spitze die Probe immer kontrolliert abscannt, arbeitet das gesamte System in einer Rückkopplungsschleife. Anhand des DC Modes soll der Regelkreis beispielhaft erklärt werden:

Im DC Mode berührt die Cantileverspitze die Oberfläche der Probe, ganz ähnlich wie ein Plattenspieler, der mit seiner Nadel über eine Platte fährt. Dazu wird die Spitze auf die Probe gebracht und dann durch den piezoelektrischen Scanmechanismus in z-Richtung um einen bestimmten Abstand bewegt. Dies führt bei Berührung der Probe zu einer Auslenkung des Cantilevers, und damit zu einer Änderung des Deflectionsignals. Bevor man mit der Messung beginnt, legt man durch die Wahl des Sollwerts fest, welchen „Durchbiegungs-Offset“ der Cantilever haben soll. Dieser Sollwert soll während des gesamten Abtastvorgangs durch die Rückkopplungsschleife möglichst konstant gehalten werden. Die Rückkopplungsschleife wird wiederum von den DSPs des Controllers gesteuert.

Während des Messvorgangs schwankt der reale Wert des Sollwerts ständig um den Vorgabewert (on-off Mechanismus). Damit auf die Probeneigenschaften möglichst schnell und genau reagiert werden kann, wird mit einer **PID** (proportionaler, integraler und derivativer) **Verstärkung** gearbeitet (siehe Abb. 5).

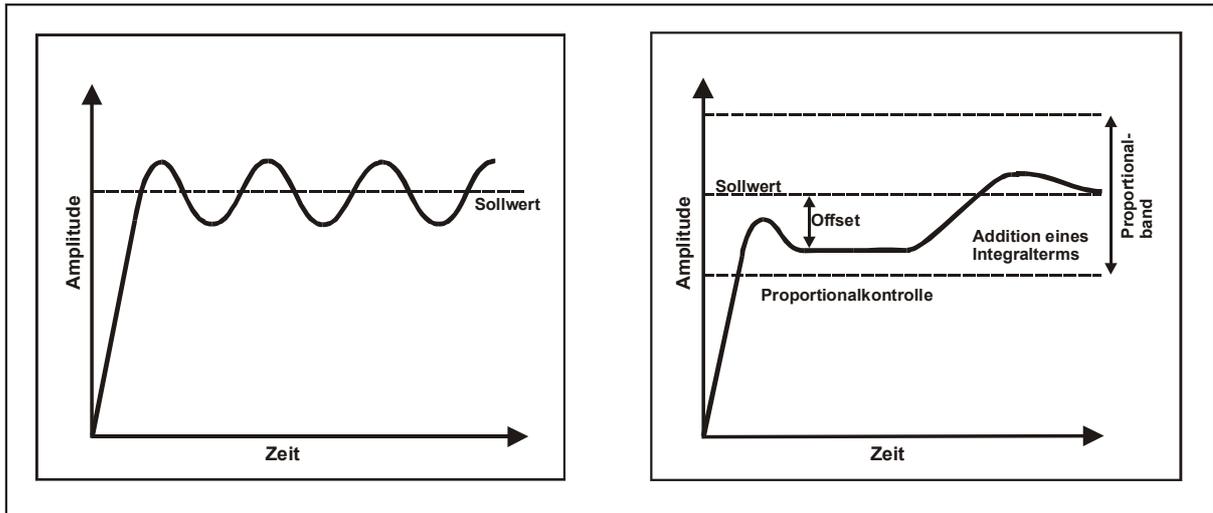


Abb. 5: Verdeutlichung der Unerreichbarkeit des Sollwerts (links). Die Amplitude schwankt ständig um einen bestimmten Wert. Eine PID Verstärkung sorgt für die bestmögliche Annäherung an den Sollwert (rechts).

Der Proportionalterm verstärkt die Abweichung zwischen gewünschtem Sollwert und dem gemessenen Wert, um die Größenordnung des Korrektursignals festzustellen. Dies geschieht dadurch, dass ein Proportionalband definiert wird. Wenn es beispielsweise 20 % sind, so ist die Proportionalverstärkung 5. Je höher die Verstärkung, desto kleiner ist das Proportionalband. Die Breite des Proportionalbands bestimmt die Größe der Antwort auf die Abweichung. Die Proportional-Kontrolle führt dazu, dass der neue Wert für den Sollwert leicht niedriger oder höher ist als der angestrebte Sollwert. Theoretisch ist es möglich, diese Abweichung durch einen geringeren Verstärkungswert zu verkleinern. In der Praxis führt dies allerdings dazu, dass das System instabil wird und anfängt zu schwingen. Der Grund dafür liegt darin, dass es bei jeder Änderung des Proportionalbandes zu einer Umkehr des on-off Mechanismus für den Sollwert kommt.

Eine bessere Lösung ist es, einen Integralterm über die Abweichung zum Sollwert für einen kleinen Zeitraum hinzuzuaddieren. Dieser Zeitraum darf jedoch auch nicht zu klein sein, da es sonst auch hier zu Schwingungen kommt, die davon herrühren, dass der Piezo nicht schnell genug reagiert.

Je nach Bedarf wird dann noch ein derivativer Term hinzugezogen, der proportional zur Änderungsrate des Kontrollsignals ist. Damit kann schnell auf kleine Abweichungen vom Sollwert, also auf kleine Probenmerkmale, reagiert werden. Zudem kann dieser Term auch

kleine Schwingungen verringern. Wird die derivative Verstärkung jedoch zu hoch gewählt, kommt es zu hochfrequentem Rauschen.

Der Scanvorgang selbst kommt durch Ansteuerungssignale auf die x-y-Elektroden des Piezo Scanners zustande, so dass die Probe abgerastert wird. Dabei bewegt sich die Spitze bzw. die Probe in x-Richtung schneller als in y-Richtung. Aus diesem Grund spricht man bei rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen auch von der *slow* und *fast scan direction* (siehe Abb. 6).

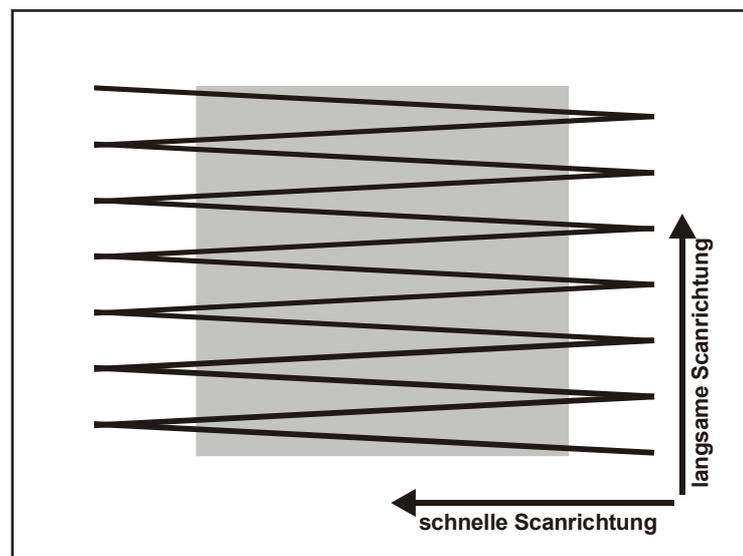


Abb. 6: Das Bild eines Rasterkraftmikroskops entsteht durch eine Abrasterung einer Oberfläche. Man spricht von einer schnellen und einer langsamen Scanrichtung. An den Umkehrpunkten zwischen zwei Abtastlinien befinden sich die xy-Piezos in einem nichtlinearen Bereich. Für das Endbild wird deshalb nur das Innere des Abtastbereichs verwendet.

Wenn die Cantileverspitze auf ein Objekt trifft, biegt sich also der Cantilever durch und die Rückkopplungsschleife regelt in die jeweilige z-Richtung nach, damit der selbstgewählte Wert des Sollwertes wieder erreicht wird.

Das Bild wird generiert, indem die z-Daten des Regelkreises gegen die x- und y- Position des Cantilevers aufgetragen werden.

Wichtig ist: Ein Höhenbild im DC Mode wird aus dem Signal des Feedback Loops erzeugt und nicht direkt von dem Deflectionsignal abgelesen.

Um aus den xyz-Rohdaten ein erkennbares Bild zu generieren, wird bei der Software-unterstützten Auswertung (Igor Pro / MFP-3D und Nanoscope III 5.12r3) einer Aufnahme

zunächst für jeden Punkt einer gescannten Linie der durchschnittliche Höhenwert abgezogen. Das führt dazu, dass alle Linien auf gleicher Höhe liegen (Normalisierung). Falls nötig, wird anschließend eine bestmögliche Ebene berechnet, die durch alle einzelnen heruntergerechneten Linien passt.

Der gängigste Aufnahmemodus ist das Höhenbild. Diese topographische Aufnahme entsteht im Falle des Nanoscopes, wie oben bereits erwähnt, durch die vertikalen Bewegungen des Tube Scanners. Die Probe wird in x-, y-, und auch z-Richtung bewegt. Bei dem MFP-3D sorgen insgesamt drei Piezostapel (*Piezo stacks*) für die Bewegung. Dabei wird die Probe in x- und y-Richtung bewegt, während der Messkopf mit dem Cantilever in z-Richtung durch die Rückkopplungsschleife nachgeregelt wird.

Durch Luftfeuchtigkeit bildet sich sehr leicht eine Wasserschicht auf der Probe, so dass es zu unerwünschten Kapillarkräften zwischen dem Cantilever und der Probe kommt. Indem die Messungen unter Wasser durchgeführt werden, kann dieses Adhäsionsproblem umgangen werden. Dies ist allerdings nur bei dafür geeigneten Proben möglich, z.B. löst sich ein auf Mica (Glimmer) aufgetragener Lipidmonolayer ab, sobald man ihn mit Wasser benetzt. Lipidbilayer hingegen sind nur unter Wasser stabil (Benz et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit werden Monolayer folglich immer an Luft und Bilayer unter Wasser abgescannt.

Im AC Mode gibt es als weitere wichtige Meßgröße die **Phase**, genauer die Phasenlage der Cantileverschwingung gegenüber der Phase der Anregungsfrequenz.

Zu dem Zeitpunkt, wenn die Spitze die Probe schon fast berührt, ist die Phase des Cantilevers nicht mehr im Gleichklang mit der der Anregungsschwingung. Der Grund liegt darin, dass die Cantileverspitze bei jeder Berührung an die darunter liegende Probe einen kleinen Energiebetrag abgibt. Wie hoch dieser Betrag ist, hängt von der Beschaffenheit der Probe ab. Man kann also anhand des Phasenbildes Informationen über die Energiedissipation gewinnen und somit Aufschluß über Probencharakteristika erhalten (Chen et al., 2002; Cleveland et al., 1998). Diese Möglichkeit wird in Kapitel 3.3.3 noch genauer erläutert.

Der oszillierende Cantilever besitzt drei Freiheitsgrade: Amplitude, Frequenz und Phase zwischen Anregung und Schwingung. Anhand eines gedämpften harmonischen Oszillators soll dies nun genauer betrachtet werden.

Der Cantilever befindet sich in räumlicher Nähe (z-Richtung) zu einem mit der Amplitude A_d mit der Frequenz ω schwingenden Piezo:

$$z_d = A_d \cos(\omega t). \quad (1)$$

Es wird angenommen, dass der Cantilever dem Hookeschen Gesetz folgt. Es wird außerdem eine Reibungskraft eingeführt, die proportional zur Geschwindigkeit der Cantileverbewegung ist, wobei α der Dämpfungskoeffizient ist. Zusammen mit dem ersten Newtonschen Gesetz kommt man dann auf folgende Differentialgleichung für die Position $z(t)$ der Cantileverspitze:

$$mz''(t) = -\alpha z'(t) - kz(t) - kz_d(t). \quad (2)$$

Mit $\omega_0^2 = \frac{k}{m}$, der Resonanzfrequenz des freischwingenden ($\alpha = 0$) Cantilevers und dem

Qualitätsfaktor $Q = \frac{m\omega_0}{\alpha}$ folgt:

$$z''(t) + \left(\frac{\omega_0}{Q}\right)z'(t) + \omega_0^2 z(t) = A_d \omega_0^2 \cos(\omega t). \quad (3)$$

Dabei beschreibt der Qualitätsfaktor, nach welcher Anzahl von Schwingungen die Amplitude ohne äußere Anregung ($A_d = 0$) auf den Wert $1/e$ der Ausgangsamplitude abgefallen ist.

Die Lösung dieser Differentialgleichung muß für zwei Zeitabschnitte betrachtet werden (Albrecht et al., 1991). Startet man aus der Ruhelage und regt den Cantilever zum Zeitpunkt $t = 0$ mit Hilfe des Piezos an, so wird die Amplitude von Null auf ihr Maximum steigen und dort eine Gleichgewichtsposition einnehmen, bei der Amplitude, Phase und Frequenz konstant sind. Diese Gleichgewichtslösung $z_1(t)$ wird nach $2Q$ Schwingungen erreicht und folgt der externen Anregung mit der Amplitude A_0 und einer Phase φ .

$$z_1(t) = A_0 \cos(\omega t + \varphi). \quad (4)$$

Im Zeitraum während der ersten $2Q$ Schwingungen folgt die Amplitude folgender Lösung :

$$z_2(t) = A_t e^{\frac{\omega_0 t}{2Q}} \sin(\omega_0 t + \varphi_t). \quad (5)$$

$z_2(t)$ nimmt demzufolge exponentiell mit der Zeitkonstante $\tau = 2Q / \omega_0$ ab.

Setzt man die Lösung $z_1(t)$ in die Differentialgleichung (3) ein, so ergibt sich als Lösung für die Amplitude und Phase der Schwingung eine Gleichung in Abhängigkeit zur Anregungsfrequenz ω (siehe Abb. 7):

$$A_0 = \frac{A_d Q \omega_0^2}{\sqrt{\omega^2 \omega_0^2 + Q^2 (\omega_0^2 - \omega^2)^2}} \quad (6)$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{\omega \omega_0}{Q(\omega_0^2 - \omega^2)}\right). \quad (7)$$

Vorausgesetzt, dass Q endlich ist, kann man aus der Gleichung (6) für die Amplitude A_0 entnehmen, dass A_0 ihr Maximum bei einem Wert erreicht, der ungleich ω_0 ist. Diese Verschiebung von ω_0 nach ω_0^* wird durch den Dämpfungsterm des harmonischen Oszillators verursacht (siehe Abb. 7):

$$\omega_0^* = \omega_0 \sqrt{1 - \frac{1}{2Q^2}}. \quad (8)$$

Für $Q > 100$ ist diese Verschiebung zu vernachlässigen, was für die meisten Messungen in Luft oder Vakuum zutrifft. Bei Messungen unter Wasser kommt es hingegen zu Werten für Q , die kleiner als zehn sind, so dass sich große Unterschiede zwischen ω_0 und ω_0^* ergeben.

Für $\omega = \omega_0^*$ gilt für die Amplitude A_0 :

$$A_0 = Q A_d. \quad (9)$$

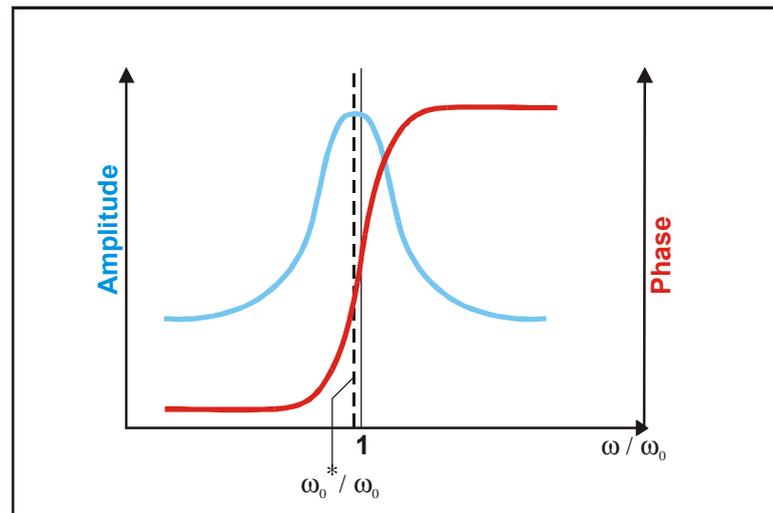


Abb. 7: Verlauf der Cantileveramplitude und-phase in Abhängigkeit zur Anregungsfrequenz ω . ω_0^* ist diejenige Frequenz, zu der die Schwingungsfrequenz des freischwingenden Cantilevers bei kleinen Qualitätsfaktoren Q (< 10) verschoben wird. Dies tritt v.a. bei Messungen unter Wasser auf. Bei großem Q (> 100 ; Messungen im Vakuum oder in Luft) ist die Verschiebung zu vernachlässigen, so dass die Phase im Resonanzfall in der Regel einen Wert von 90° besitzt.

Im Resonanzfall ergibt sich für die Phase ein Wert von ca. 90° . Im attraktiven Mode liegt die Phase oberhalb der Phase bei Resonanz und im repulsiven Mode unterhalb (hierzu siehe auch Kapitel 3.3.3).

Es ist eine hohe Resonanzfrequenz wünschenswert, weil man die Sensitivität gegenüber der Gebäudeschwingung (10-100 kHz) möglichst gering halten will. Dies erfordert einen Cantilever mit einer niedrigen Federkonstante (0,05 – 1 N/m) und einer möglichst geringen Masse (Größenordnung 1 ng). Die meisten handelsüblichen Cantilever werden aus Silizium oder Siliziumnitrid mit Hilfe von photolithographischen Techniken hergestellt. Sie sind ca. 100 μm lang und bis zu 1 μm dick.

Die Wechselwirkung zwischen den Atomen von Spitze und Probe im Abstand x lässt sich mit dem Lennard-Jones Potential beschreiben (siehe Abb. 8):

$$V(r) = 4\varepsilon \left\{ \left(\frac{\sigma}{x} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{x} \right)^6 \right\}. \quad (10)$$

Dabei sind die Lennard-Jones Energie ε und der Lennard-Jones Durchmesser σ Materialkonstanten.

Für $x < \sigma$ steigt der $1/x^{12}$ Term stark an. Dieser kurzreichweitige Bereich spiegelt das Pauli-Prinzip wieder, nach dem kein Quantenzustand mehrfach besetzt werden kann und sich die Atome deswegen stark abstoßen.

Der $1/x^6$ Term hingegen ist für den langsamen Wechsel zu einem attraktiven Verhalten verantwortlich. Bei diesen langreichweitigen Kräften spielen die van der Waals Kräfte eine wichtige Rolle, welche auf einer gegenseitigen Induktion von Dipolmomenten beruhen.

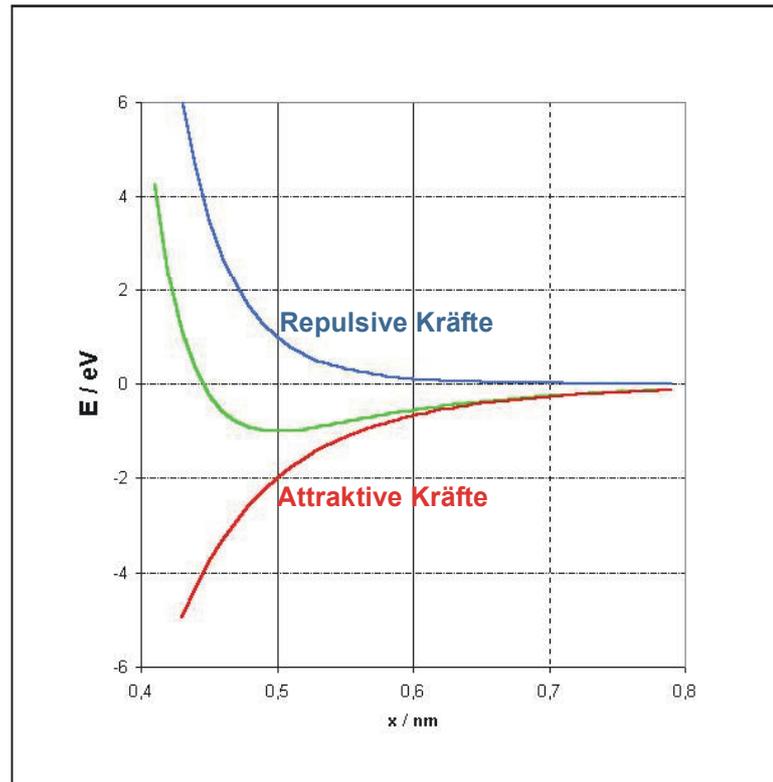


Abb. 8: Verlauf der auf den Cantilever wirkenden Kräfte in Abhängigkeit zum Abstand x zur Probe: Die attraktiven (mit $1/x^6$ verlaufenden) Kräfte sind in rot, die repulsiven (mit $1/x^{12}$ verlaufenden) Kräfte in blau dargestellt. Das resultierende Lennard-Jones Potential ist in grün eingezeichnet.

Betrachten wir zum Schluss dieser methodischen Einführung noch, wie sich das Deflectionsignal während der Annäherung des Cantilevers an die Probe verhält (Abb. 9):

Ist der Cantilever weit von der Probe entfernt, wirkt auf ihn keine Kraft, d.h. das Deflectionsignal ist Null. Wird er ein wenig dichter an die Probe gebracht, fangen die langreichweitigen van der Waals Kräfte an, auf ihn zu wirken. Dabei wird der Cantilever zunächst durch die überwiegenden anziehenden Kräfte zwischen Cantilever und Probe beeinflusst. Dies wird durch eine Veränderung des Amplitudensignals deutlich, welches sich bereits zu höheren Werten verschiebt, obwohl das Deflectionsignal noch gleich geblieben ist.

Die Amplitude bietet eine hochempfindliche Möglichkeit zur vorsichtigen Annäherung der Cantileverspitze an die Probe. Durch die Veränderung der Amplitude wandelt sich auch die Phase des Cantilevers. Man spricht bei einer Verschiebung des Phasensignals aus der Ruhelage (meistens 90°) zu höheren Werten vom attraktiven Mode. Bei weiterer Annäherung trifft der Cantilever auf die Probenoberfläche, was durch den Anstieg des Deflectionsignals deutlich wird. Die Phase verschiebt sich zu kleineren Werten als in der Ruheposition, man befindet sich im repulsiven Mode. Hier überwiegen die abstoßenden Kräfte (siehe Lennard-Jones Potential). Der Nulldurchgang im Lennard-Jones Potential ist für das Abbilden der Oberfläche am besten geeignet. (Abb. 8).

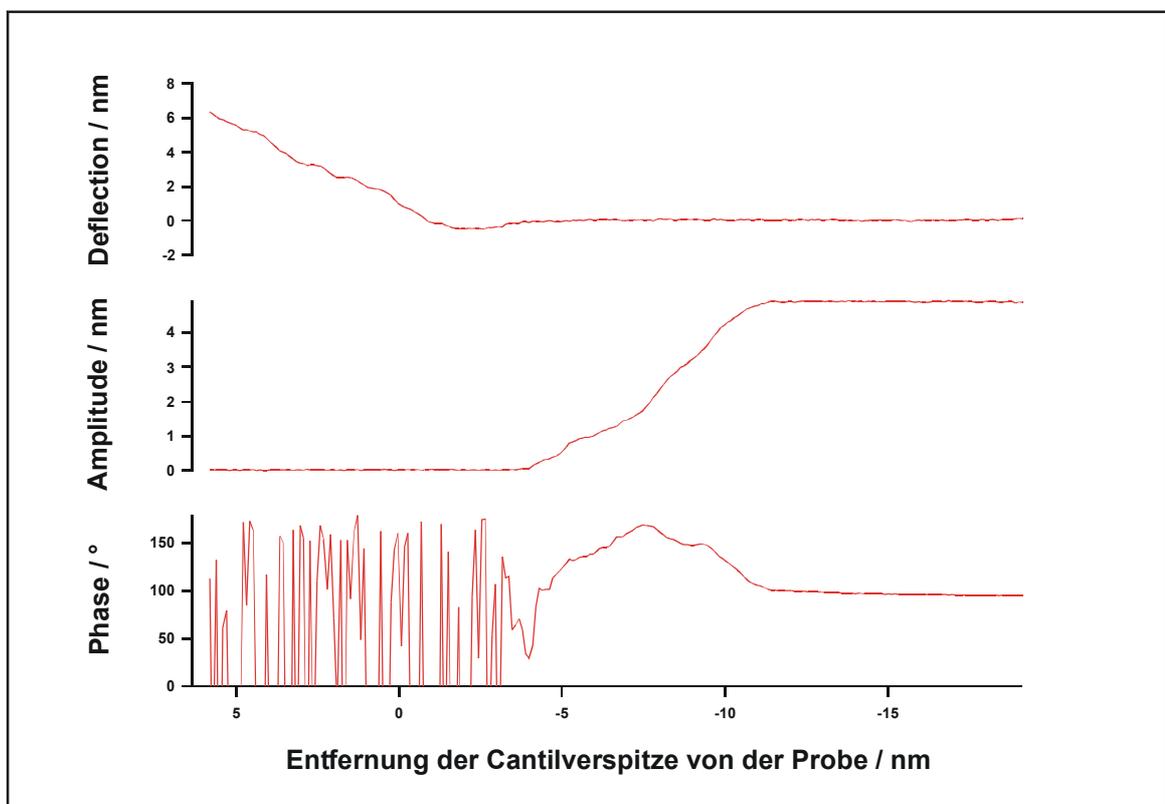


Abb. 9: Annäherung des Cantilevers an die Probe. Zunächst befindet sich der Cantilever weit weg von der Oberfläche der Probe. Kommt es zu einer Annäherung, so verringert sich als erstes das Amplitudensignal, da langreichweitige attraktive Kräfte anfangen, auf den Cantilever zu wirken. Durch die Veränderung der Amplitude wandelt sich auch die Phase des Cantilevers. Bei einer Verschiebung des Phasensignals aus der Ruhelage (meistens 90°) zu höheren Werten spricht man vom attraktiven Mode. Durch weitere Annäherung trifft der Cantilever auf die Probenoberfläche, erkennbar durch den Anstieg des Deflectionsignals. Die Phase verschiebt sich hin zu kleineren Werten als in der Ruheposition, man spricht vom repulsiven Mode, in dem überwiegend abstoßende Kräfte wirken (Lennard-Jones Potential). Der Nulldurchgang im Lennard-Jones Potential (siehe Abb. 8) ist für das Abbilden der Oberfläche am besten geeignet.

2.1.2 Mica

Das in der Rasterkraftmikroskopie am meisten verwendete Substrat ist Mica, zu deutsch Glimmer. Es ist ein in großem Maß vorhandener Rohstoff, der relativ wenig kostet.

Glimmer (Ruby Red Mica Sheets, bezogen von der Firma Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA, USA), der auch als Muskovit Mica bezeichnet wird, besteht aus vielen dünnen kristallinen Schichten mit einer Dicke von ca. 1 nm. Durch einfaches Abziehen mit Tesafilm kann man sie leicht voneinander trennen. Dadurch erhält man eine saubere Oberfläche, die über eine große Entfernung (einige μm) atomar flach ist. Diese Eigenschaft ist sehr wichtig für eine atomare Auflösung bei der Abbildung von Molekülen, wie z.B. im Fall des LPS-bindenden Proteins LBP (Abb. 31). Mica hat eine negativ geladene, hydrophile Oberfläche. Das hat für die in dieser Arbeit erstellten Langmuir-Blodgett (LB) Filme zur Folge, dass sich die Lipide und Endotoxine mit ihren Kopfgruppen an die Substratfläche anlagern. Die chemische Formel für Muskovit Mica lautet $(\text{KAl}_2(\text{OH})_2 \text{AlSi}_3\text{O}_{10})$.

Weitere häufig verwendete Substrate sind Graphit, das eine hydrophobe Oberfläche besitzt, und Glas, welches seine Anwendung häufig bei größeren Proben, wie z.B. Zellen findet, da hierbei meistens keine molekulare Auflösung vonnöten ist.

2.1.3 Cantilever

Es wurden verschiedene Cantilever aus Silizium und Siliziumnitrid mit einer Goldbeschichtung auf der der Spitze abgewandten Seite verwendet (Tabelle 1). Die Goldbeschichtung dient einer verbesserten Reflektion des Laserstrahls. Für die meisten Messungen, sowohl in Luft (DC Mode) als auch in wässriger Umgebung (AC Mode) war Nummer E des MSCT-AUNM, ein mittelweicher Cantilever (0,1 N/m), oder der NSG11, ein mittelharter Cantilever (11 N/m), geeignet. Um Messungen im repulsiven und attraktiven Mode an Luft durchführen zu können, hat sich ein sehr harter Cantilever aus Silizium (AC160TS) als vorteilhaft erwiesen. Einige Messungen im AC Mode in wässriger Umgebung sind auch mit dem AC240TS vorgenommen worden. Es ist relativ schwer, Aussagen darüber zu treffen, welcher Cantilever für welche Probe geeignet ist. Gerade bei Messungen in wässriger Umgebung, aber auch bei Messungen an Luft hängt der Erfolg davon ab, welche Ionen sich in der Subphase befinden, wie die Probenbeschaffenheit ist und aus welchem Material der Cantilever besteht. Generell sind Cantilever aus Siliziumnitrid chemisch inerte gegenüber Wechselwirkungen mit der Probe. Es sollte außerdem noch erwähnt werden, dass

die meisten Cantilever sowohl für Messungen im AC als auch im DC Mode geeignet sind, auch wenn die Hersteller dies nicht vorsehen. Eine Darstellung verschiedener Cantilevertypen befindet sich in Abb. 10.

Cantilever	Hersteller	Federkonstante $k / \text{N} \cdot \text{m}^{-1}$	Resonanzfrequenz an Luft $f_{\text{res}} / \text{kHz}$	Verwendete Modi
MSCT-AUNM Cantilever E	Veeco Instruments GmbH, Mannheim, Germany	0,1	38	Luft DC Wasser AC
NSG11 Cantilever A	NT-MDT, Moskau, Russland	11,5	255	Luft AC
AC160TS	OLYMPUS OPTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan	40	300	Luft AC
AC240TS	OLYMPUS OPTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan	2	70	Luft DC

Tabelle 1: Herstellerangaben zu den verwendeten Cantilevern

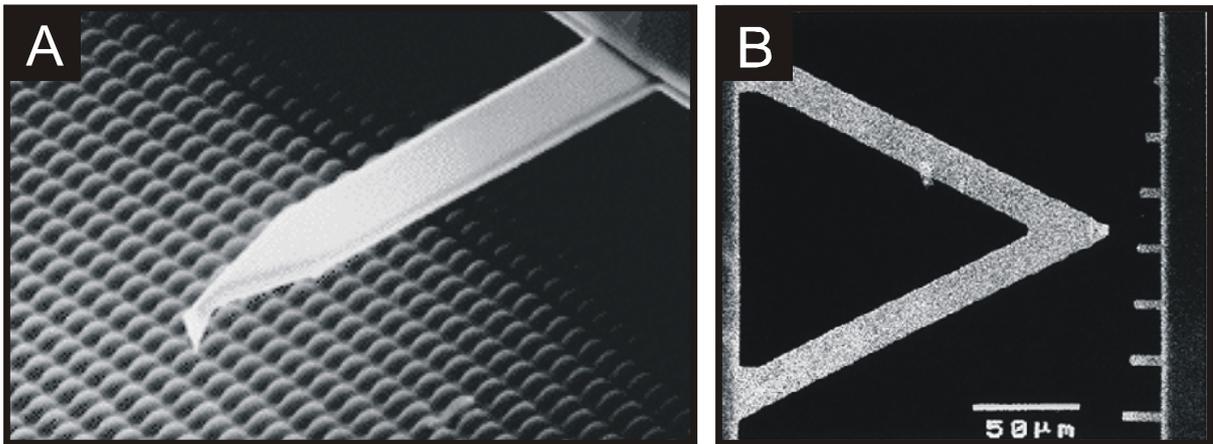


Abb. 10: Darstellung verschiedener Cantilevertypen. (A) Rechteckige (*diving board*) und (B) V-förmige (*triangular*) Cantilever. Die Spitzen der in (B) abgebildeten Cantilever zeigen aus der Bildebene heraus. In (B) sind ganz rechts extrem kleine Cantilever zu sehen. Sie besitzen eine sehr hohe Resonanzfrequenz und liefern somit eine besonders hohe Auflösung. Da es sich bei den kleinen Cantilevern nicht um handelsüblich erhältliche handelt, sind in der vorliegenden Arbeit die normal großen rechteckigen bzw. V-förmigen Cantilever verwendet worden. Die Abbildungen sind entnommen: (A) Olympus Homepage, (B) Paul Hansma (UCSB) Santa Barbara, CA, USA)

2.1.4 Kraftkurven

Mit Hilfe von Kraftkurven ist es möglich, Bindungen zwischen einzelnen Molekülen nachzuweisen (Biggs, 1995), Proteindomänen zu detektieren (Rief et al., 1997), und Schichtdicken von Membranen zu bestimmen (Franz et al., 2002). Auch Elastizitätsmessungen an ganzen Zellen sind mittels dieser Methode möglich (Hassan et al., 1998). Dabei werden die zwischen Cantileverspitze und Probe wirkenden Kräfte gemessen. Zu diesem Zweck werden sogenannte Kraft-Abstandskurven aufgenommen (siehe Abb. 11). Hierbei bleibt die x- und y-Position fest und nur der Cantilever wird in z-Richtung auf die Probe zubewegt und wieder von ihr weggezogen. Bei den aufgenommenen Kurven handelt es sich also zunächst um das in Abhängigkeit von der z-Spannung bzw. des Detektorsignals ($LVDT_z$ -Signal) aufgenommene Deflectionsignal des Cantilevers.

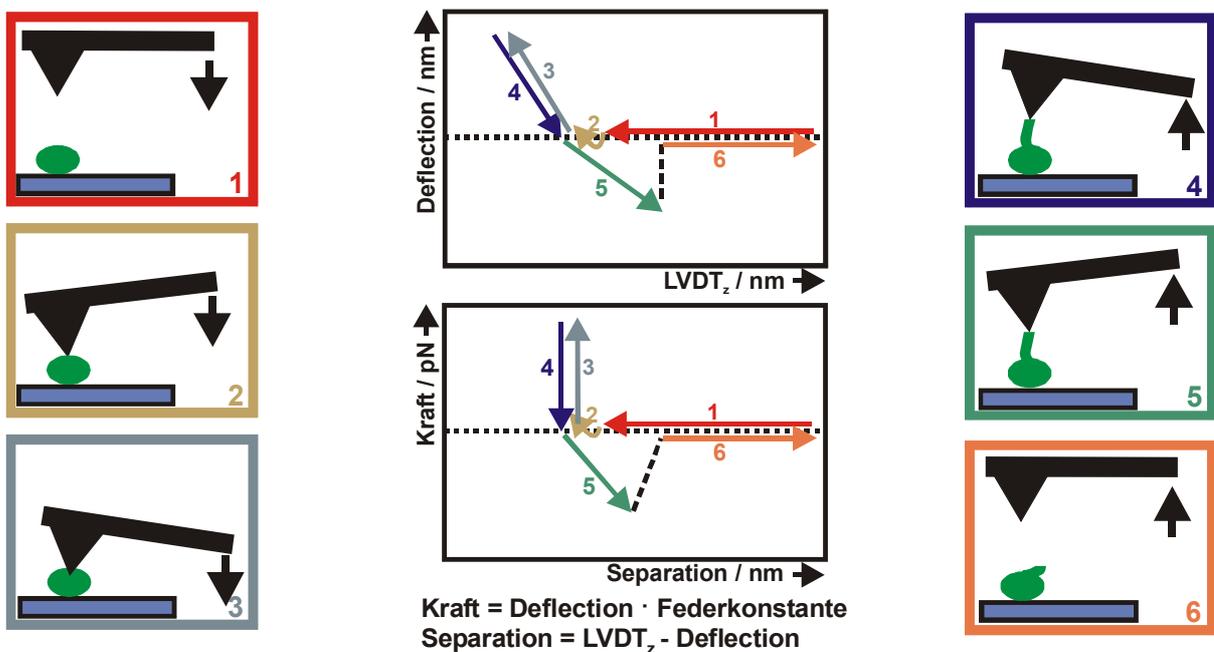


Abb. 11: (Mitte) Schematische Darstellung des typischen Verlaufs einer Kraft-Abstandskurve zwischen Cantileverspitze und Probe bei den Positionen 1-6 des Cantilevers. Dabei beschreibt der LVDT/Deflection-Graph die Position des Messkopfes des AFM, während der Separation/Kraft-Graph beschreibt die Position der Cantileverspitze (1) Annäherung des Cantilevers, (2) Anziehung des Cantilevers durch adhärenente Kräfte, (3) erster Probenkontakt des Cantilevers, (4) Entfernung des Cantilevers von der Probenoberfläche, (5) Anziehung des Cantilevers durch adhärenente Kräfte und (6) Rückkehr des Cantilevers in seine Ruheposition.

Eine Kraft-Abstandskurve beginnt weit von der Oberfläche der Probe entfernt (Bereich 1) und in der Ruheposition des Cantilevers, d.h. das Deflectionsignal ist Null. Der Cantilever wird dann an die Probe angenähert. Die Richtung der Annäherung wird in Abb. 11 durch die Orientierung der Pfeilspitze dargestellt. Kurz vor der Probe kommt es aufgrund einer attraktiven Kraft zu einer Anziehung zwischen den Atomen der Cantileverspitze und denen der Probe (Bereich 2). Die Cantileverspitze wird in Richtung der Probe gezogen und es kommt zu einem Kontakt (Bereich 3). Von diesem Zeitpunkt an befindet sich die Spitze auf der Oberfläche der Probe. Erhöht man die z-Spannung des Piezos bzw. drückt man den Cantilever noch stärker auf die Probe, so biegt er sich immer stärker durch und es kommt zu einem weiteren Anstieg des Deflectionsignals (Bereich 3). Zieht man den Cantilever durch Verringern der z-Spannung wieder zurück, so sinkt das Deflectionsignal wegen der attraktiven Kräfte unter Null in den Adhäsionsbereich (Bereich 4 und 5). Gegen Ende des Bereichs 5 in der Abb. 11 sind die adhäsiven Kräfte kleiner als die Zugkraft des Cantilevers geworden, so dass der Cantilever von der Oberfläche wegschnappt und in seine Ausgangsposition zurückkehrt.

Auf diese Weise lassen sich Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe bei dem Wegziehen des Cantilevers detektieren. Es ist aber auch möglich, wie in Kapitel 4.4.2 durch das Hineindrücken in z.B. einen Bilayer Schichtdicken bestimmen (Franz et al., 2002). Eine erklärende Zusammenfassung zu Elastizitätsmessungen von biologischen Materialien befindet sich in (Vinckier und Semenza, 1998).

Um die abstrakten Spannungswerte des z-Piezos und des Photodetektors besser interpretieren zu können, werden sie in Kraft-Abstandskurven umgerechnet.

Zunächst müssen alle Deflectionwerte in Volt ($Defl [V]$) in Deflectionwerte in nm ($Defl [nm]$) umgewandelt werden. Hierfür wird die invertierte optische Cantileversensitivität ($InvOLS [nm/V]$) durch Messung der Steigung im Bereich 3 einer Kraftkurve auf hartem Material bestimmt, z.B. auf Mica. Es ergibt sich

$$Defl[nm] = Defl[V] \cdot InvOLS \left[\frac{nm}{V} \right]. \quad (11)$$

Für die auf den Cantilever wirkende Kraft K gilt folgender allgemeiner Zusammenhang:

$$K[pN] = Defl[nm] \cdot k \left[\frac{pN}{nm} \right]. \quad (12)$$

Hierbei ist k die Federkonstante des Cantilevers, die mit Hilfe des thermischen Rauschens (siehe Kapitel 2.1.5) des Cantilevers bestimmt wird.

Die spannungsabhängige Ausdehnung des z-Piezos wird durch einen Positionsmesser überwacht. Dieser liefert als Messwert das sogenannte $LVD T_z$ -Signal (in Nanometern). Der $LVD T_z$ -Wert ist jedoch die Position des Kopfes und noch nicht die der Cantileverspitze. Hierzu wird die neue Variable *Separation* ($Sep[nm]$) eingeführt:

$$Sep[nm] = LVD T_z[nm] - Defl[nm]. \quad (13)$$

In den im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigten Kraft-Abstandskurven handelt es sich bei der x-Achse um die Variable *Separation* und bei der y-Achse um die Kraft K .

Eine genaue Analyse von Kraft-Abstandskurven ist ein sehr komplexer Sachverhalt. Zum einen spielen die zwischen Spitze und Probe wirkenden Kräfte eine große Rolle. Zum anderen ist die Geometrie der Cantileverspitze von wichtiger Bedeutung.

2.1.5 Bestimmung der Federkonstante

Um die zwischen der Cantileverspitze und der Probenoberfläche wirkenden Kräfte zu quantifizieren, muss die Federkonstante des Cantilevers bekannt sein. Da die Hersteller nur ungefähre Werte angeben, ist es notwendig, die Federkonstante selbst zu bestimmen.

Die Federkonstante k_z ist definiert als Quotient aus Federbelastung N und zugehöriger Formänderung Δz :

$$k_z = \frac{N}{\Delta z}. \quad (14)$$

Um die Federkonstante von Cantilevern zu messen, gibt es zwei Möglichkeiten: *statische* und *dynamische* Methoden. Bei den statischen Methoden wird eine genau bekannte Kraft auf den zu untersuchenden Cantilever angewandt und die resultierende Auslenkung bestimmt. Nach Gleichung (14) wird daraus k_z bestimmt. Im Gegensatz hierzu nutzen die dynamischen Methoden aus, dass die Schwingungen eines Cantilevers von seiner Federkonstante abhängig

sind. Diese Methoden kommen bei der Bestimmung der Federkonstante eines Cantilevers ohne Gleichung (14) aus. Als statische Methoden sind die *Cantilever-pendulum* (Butt et al., 1993), die *Calibrated cantilever* ((Li et al., 1993), (Rabinovich und Yoon, 1994), (Torii et al., 1996), (Gibson et al., 1996), (Tortonese und Kirk, 1997)) und die *Static added-mass* (Senden und Ducker, 1994) Methode bekannt. Dynamische Methoden sind die *Dynamic-* oder auch *Cleveland-added mass* (Cleveland et al., 1993), die *Thermal noise* (Hutter und Bechhoefer, 1993), die *Unloaded frequency* (Sader et al., 1995) und die *Modified unloaded frequency* (Sader et al., 1999) Methode. Eine Übersicht über Kalibrierungsmethoden von Cantilevern bietet (Sader, 2002).

Da das in dieser Arbeit vorwiegend verwendete Rasterkraftmikroskop MFP-3D bzw. die zugehörige MFP-3D Software die Thermal Noise Methode, d.h. das thermische Rauschen zur Bestimmung von Federkonstanten gebraucht, soll diese Methode kurz näher vorgestellt werden.

Die Thermal Noise Methode verwendet den Gleichverteilungssatz (Äquipartitionstheorem), um die thermische Brownsche Molekularbewegung in Beziehung zur Federkonstante des Cantilevers zu bringen. Hierbei wird angenommen, dass der Cantilever mit einer einzigen Mode schwingt, so dass folgende Beziehung gilt:

$$k_z^D = \frac{k_B T_0}{\langle \Delta z^2 \rangle}, \quad (15)$$

wobei k_z^D die dynamische Federkonstante, $\langle \Delta z^2 \rangle$ die mittlere quadratische Auslenkung des freien Endes des Cantilevers aus der Ruheposition bei der jeweiligen Mode, k_B die Boltzmannkonstante und T_0 die absolute Temperatur ist. Misst man also die Auslenkung des Cantilevers, so kann seine dynamische Federkonstante bestimmt werden. Das Verhältnis der dynamischen Federkonstante k_z^D und der statischen Federkonstante k_z (siehe Gleichung (14)), ist stark von der jeweiligen Schwingungsmode und der Geometrie des Cantilevers abhängig. Für die erste Mode ist der Unterschied zwischen den beiden Konstanten allerdings minimal. Z.B. gilt für einen rechteckigen Cantilever $k_z^D = 1.03k_z \approx k_z$ (Sader, 2002). Die entsprechende Beziehung für einen V-förmigen Cantilever ist unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass auch hier $k_z^D \approx k_z$ gilt.

Aufgrund der Tatsache, dass diese Methode das Spektrum des thermischen Rauschens des Cantilevers verwendet, ist sie nur für Cantilever mit einer relativ niedrigen Federkonstante ($k_z < 1 \text{ N/m}$) geeignet (Gibson et al., 1997), (Walters et al., 1996), (Sader et al., 1999), (Butt und Jaschke, 1995).

Bei der Thermal Noise Methode handelt es sich um eine für den Cantilever schonende Möglichkeit, die Federkonstante zu bestimmen. Sie ist für alle Formen von Cantilevern geeignet und außerdem sehr schnell durchführbar.

2.1.6 Kopplung eines α LBP-Antikörpers an den Cantilever

Um gezielt Proteine z.B. in Membranen zu detektieren, wurden gegen das Protein gerichtete Antikörper kovalent an den Cantilever gebunden.

Zur Detektion von humanem LBP wurde der monoklonale Antikörper biG33 an den Cantilever der Firma Biometec (Greifswald, Deutschland) eingesetzt, der in einer Konzentration von 1 mg/ml bei -20°C gelagert wurde.

Zur Anbindung des Antikörpers wurde nach einer Methode von Cai et al. (Cai und Yang, 2002) zunächst der Cantilever (MSCT-AUNM) 20-30 min in hochkonzentriertem HCL oxidiert, welches zur Hälfte mit CH_3OH gemischt worden ist. Anschließend wurde der Cantilever mit Methanol abgespült und in Methanol-verdünntem 0,5 %-igen MEMO (3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat) (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) für 40-45 min silanisiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Cantilever intensiv mit Methanol und Reinstwasser abgespült. Danach ist er für eine weitere Stunde in die Subphase getaucht worden, die den LBP-Antikörper enthielt (0,5 % biG33, 0,2 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Fluka Chemie GmbH), 0,2 % N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) (Fluka Chemie GmbH)). Anschließend ist der Cantilever intensiv mit Subphase abgespült und gleich danach verwendet worden. Die katalytischen Reagenzien APS und TEMED ermöglichen die Reduktion der Alkylendoppelbindung des MEMO und verbinden die offene Bindungsstelle mit einer reaktiven Gruppe (Hames, 1981; Rothe und Maurer, 1986). Cai et al. verwendeten diese Methode, um DNS über die OH- oder Ethergruppen an den Cantilever zu binden. Es ist nicht bekannt, ob die kovalente Bindung anderer Antikörper ebenfalls nach diesem Schema durchgeführt werden kann.

2.2 Rekonstitutionssysteme von Membranen

Natürliche Membranensysteme vollständig nachbauen zu können, ist ein großer Wunsch vieler Naturwissenschaftler. Aufgrund ihrer Komplexität ist dies jedoch meistens unmöglich. Häufig ist es auch gar nicht sinnvoll, da bei einer bestimmten Fragestellung viele Systemkomponenten nicht zum Tragen kommen. Aus diesen Gründen sind in dieser Arbeit die einfachsten Rekonstitutionssysteme für Membranen (Lipidmono- und Mehrfachschichten) verwendet worden.

2.2.1 Lipidmonolayer auf der Langmuir Filmwaage und auf festen Substraten

Lipide bilden aufgrund ihres amphiphilen Charakters monomolekulare Filme (Monolayer) an der Wasser/Luft Grenzfläche. Die hydrophilen Kopfgruppen sind in Richtung der wässrigen Lösung gerichtet, die im folgenden Subphase genannt wird, während die hydrophoben Fettsäureketten in Richtung Luft zeigen. Hierbei ist der laterale Druck Π eines Monolayers die Differenz zwischen der Oberflächenspannung von reinem Wasser ($\gamma_0 \approx 72 \text{ mNm}^{-1}$) und von der Wasser/Monolayer-Oberfläche (γ). Er kann mit Hilfe eines Wilhelmy Plättchens bestimmt werden (siehe Abb. 12).

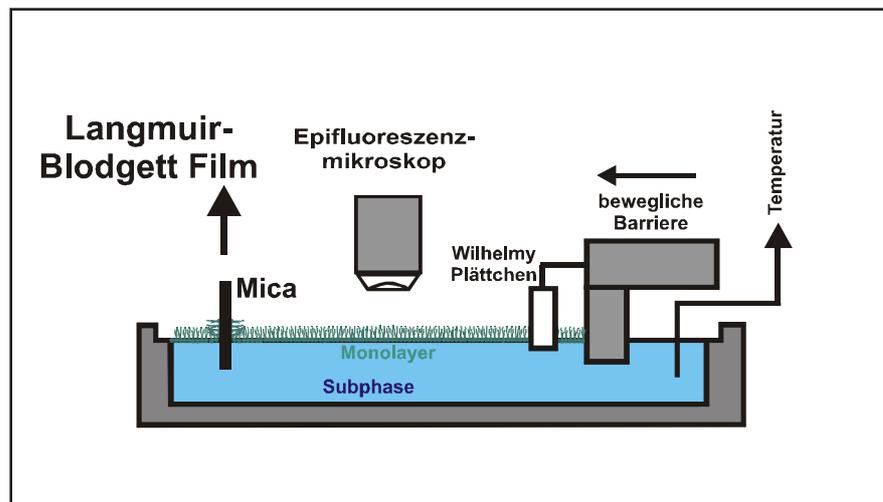


Abb. 12: Schematischer Aufbau der Langmuir Filmwaage

Die Kräfte, die auf das Wilhelmy Plättchen wirken, setzen sich zusammen aus der nach unten gerichteten Gravitation und Oberflächenspannung und dem aufwärts gerichteten Auftrieb,

welcher durch das verdrängte Wasser verursacht wird. Für ein rechteckiges Plättchen mit den Dimensionen h , b und t und einem Material mit der Dichte ρ_P , welches bis zu einer Tiefe d in eine Flüssigkeit der Dichte ρ_F getaucht wird, ergibt sich die auf das Plättchen wirkende Kraft zu (Petty, 1996):

$$F = \rho_P g h b t + 2\gamma(t + b)\cos\Theta - \rho_F g t b d . \quad (16)$$

Dabei ist γ die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, Θ der Kontaktwinkel der Flüssigkeit auf dem festen Wilhelmy Plättchen und g die Gravitationskonstante.

Man verwendet ein vollständig befeuchtetes Filterplättchen (d.h. $\Theta = 0$) und misst dann die Änderung der auf dieses wirkenden Kraft in Ruheposition. Die Änderung der Kraft ΔF ist folgendermaßen mit der Änderung der Oberflächenspannung $\Delta\gamma$ verknüpft:

$$\Delta F = 2\Delta\gamma(t + b). \quad (17)$$

Es wird ein sehr dünnes Plättchen verwendet, also gilt $t \ll b$:

$$\Delta\gamma = \frac{\Delta F}{2b}. \quad (18)$$

Bei Komprimierung des Lipidmonolayers, der aus einer chloroformischen Lösung des Lipids gebildet wird, die auf die Oberfläche der Subphase aufgetropft wird, können die Lipidmoleküle einen oder mehrere Phasenübergänge vollführen (Abb. 13). Die Komprimierung erfolgt mit Hilfe einer Barriere auf den gewünschten Oberflächendruck Π , welcher durch das Wilhelmy Plättchen gemessen wird.

Phasenübergänge werden bei Beobachtung des Oberflächendrucks in Abhängigkeit von der vom Film bedeckten Fläche A deutlich, welche das zweidimensionale Äquivalent zu den dreidimensionalen Druck/Volumen – Isothermen darstellen. Die vom Film bedeckte Fläche wird als Fläche a pro Molekül angegeben, d.h.

$$a = \frac{AM}{cN_A V} = \frac{A}{cN_A V}, \quad (19)$$

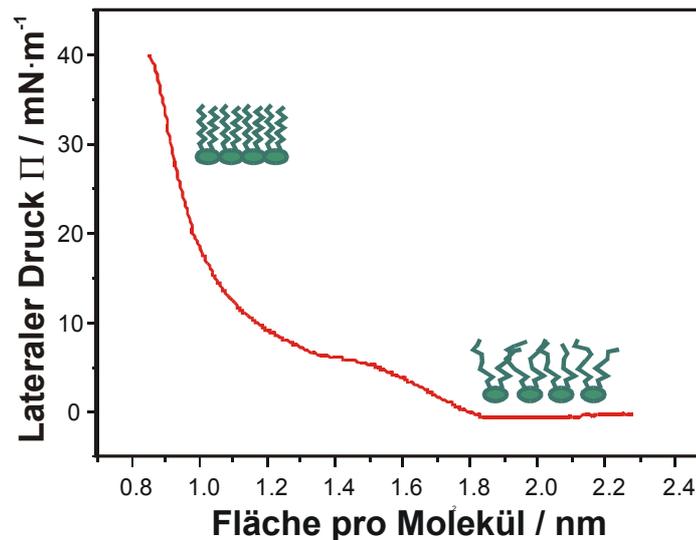


Abb. 13: Schematische Darstellung einer Isotherme und dem Zustand der Lipidfettsäureketten. Bei niedrigem lateralen Druck befinden sich die Kohlenwasserstoffketten in der flüssig expandierten (LE) Phase und bei einem hohen lateralen Druck in der flüssig kondensierten (LC) Phase.

wobei M das Molekulargewicht, C die Konzentration in Masse pro Volumen, c die spezifische molare Konzentration, V das Volumen und N_A die Avogadro Konstante ist.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Filmwaage (Munitech, München, Deutschland) kann die Fläche des Monolayers durch eine bewegliche Barriere verändert werden, die eine der vier Seitenbegrenzungen des Langmuir-Trogs darstellt (Abb. 12). Bei einer festen Temperatur führt die Kompression des Monolayers zu einem Anstieg des lateralen Drucks und ggf. zu einem Übergang der Lipidfettsäureketten von der flüssig expandierten (LE) Phase zur flüssig kondensierten (LC) Phase. Im flüssigen Zustand, der LE Phase, besitzen die Kettenmoleküle eine zufällige Orientierung. Reduziert man die Filmfläche weiter, erfolgt der Übergang in die LC Phase, in der alle Kohlenwasserstoffketten hochorientiert vorliegen. Durch eine weitere Komprimierung wird der Lipidmonolayer zur Kollabierung gebracht. Je nach Temperatur, lateralem Druck, Ionenkonzentration der Subphase und verwendetem Lipid kommt es zu einer Phasenseparation zwischen LE und LC Phase, insbesondere im Phasenübergangsbereich. Die gebildeten Domänen können im Bereich der Koexistenz mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 3.3.2) sichtbar gemacht werden. Die Bilder des Epifluoreszenzmikroskops (Modell 1, Munitech, München, Deutschland) wurden durch eine Epifluoreszenzkamera (C2400-08-C, Hamamatsu Photonics, Japan) aufgenommen und über eine Videokarte in einen Rechner eingelesen.

Fluoreszenzfarbstoffe können an die Kopfgruppen von Phospholipiden kovalent gebunden werden. Die fluoreszenzmarkierten Lipide neigen dazu, sich in den LE- oder LC-Domänen anzusammeln (Weis, 1991; von Tschärner und McConnell, 1981). In der vorliegenden Arbeit ist das farbstoffmarkierte NBD-PE verwendet worden, welches unter den gewählten Bedingungen fluide ist und sich folglich in den LE-Domänen befindet.

Bei einem gegebenen lateralen Druck kann der Flächenbedarf eines einzelnen Lipidmoleküls aus den entsprechenden Druck/Flächenisothermen bestimmt werden. Hierfür wird normalerweise ein Druck von 20 - 30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ gewählt, weil dieser Wert demjenigen in biologischen Membranen entspricht (Marcelja, 1974; Blume, 1979). Ist die Komprimierung beendet, wird der Druck über eine bestimmte Zeit durch einen Regelmechanismus konstant gehalten. Um die Stabilität des Lipidfilms zu überprüfen, führt man eine Kontrolle für 30 min durch, bei der sich die Fläche nur geringfügig ändern sollte. Nach der Präparation des Monolayers und der Kontrolle seiner Stabilität kann durch das Unterspritzen von Peptiden/Proteinen untersucht werden, ob es sich um membranaktive Substanzen handelt. Ein solches Peptid/Protein kann sich an die Lipidmonoschicht anlagern oder auch einbauen, was zu einer Flächenvergrößerung bei konstant gehaltenem Druck führt. Um die Monolayer der Untersuchung mit der AFM zugänglich zu machen, ist ein Übertrag auf ein festes Substrat notwendig. Deshalb beginnt man nach mindestens 60 min Wartezeit bzw. nach gesättigtem Einbau anschließend mit dem Übertragen des Films auf einen festen Untergrund (Langmuir-Blodgett Film). Hierzu ist vor dem Auftragen der Lipidschicht ein Stück Mica (ca. 1,5 cm · 3 cm groß) möglichst tief in der wässrigen Phase positioniert worden. Die als erstes von Irving Langmuir eingeführte und anschließend von Katharine B. Blodgett angewandte Langmuir-Blodgett (LB) Technik (Blodgett, 1935; Blodgett, 1934; Blodgett und Langmuir, 1937) ermöglicht es, einen Lipidmonolayer bei einem bestimmten Oberflächendruck auf ein festes Substrat aufzutragen. Dabei wird der sogenannte Langmuir-Trog mit einer Subphase gefüllt und vor Aufbringen des Monolayers ein geeignetes festes Material derart in sie hineingetaucht, dass man es zur Übertragung des Lipids mit Hilfe eines Schrittmotors in z-Richtung durch den Monolayer wieder herausziehen kann.

Hat das Substrat, wie z.B. Mica, hydrophile Eigenschaften, so ordnen sich die Lipide beim Herausziehen des Substrats mit ihren Kopfgruppen in Richtung zur Oberfläche an und die hydrophoben Fettsäureketten weisen zur Luft. Über die Abnahme der Fläche bei konstantem Druck lässt sich feststellen, ob es wirklich zu einer Übertragung der Lipide auf Mica

gekommen ist. Taucht man das Substrat noch einmal in den Lipidfilm, so ordnet sich auf der ersten Lipidschicht eine weitere an. Auf diese Weise lassen sich Multischichten herstellen.

Die molekulare Anordnung der Lipide erfolgt nicht senkrecht zur Oberfläche des Substrats (Bushan, 2004); der Neigungswinkel ist sowohl von der Kopf- bzw. Ankergruppe als auch vom Substrat abhängig. Für Alkanthiolate auf Gold ergibt sich beispielsweise ein Neigungswinkel von 30-35° in Bezug zur Substratnormalen. Die Interaktion zwischen den aufgetragenen Lipiden beruht auf van der Waals Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen. In dieser Arbeit wurde zur Übertragung des Monolayers auf Mica eine Geschwindigkeit von 10 $\mu\text{m/s}$ gewählt, da höhere Geschwindigkeiten dazu führen können, dass der Film nicht vollständig übertragen wird.

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung von Multischichten ist die Lipidfilmdeposition durch Dippen eines Micaplättchens in x-Richtung durch den Lipidfilm statt des Herausziehens in z-Richtung (Langmuir-Schäfer Methode) (Langmuir und Schäfer, 1938). Der daraufhin erhaltene Bilayer ist allerdings, wie jeder andere auch, nur unter Wasser beständig (Benz et al., 2004). LB-Monolayer hingegen sind über einige Monate an Luft stabil und sehr gut geeignet, um Lipidanordnungen bzw. -domänen in Abhängigkeit des Oberflächendrucks und evtl. vorhandenen Peptiden mit dem Rasterkraftmikroskop zu untersuchen. Obwohl es sich bei einem Monolayer um ein sehr artifizielles System handelt, stehen Ergebnisse von Filmwaagenmessungen generell in gutem Einklang mit Ergebnissen, die z.B. mit Liposomen erzielt wurden. Die hohe Präzision der Meßparameter, die große Stabilität des Monolayers und die große Meßfläche, auch bei den LB Filmen, bilden eine hervorragende Voraussetzung für die rasterkraftmikroskopische Untersuchung der Topographie und ihrer weiteren Eigenschaften.

Alle Versuche mit der Filmwaage wurden auf der in Kapitel 2.4 beschriebenen Subphase bei 20°C durchgeführt.

2.2.2 Erzeugung von Lipidbilayern durch Liposomenfusion

Eine weitere Methode, um planare Lipidbilayer auf feste Substrate zu bringen, beruht auf dem Transfer von Lipiden aus Liposomen¹ (Puu und Gustafson, 1997; Reviakine und Brisson, 2000; Jass et al., 2000). Dazu werden Liposomen zusammen mit dem Substrat, z.B. Mica

¹ Liposomen sind kleine sphärische, mit Flüssigkeit gefüllte Hohlkörper, die von einer Lipiddoppelschicht umhüllt sind.

inkubiert. Dabei kommt es zu einer Adsorption der Vesikel auf der Oberfläche (siehe Abb. 14).

Die adsorbierten Vesikeln können aufbrechen oder auch erst miteinander fusionieren bevor sie aufbrechen. In beiden Fällen bilden sich einzelne Bilayerinseln, die kontinuierlich wachsen und sich schließlich zu einem zusammenhängenden Bilayer verbinden.

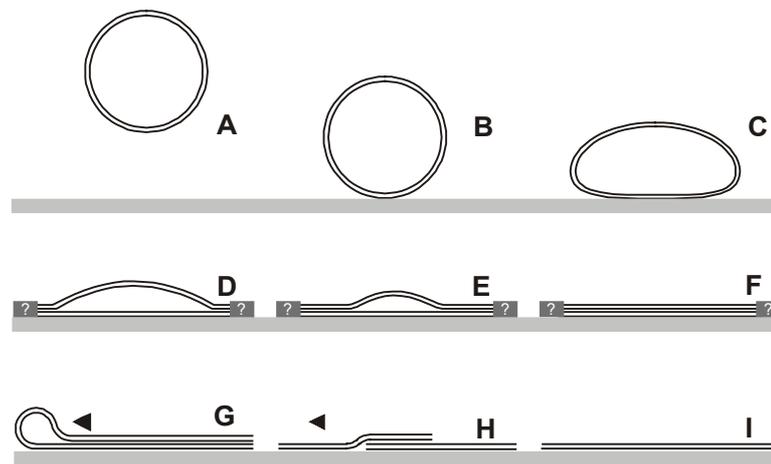


Abb. 14: Schematische Darstellung der Bildung eines Lipidbilayers durch Liposomenfusion nach Jana Jass et al. (Jass et al., 2000).

Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Modell für die Transformation eines Liposoms zu einer planaren Lipiddoppelschicht. Das Liposom nähert sich (A), adsorbiert (B) und heftet schließlich an die Substratoberfläche (C). Sobald die Anheftung an die Oberfläche erfolgt ist, beginnt sich das Liposom von den Rändern her auf das Substrat zu legen (D). Dabei breiten sich die äußeren abgeflachten Bereiche so aus, dass sich ein teilweise abgeflachtes Liposom bildet (D und E). Anschließend kollabiert das Liposom, zwei Lipidbilayer liegen aufeinander (F). Die obere Doppelschicht bewegt sich zu noch freien Bereichen des Substrats. Eine solche Bewegung kann zum einen rollend (G), zum anderen aber auch gleitend (H) erfolgen. Beides hat die Bildung einer einzelnen Lipidbilayerstruktur zur Folge (I). Es noch unklar, wie sich die Enden der Liposomen (markiert durch einen Fragezeichenkasten) verhalten.

Sind die Liposomen sehr groß oder besitzen sie ein hohes Kontaktpotential, bilden sich zunächst Liposomeninseln aus, die noch aus intakten Liposomen bestehen. Anschließend kommt es zu einer Ruptur. Es konnte theoretisch (Seifert, 1997; Lipowsky und Seifert, 1991) und anschließend auch praktisch (Reviakine und Brisson, 2000) gezeigt werden, dass eine Adhäsion die Fusion von Vesikeln begünstigt. Die Fusion des an die Oberfläche gebundenen Vesikels führt zu einer Zunahme ihrer Radien. Die fusionierten, abgeflachten

Liposomeninseln werden immer größer und brechen dann auseinander. Es bildet sich ein Lipidbilayer.

Die Adsorption eines Vesikels an einen anziehenden Untergrund wird durch die Wechselwirkung von Adhäsions- und Bindungsenergie bestimmt. Die Adhäsionsenergie ist die Energie E_a , die das Vesikel durch die Adhäsion an den Untergrund gewinnt:

$$E_a = -WA^* , \quad (20)$$

dabei ist W das effektive Kontaktpotential und A^* die Kontaktfläche. Je größer das Vesikel ist, desto größer ist auch seine Adhäsionsenergie. Die Bindungsenergie E_b resultiert aus der Abweichung der Vesikelform von einer sphärischen Form bei der Adhäsion, die von dem Krümmungsgrad k der Membran abhängig ist:

$$E_b = \frac{1}{2} k_{Rig} \int dA (C_1 + C_2)^2 , \quad (21)$$

dabei ist k_{Rig} die Rigidität des gekrümmten Bilayers, C_1 und C_2 sind die beiden Hauptkrümmungen, und die Integration wird über die Oberfläche A des Vesikels durchgeführt.

Für ein gegebenes effektives Kontaktpotential W ergibt sich, dass der Energiegewinn durch Adhäsion (vesikelgrößenabhängig) größer ist als der Verlust von Energie durch Bindung (vesikelgrößenunabhängig), solange der Radius R eines Vesikels größer ist als der kritische Radius R_a :

$$R_a = \sqrt{\frac{2k_{Rig}}{W}} . \quad (22)$$

Nach Seifert und Lipowsky bleiben isolierte Vesikel intakt, solange ihr Radius kleiner als ein bestimmter Bruchradius R_r ist. Ist er größer, kommt es zu einem Aufbrechen der Vesikel.

Die in dieser Arbeit angewendete Sonifizierung der Vesikel hat allerdings zur Folge, dass die verwendeten Liposomen immer einen Radius besitzen, der ein wenig größer als R_a , jedoch weit unterhalb von R_r ist.

Die Bildung eines Phospholipidbilayers kann bei großen Liposomen nur in Anwesenheit von Kalzium stattfinden. Reviakine et al. schließen hierbei die Modifizierung des Bilayers durch Kalzium nicht aus. Bei der Verwendung sonifizierter Liposomen kommt es jedoch auch in Abwesenheit von Kalzium zur Adsorption und anschließender Fusion.

Zur Herstellung von Lipid A-Aggregaten bzw. PS-Liposomen wurden die verwendeten Lipide in Chloroform in 1,5 ml Schraubampullen mit Teflonseptum (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom abgedampft, so dass sich ein gleichmäßiger Lipidfilm an der Innenwand der Ampulle bildete. Danach wurde eine entsprechende Menge an Subphase zugeben, so dass sich eine 10^{-3} M Suspension ergab. Diese wurde ca. 1 min mit einem Ultraschallgerät (Branson-Sonifier, Hensenstamm, Deutschland) beschallt. Anschließend wurde die Präparation für 30 min bei 4°C gekühlt und dann für 30 min auf 70°C (Lipid A) bzw. 50°C (PS) erhitzt. Bevor sie weiter verwendet wurden, sind die Aggregate bzw. Liposomen zur Äquilibration im Falle der Polarisationsmessungen für mindestens 12 h bei 4°C gelagert worden.

Für die Herstellung von Phospholipidbilayern ist die PS-Liposomenlösung bereits nach ca. 4 h auf 100 μ M verdünnt worden. Dann sind 2 ml davon in einen kleinen Petrischalendeckel (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegeben worden, in den mittig ein Stück Mica mit 5-Minuten Epoxy Kleber (ITW Devcon, Kiel, Deutschland) hineingeklebt worden ist. Von dem Micaplättchen ist direkt vor Zugabe der Liposomen die oberste Schicht mit Tesafilm abgetrennt worden, um eine atomar glatte und saubere Oberfläche zu erhalten. Anschließend ist der abgedeckte Petrischalendeckel über Nacht auf einem Rüttler bei 4°C gestellt worden. Für den weiteren Gebrauch wurde die Lösung intensiv mit Subphase ausgetauscht. Dabei wurde darauf geachtet, dass der auf dem Mica gebildete Bilayer nicht der Luft ausgesetzt war.

2.3 Lipopolysaccharide

Es wurden Lipopolysaccharide (LPS) des Tiefrauhmutanten-Stamms R595 der Spezies *Salmonella enterica* serovar Minnesota (*S. minn.*) verwendet, der im Folgenden mit R595 LPS bezeichnet wird. Das LPS wurde nach der Phenol-Chloroform-Petrolether Methode (Galanos et al., 1969) extrahiert und später lyophilisiert. In dieser Arbeit wurden ein R595 LPS (ID: HL124) (MW = 2400 Da) in natürlicher Salzform, sein Lipid A in Triethylammonium-(TEN-) Salzform (ID: HL143) (2300 Da) und ein synthetisch hergestelltes tetraacyl Lipid A (Verbindung 406) (1404 Da) benutzt (Oikawa et al., 1997) (Abb. 15).

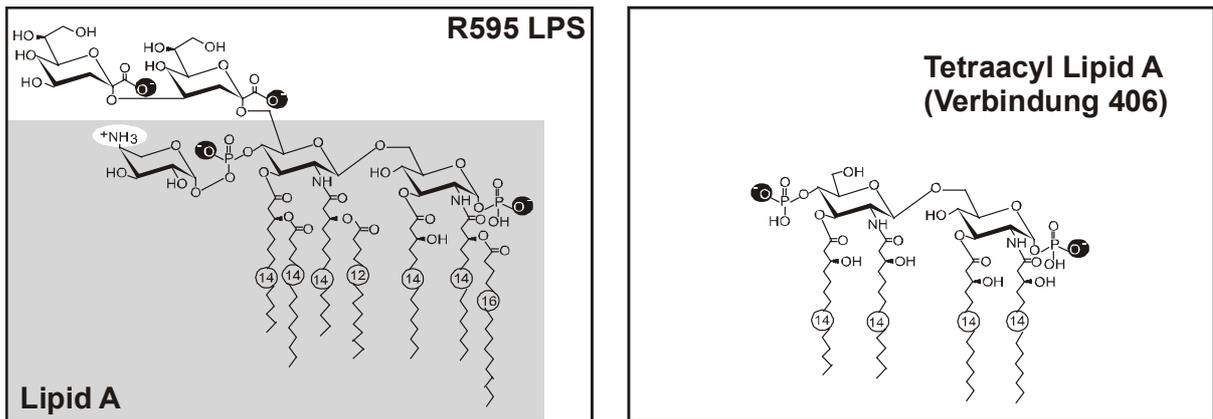


Abb. 15: Chemische Strukturen von den verwendeten Lipopolysacchariden. Links: R595 LPS und sein Lipid A aus *S. minn.*. Der graue Hintergrund markiert den Lipid A Bereich des R595 LPS. Rechts: synthetisch hergestelltes tetraacyl Lipid A (Precursor Lipid IVa)

Die Menge an nicht-stöchiometrischen Substitutionen durch Fettsäuren, L-Arap4N und Phosphoethanolaminen (P-Etn) wurde massenspektrometrisch untersucht. Im Falle des R595 LPS und seinem Lipid A ist die am 4'-Phosphat gebundene L-Arap4N zu 40 % vorhanden. Die Acylkettenverteilung ist folgendermaßen: 14% tetra-, 11% penta-, 57% hexa-, und 17% heptaacyl.

Für die Filmwaagenmessungen und die Herstellung der LB Filme sind die Endotoxine 1 mM in Chloroform/Methanol (10:1 v/v) gelöst worden.

2.4 Subphase

Die verwendete wässrige Lösung (Subphase) enthielt 5 mM Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (Hepes (Merck, Darmstadt, Deutschland)). Zur Pufferung wurde sie mit KOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Als Reinstwasser wurde destilliertes Wasser mit einer Eigenleitfähigkeit von 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet.

3 Biophysikalische Untersuchungen an LPS-Monolayern und ihrer Wechselwirkung mit antimikrobiellen Wirkstoffen

3.1 Einleitung

Die Organisation der Bestandteile natürlicher biologischer Membranen, z.B. Lipide, Glykolipide, Proteine und Glykoproteine kann in lateralen Domänen innerhalb der Membran erfolgen. Hierbei wird der Separation und Domänenbildung eine bedeutende Rolle bei der funktionellen Spezialisierung der jeweiligen spezifischen Komplexe zugeschrieben. Die Domänenbildung innerhalb von Lipidmembranen erfolgt meistens durch eine Phasenseparation zwischen Lipiden und Peptiden bzw. Proteinen (Mou et al., 1996; Rinia et al., 2000; Janshoff et al., 1999), verschiedenen Lipiden (Giocondi et al., 2001) (Yuan und Johnston, 2002), oder einem Lipid, das in verschiedenen Phasen vorliegt, z.B. der LE (*liquid expanded*) und LC (*liquid condensed*) Phase (Hollars und Dunn, 1998).

Es wird vermutet, dass sich die Proteine bestimmter Signaltransduktionskaskaden in Domänen formieren (Hoessli et al., 2000). Viele dieser Domänen enthalten Cholesterol und werden auch Rafts genannt (Fielding und Fielding, 2003). Es wurde gezeigt, dass die externe Zugabe von Molekülen die Domänenstruktur verändern kann (Gutsmann et al., 2000a) und dass Proteine bevorzugt in die Grenzregionen zwischen LE und LC Phasen interkalieren (Ruano et al., 1998).

In den letzten Jahren haben bereits viele Arbeitsgruppen Domänen in Lipidmono- und bilayern mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (AFM) untersucht (zusammenfassende Artikel (Dufrene und Lee, 2000; Rinia und de Kruijff, 2001; Janshoff und Steinem, 2001)).

In dem nachfolgenden Teil dieser Arbeit werden Monolayer aus R595 LPS und seinem Lipid A und ihre Wechselwirkung mit den antibakteriell wirkenden Peptiden Polymyxin B (PMB) für Lipid A und dem humanen β -Defensin (hBD-3) für R595 LPS näher charakterisiert. Wie bereits in der allgemeinen Einführung erwähnt, ist die äußere Membran ein zusätzliches Hindernis für extern zugegebene antimikrobielle Agenzien. Das LPS stellt die erste Kontaktstelle für membranaktive Substanzen dar, wie z.B. Defensine (Ganz und Lehrer, 1995), Kathelizidine (Gutsmann et al., 1999) und auch Polymyxin B (Wiese et al., 1998).

Die genaue Kenntnis der strukturellen Eigenschaften von LPS Membranen ist von großer Bedeutung für das Verständnis von Interaktionen zwischen diesen Membranen und antimikrobiellen Substanzen und damit letztendlich auch für die Entwicklung neuer Medikamente.

Es wurde die Topographie verschiedener Monolayer aus Tiefraummutanten LPS (R595 LPS), seinem Lipid A und dem tetraacyl Lipid A (Verbindung 406), dem synthetischen Lipid A Precursor IVa, (Abb. 15) untersucht, die mittels der Langmuir-Blodgett (LB) Technik (Blodgett, 1935) hergestellt worden sind. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Phasenseparation in dem Monolayer an der Wasser/Luft Grenzfläche und auf Mica.

Sowohl Epifluoreszenzaufnahmen des Lipid A-Monolayers auf der Wasser/Luft Grenzfläche als auch rasterkraftmikroskopische Messungen des entsprechenden LB Films zeigen die Bildung von nebeneinander existierenden LE/LC-Domänen. Dabei kommt es im attraktiven oder repulsiven AC Mode in den AFM Höhenbilder des LB Films interessanterweise zu einer Invertierung der Höhen. Die Zugabe antimikrobiell wirkender Agenzien führt sowohl bei hBD-3 als auch bei PMB zu einer drastischen Änderung der Domänentopographie, was im Fall von PMB in Übereinstimmung zu einem bereits zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelten Modell steht (Wiese et al., 1998).

3.2 Druck-Flächenisothermen der LPS-Monolayer

Bevor in dieser Arbeit die ersten Langmuir-Blodgett Filme erstellt wurden, ist von allen amphiphilen Molekülen eine Druck-Flächen Isotherme erstellt worden. Dabei zeigten die verwendeten Lipopolysaccharide R595 und sein Lipid A eine charakteristische Eigenart, nämlich eine ungeklärte temperaturunabhängige Schulter in der Isotherme bei ca. $7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (siehe Abb. 16).

Für die Versuche wurden die Lipopolysaccharide (R595 LPS, sein Lipid A und das synthetische tetraacyl Lipid A (Verbindung 406)) zunächst wie oben angegeben zu 1 mM gelöst und dann je 4 μl auf die in dem Langmuir Trog befindliche Subphase gegeben. Nach einer Equilibrierungszeit von 5 min ist anschließend der an der Luft-Wasser Grenzfläche gebildete Monolayer bei 20°C komprimiert worden.

Der schulterartige Verlauf der Kurve von R595 LPS ist kein Phasenübergang, sondern ein temperaturunabhängiger Vorgang. Der Phasenübergang liegt erst bei wesentlich höheren Drücken, im Fall des R595 LPS bei ca. $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Da dieser Verlauf offensichtlich nicht durch die Kohlenwasserstoffketten verursacht wird, muss die Ursache hierfür in anderen Eigenschaften des LPS liegen. Aus vorangegangenen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe (Seydel et al., 2000; Jürgens et al., 2001) sind die Neigungswinkel θ zwischen den Diglucosamin Kopfgruppen und den Kohlenwasserstoffketten bekannt (siehe Tabelle 2).

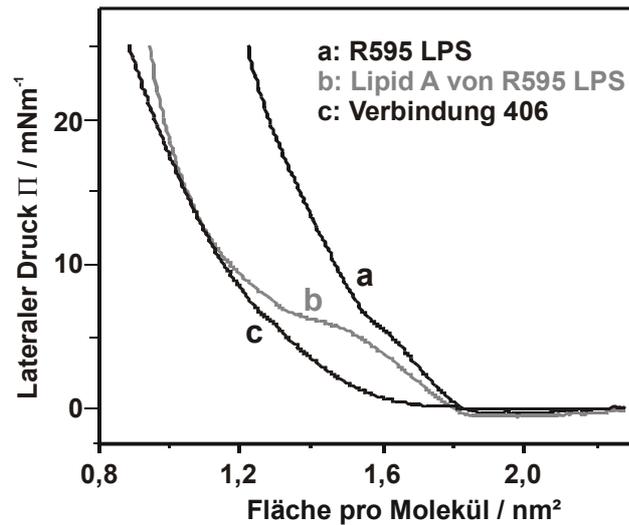


Abb. 16: Druck-Flächen Isothermen der verwendeten Lipopolysaccharide: (a) Re LPS , (b) Lipid A von Re LPS, beide aus *S. minn.* und (c) das synthetisch hergestellte Compound 406. Subphase: 5 mM Hepes, pH 7, 20 °C.

LPS	Neigungswinkel θ / °
Lipid A von R595 LPS <i>S. minn.</i>	$47,1 \pm 2,9$
R595 LPS <i>S. minn.</i>	ca. 33
tetraacyl Lipid A (Verbindung 406)	$0 < \theta < 20$

Tabelle 2: Die Neigungswinkel θ zwischen der jeweiligen Diglucosamin Kopfgruppe und der Richtung der Kohlenwasserstoffketten der verwendeten LPS-Strukturen.

Das tetraacyl Lipid A besitzt im Vergleich zu dem ReLPS und dem Lipid A den kleinsten Neigungswinkel und zeigt in seiner Isotherme keinen schulterartigen Verlauf. Im Gegensatz hierzu weist das Lipid A die von den drei verwendeten Lipopolysacchariden größte Neigung zwischen der Kopfgruppe und der Fettsäuren auf, und es zeigt außerdem auch die am meisten ausgeprägte Schulter in der Isotherme.

Dies führt zur Hypothese, dass der neigungswinkelabhängige Kurvenverlauf durch eine gegenseitige Ausrichtung der geneigten Molekülkopfgruppen während der Komprimierung verursacht werden kann. Dabei richten sich die Moleküle auf und benötigen somit weniger Platz pro Molekül.

3.3 Charakterisierung der LE/LC-Domänen

3.3.1 Der Fluoreszenzfarbstoff NBD-PE

In diesem Abschnitt der Arbeit sind fluoreszenzmarkierte Lipide, die sich bei Raumtemperatur in der LE Phase befinden, mit den zu untersuchenden Lipiden gemischt worden, um mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops Lipiddomänen sichtbar machen zu können. Hierzu wurde ein Fluoreszenzfarbstoff der Firma Molecular Probes (Eugene, OR, USA) benutzt. Dabei handelte es sich um N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, kurz: NBD-PE. Die chemische Formel für NBD-PE ist $C_{49}H_{90}N_5O_{11}P$. Gelöst wurde das NBD-PE zu 2 mM in Chloroform.

Der Farbstoff ist kovalent an die Kopfgruppe des PE gebunden und wurde im Verhältnis [Lipid]:[NBD-PE] = 100:2 (M/M) eingesetzt.

3.3.2 Domänenbildung im Lipid A-Monolayer

Als erstes wurde getestet, welche Hubgeschwindigkeit (Geschwindigkeit, mit der das Mica durch den Monolayer gezogen wird, um einen LB Film zu präparieren) optimal für die Erzeugung von Langmuir-Blodgett Filmen ist. Dazu wurde ein Lipidfilm mit 2 % NBD-PE bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten aus dem Langmuir Trog herausgezogen und der Bedeckungsgrad mit einem Epifluoreszenzmikroskop überprüft. Bei einer Schrittorgeschwindigkeit von $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ stellte sich eine nahezu vollständige Bedeckung des Micas ein.

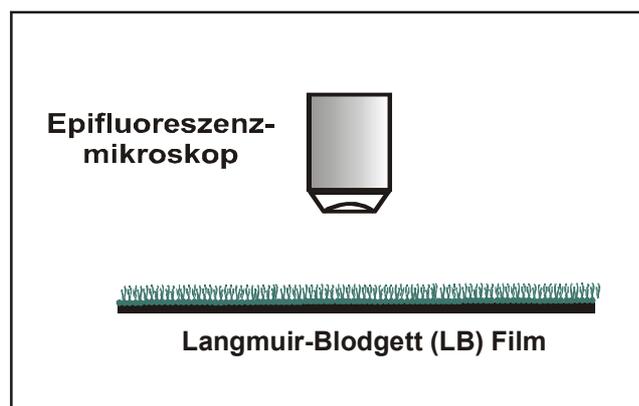


Abb. 17: Nach dem Aufziehen der mit NBD-PE markierten LB Filme wurde die Übertragung der Lipid A-Domänen mit einem Epifluoreszenzmikroskop überprüft.

Betrachtet man bei niedrigem Druck ($< 25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) einen fluoreszenzmarkierten Lipid A-Monolayer auf der Filmwaage, so sieht man zunächst zahlreiche helle, im Bereich von ca. $10 \mu\text{m}$ große Domänen, die während einer Komprimierung langsam kleiner werden bzw. nicht mehr im Fluoreszenzbild auflösbar sind. Dadurch erscheint der Film homogen dunkel. Es stellte sich zum einen die Frage, ob die Lipid A-Domänen auch in dem Epifluoreszenzbild zu sehen sind, was man erhält, wenn man das Micaplättchen mit dem übertragenen LB Film untersucht (siehe Abb. 17). Zum anderen war die Frage zu klären, ob die Domänen bei höheren Drücken tatsächlich verschwinden.

Zur Beantwortung der ersten Frage wurden zwei Epifluoreszenzbilder eines Lipid A-Monolayers auf Subphase und auf Mica bei einem Oberflächendruck von 10 mNm^{-1} aufgenommen. Anschließend ist derselbe LB Film mit dem AFM abgescannt worden. Es stellte sich eine große Ähnlichkeit zwischen den erhaltenen Aufnahmen heraus (Abb. 18A-C).² Die NBD-PE markierten Domänen sind in den AFM Bildern, die im DC Mode aufgenommen wurden, als Bereiche zu erkennen, die etwa $(1,2 \pm 0,2) \text{ nm}$ tiefer liegen als der Rest des Monolayers.

Da sich das bei Raumtemperatur fluide NBD-PE bevorzugt in die fluiden Bereiche eines Lipidfilms einbaut, wird vermutet, dass es sich in Abb. 18C bei den tieferliegenden (dunkel abgebildeten) Domänen um fluide Gebiete handelt.

Wie bereits in der methodischen Einführung erwähnt, ist es aufgrund starker adhärenter Kräfte nicht sinnvoll, Kraftkurven an Monolayern und damit an Luft aufzunehmen, um so die Schichtdicke zu bestimmen. Um hier den Höhenunterschied zwischen rigiden (im Höhenbild hell dargestellt, also höheren) und fluiden (dunkel, tiefer) Bereichen zu bestimmen, sind durch starkes Aufdrücken mit einem Cantilever ($k = 2 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$) einige Stellen des Lipid A-Monolayers weggekratzt worden (Abb. 19). Zwischen den rigiden und fluiden Domänen besteht nach dem Höhenprofil der Abb. 19 ein Unterschied von ca. $(1,2 \pm 0,2) \text{ nm}$. Die Höhendifferenz zwischen gekratzter Stelle und rigidem Bereich beträgt ca. $(2,4 \pm 0,2) \text{ nm}$.

² Im Rahmen einer Gerätevorführung der Firma Atomic Force war es im November 2003 möglich, das verwendete AFM (MFP3D) kurzzeitig mit einem Fluoreszenzaufbau auszustatten. Dadurch gelang es, die im Fluoreszenzbild hell erscheinenden mit NBD-PE markierten Domänen direkt als die im AFM-Höhenbild tieferliegenden Domänen (in dieser Arbeit dunkel dargestellt) zu identifizieren.

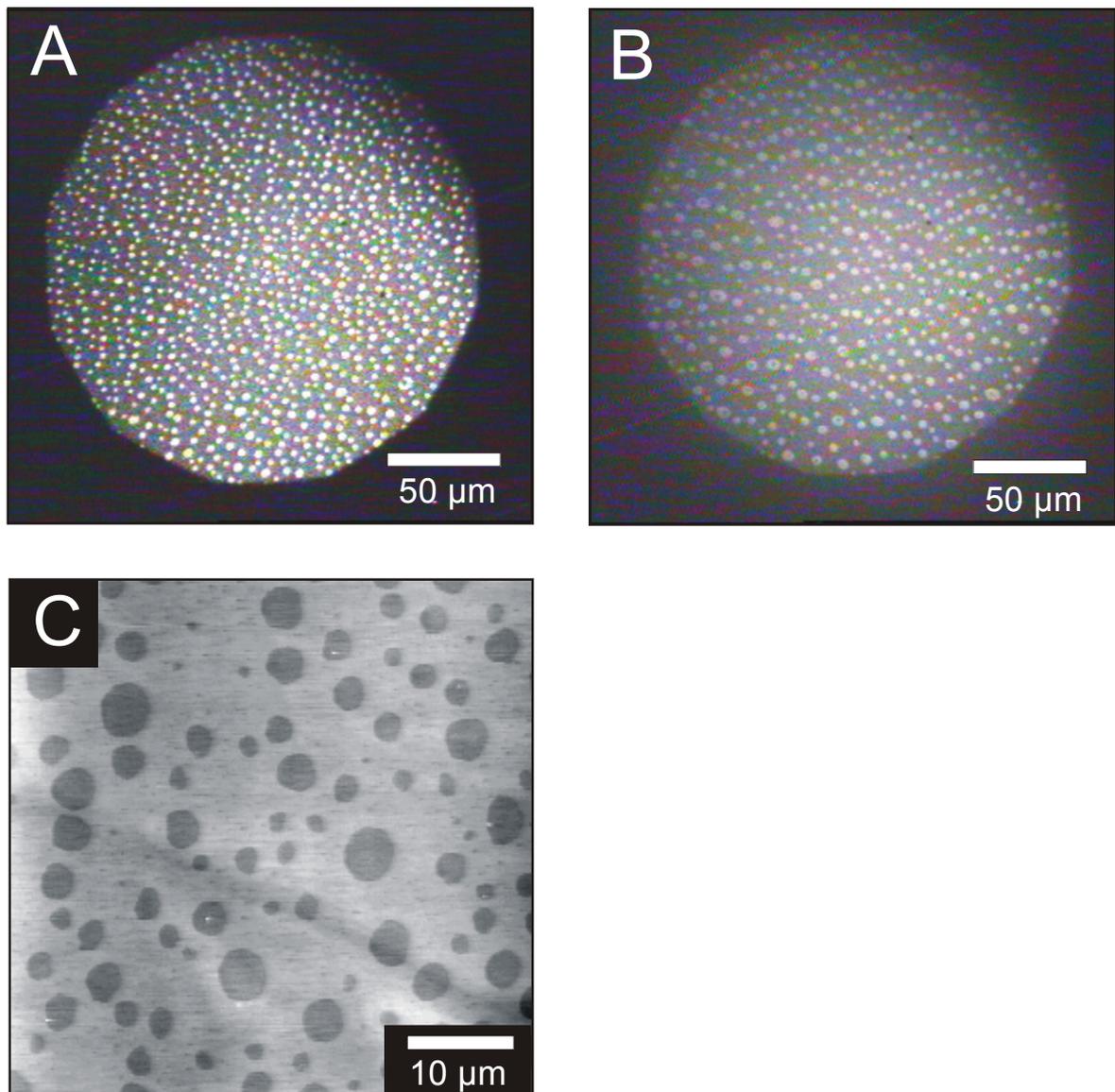


Abb. 18: Lipid A (+ 2 % NBD-PE) - Monolayer bei einem lateralen Druck von $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. (A) Epifluoreszenzbild des Monolayers auf Subphase (5 mM Hepes, pH 7, 20°C). (B) Epifluoreszenzbild desselben Monolayers als LB Film auf Mica. (C) AFM Höhenbild (DC Mode, MSCT-AUNM E, Grauwertebereich 4 nm) von (B) auf Mica. Im DC Mode repräsentieren die tieferen (hier dunkel dargestellten) Domänen die fluiden Domänen.

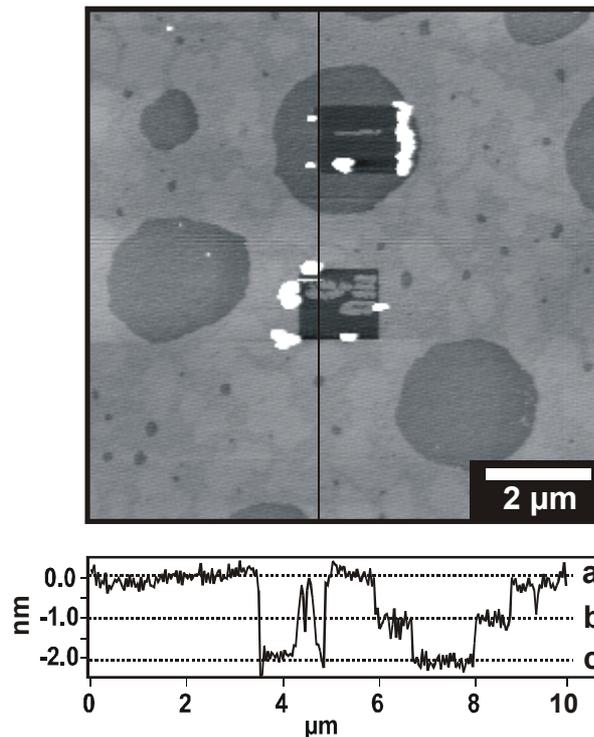


Abb. 19: AFM Höhenbild (DC Mode) nach Kratzen mit einem Cantilever auf einem LB Film von Lipid A auf Mica, das bei einem lateralen Druck von 10 mNm^{-1} übertragen wurde. Die Höhendifferenz zwischen der weggekratzten Ebene c und rigiden Lipiden (Ebene a) beträgt $(2,4 \pm 0,2) \text{ nm}$. Die rigiden und fluiden Bereiche (Ebene b) unterscheiden sich um $(1,2 \pm 0,2) \text{ nm}$.

3.3.3 Untersuchung der molekularen Organisation des Lipid A-Monolayers durch Charakterisierung attraktiver und repulsiver Kräfte

Untersucht man die Lipid A-Monolayer mit dem AFM im AC Mode, so bekommt man eine komplexere Information über die Höhenunterschiede als im DC Mode. Man erhält im attraktiven und repulsiven Mode unterschiedliche Informationen über die Höhe der Domänen. Mit einem harten Cantilevers ($40 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$) und einer kleinen Amplitude (4 nm) ist es möglich, durch Veränderung des Sollwertes gezielt zwischen repulsivem und attraktivem Mode hin- und her zu schalten (Abb. 20). Die im repulsiven Mode erhaltenen Höheninformationen sind vergleichbar mit den im DC Mode gewonnenen, die fluiden LE Bereiche liegen tiefer als die rigiden LC Bereiche.

Im attraktiven Höhenbild erscheinen die fluiden Domänen höher, was ein Unterschied zu dem repulsiven Höhenbild darstellt. Desweiteren wurden kleine Inhomogenitäten in der Größenordnung von 100 nm beobachtet, die im Epifluoreszenzbild nicht zu sehen waren.

Besonders interessant ist, dass die Höhe dieser Bereiche nicht durch attraktive Kräfte beeinflusst wird.

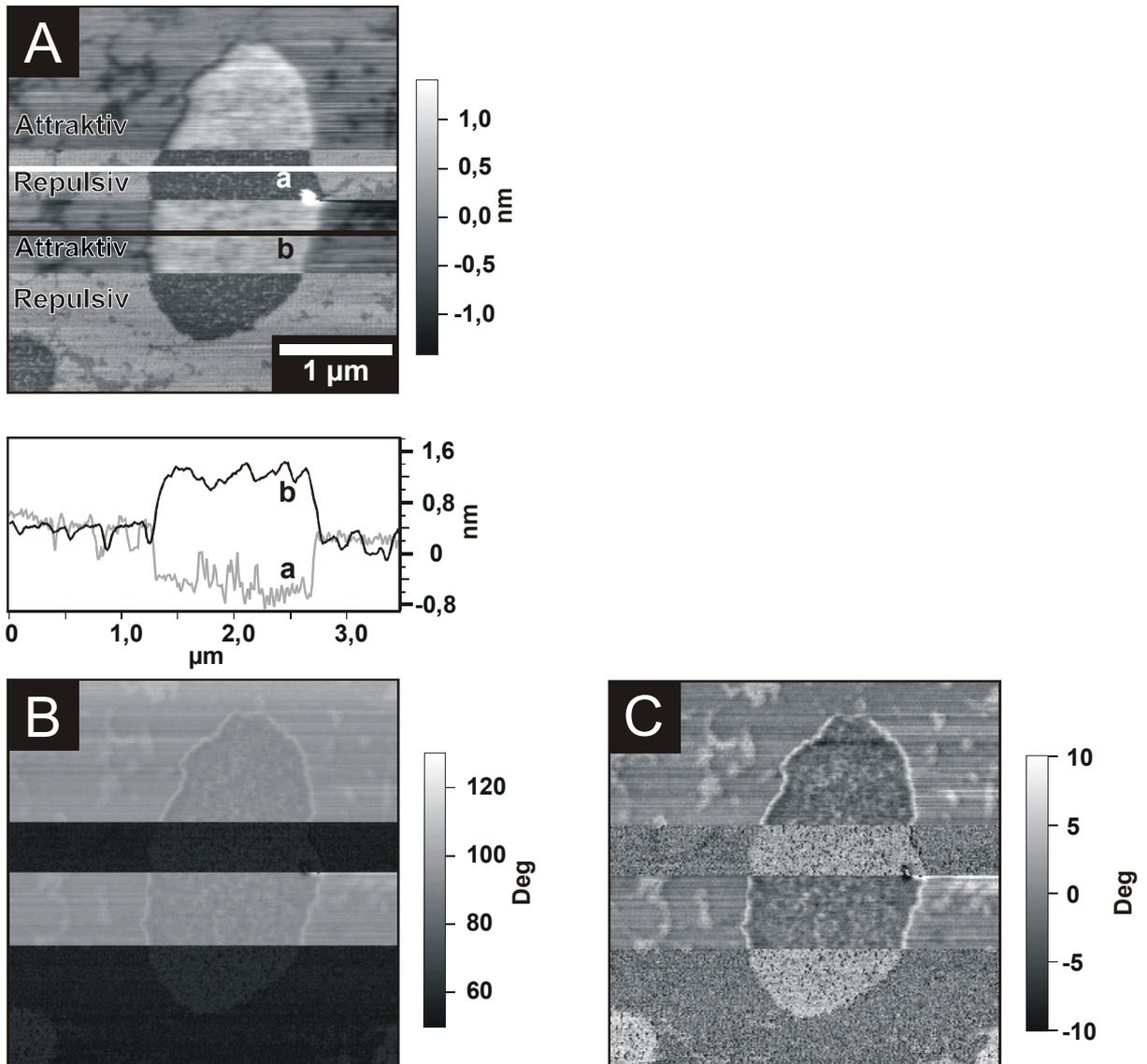


Abb. 20: AFM Bilder (AC Mode) eines bei $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ präparierten LB Films. Attraktive Kräfte führen im Vergleich zum repulsiven AC Mode und DC Mode zu einer Invertierung von Höhe und Phase zwischen fluiden und rigiden Domänen. (A) Attraktives und repulsives Höhenbild, (B) Phasenbild vor und (C) nach Normalisierung.

Verschiedene Arbeitsgruppen (Magonov et al., 1997; Deleu et al., 2001; Chen et al., 2002) haben bereits eine Phasenverschiebung auf Lipid/Proteinschichten und auch auf Polymermaterial beobachtet. Dabei zeigte sich, dass die Verschiebung von dem Verhältnis r_{SP} zwischen A_{SP} (Amplitude des Cantilevers, wenn der Sollwert erreicht ist) und A_0 (Amplitude

des freischwingenden Cantilevers) abhängig ist und auch die Größe von A_0 alleine relevant war. Die effektive Kraft zwischen Probe und Spitze nimmt mit abnehmendem r_{SP} und zunehmendem A_0 zu.

Um zu verstehen, wieso sich in dem Fall von Lipid A nicht nur das Phasenbild verändert, sondern auch das Höhenbild, wurde als erstes untersucht, ob in dem Phasenbild Informationen enthalten sind, die nachher zur Klärung der Höheninvertierung beitragen können. Dabei spielt die Phase φ eine große Rolle, da sie Informationen zur Änderung der Energiedissipation und damit zur Härte des Materials liefern kann.

Wenn die Amplitude des Cantilevers konstant gehalten wird, so ist der Sinus des Phasenwinkels proportional zu Änderungen der Dissipation zwischen Probe und Spitze. Die Phasenbilder stellen also eine Dissipations-„Landkarte“ dar (Cleveland et al., 1998). Literaturdaten (Chen et al., 2002) besagen, dass im repulsiven Bereich die Phase auf hartem Material (Mica) viel kleiner, also weiter von der Ausgangslage bei der Anregungsfrequenz f_0 entfernt ist als auf weichem (Liposomen). Das bedeutet, dass die fluiden Domänen im Lipid A-Monolayer im Verhältnis zur Umgebung weicher sind und nach der Cleveland-Formel

$$\bar{P}_{tip} = \frac{1}{2} \frac{kA^2\omega_0}{Q_{cant}} \left[\left(\frac{A_0}{A} \right) \sin \varphi - 1 \right] \quad ((\text{Cleveland et al., 1998}), \text{Formula (4)}), \quad (23)$$

also eine größere Energiedissipation \bar{P}_{tip} aufweisen. Dabei ist k die Federkonstante, A die Amplitude des Cantilevers (in Wechselwirkung mit der Probe) und A_0 die Amplitude des freischwingenden Cantilevers. ω_0 ist die natürliche Resonanzfrequenz des Cantilevers, Q_{cant} der Qualitätsfaktor und φ die Phase des Cantilevers.

Man kann allerdings nicht unterscheiden, ob die Domänen einfach tiefer liegen oder ob sie gegenüber der Cantileverspitze geringere repulsive Kräfte besitzen und somit ein tieferes Eindringen in den Film ermöglichen.

Die Kurven der Energiedissipation und der Phasenlage gegenüber der Amplitude A_0 verlaufen im attraktiven Bereich für harte und weiche Materialien nach Chen et al. nahezu deckungsgleich (Chen et al., 2002), so dass hieraus keine weiteren Informationen abgeleitet werden könnten. Im attraktiven AFM-Phasenbild erkennt man allerdings, dass die Umgebung um die Domäne herum einen Phasenwert besitzt, der weiter von der Phase bei f_0 zu höheren

Werten entfernt ist als der der Domäne. Die Domänen sind also weicher (Cleveland Formel (23)) und liegen entweder höher oder weisen größere attraktive Kräfte auf.

Die oben aufgezeigten Höhen- und Phaseninformationen können durch drei Modelle beschrieben werden (siehe Abb. 21).

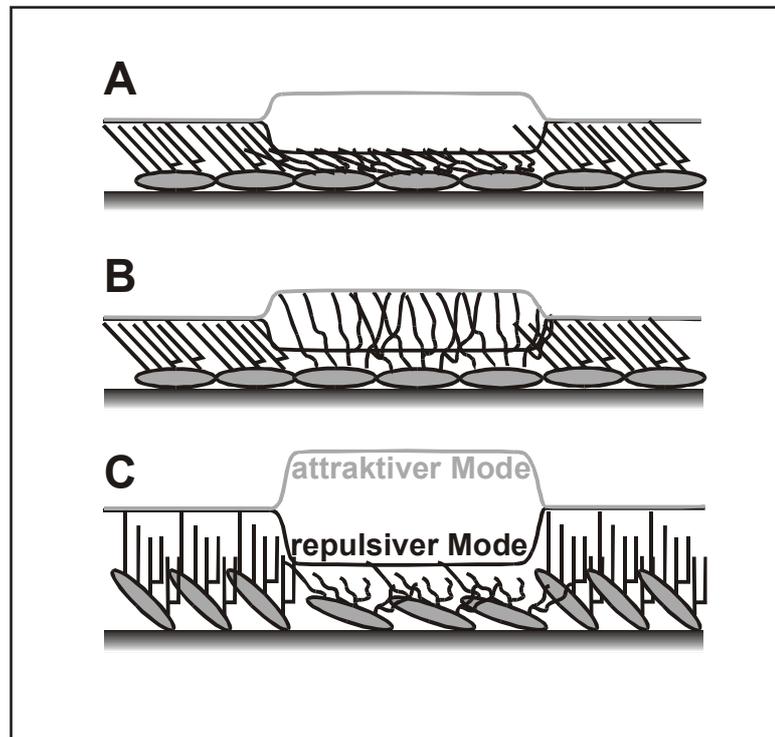


Abb. 21: Drei mögliche Modelle für die molekulare Organisation der Lipid A-Moleküle auf Mica. (A) Alle Diglucosamingruppen der Lipid A Moleküle befinden sich flach auf der Micaoberfläche. Die geeigneten fluiden Acylketten befinden sich auf einem tieferen Niveau als die rigiden. (B) Im Gegensatz zu Modell (A) besitzen die Acylketten in diesem Modell eine höhere Flexibilität und die fluiden sind nicht geneigt, so dass sie über die rigiden Bereiche hinausragen. (C) Die Diglucosamingruppen sind geneigt und die Acylketten sind senkrecht zum Mica orientiert. Die fluiden Bereiche sind wie in Modell (A) niedriger als die rigiden.

A) Dieser Ansatz geht davon aus, dass die Spitze nicht bzw. wenig in den darunter liegenden Lipidfilm eindringt. Er stützt sich auf die Hypothese, dass die Kopfgruppen des Lipid A parallel zur Oberfläche orientiert sind und die Acylketten dazu einen Winkel von 47° (Seydel et al., 2000) einnehmen. Dieser Winkel wurde durch Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) an Multischichten bestimmt. Das repulsive Höhenbild legt dann nahe, dass die fluiden Domänen tatsächlich tiefer liegen und sie durch die weniger ausgerichteten Fettsäuren des Lipid A in den fluiden Bereichen

verursacht werden. Das attraktive Höhenprofil impliziert bei diesem Modell, dass zwischen der Spitze und den fluiden Bereichen größere attraktive Kräfte wirken als zwischen rigider Umgebung und Spitze.

B) Für dieses Modell wird angenommen, dass die Kräfte zwischen Spitze und Lipid A-Molekülen in den rigiden und den fluiden Bereichen gleich groß sind.

Der Ansatz stützt sich wie Ansatz A) auf die Hypothese, dass die Kopfgruppen parallel zur Oberfläche orientiert sind. Nimmt man aber an, dass die rigiden Ketten geneigt und die fluiden aufgrund der höheren Beweglichkeit weniger bzw. nicht geneigt sind, so würden die fluiden Bereiche höher liegen als die rigiden. Unter diesen Umständen fällt es der Cantileverspitze im repulsiven Mode leichter, in die rigiden Bereiche einzudringen als in die fluiden.

C) Dieses Modell geht von derselben Erklärung für die Höhenbilder im repulsiven und attraktiven Mode wie Modell A) aus. Es postuliert aber, dass die beobachtete temperaturunabhängige Schulter der Druck/Flächen-Isothermen durch eine Umorientierung der mit einem Winkel Θ geneigten Lipid A-Moleküle verursacht wird. Dadurch werden die Kopfgruppen geneigt. Nimmt man eine Übertragung des Neigungswinkels bei der Erstellung eines LB Films an, so besitzen sowohl die rigiden als auch die fluiden Kopfgruppenbereiche eine Neigung auf dem festen Untergrund, während sich die Acylketten senkrecht zum Mica befinden.

Es gibt zwei mögliche Gründe für die im attraktiven und repulsiven Mode unterschiedlich aussehenden Höhenbilder. In den Modellen A) und C) sind die fluiden Domänen im Vergleich zu den rigiden niedriger. Beide Annahmen erklären auf eine anschauliche Weise die im DC und repulsiven AC Mode gewonnenen Ergebnisse. Um die im attraktiven AC Mode erhaltenen Resultate zu verstehen, müssen stärkere attraktive Kräfte zwischen der Cantileverspitze und den Molekülen der fluiden Bereiche angenommen werden.

Im Modell B) wird angenommen, dass die fluiden Domänen höher sind. Hierdurch sind die Bilder im attraktiven AC Mode erklärbar und die repulsive Höheninformation würde dadurch herrühren, dass die Spitze tiefer in die fluiden Bereiche eindringen kann.

Da auch in der Literatur beschrieben wird (Rinia et al., 2000), dass fluide Fettsäuren von Phospholipiden kürzer sind als rigide scheint Modell A) zunächst eine gute Lösung zu sein.

Der in der Literatur erwähnte Längenunterschied der Fettsäuren ist jedoch kleiner als die für Lipid A gemessene Differenz von ca. 1,2 nm (Abb. 20). Nach Rinia et al. beträgt der Höhenunterschied eines DPPC-Bilayers zwischen gelförmiger und fluider Phase 1 nm, der eines DSPC-Bilayers 0,6 nm.

Berger et al. sind davon ausgegangen, dass die unterschiedlich großen attraktiven Kräfte durch die weniger hydrophoben CH₂ Gruppen der Fettsäuren verursacht werden, die eine stärkere Adhäsion der Si₃N₄-Cantileverspitze bewirken als die terminalen CH₃ Endgruppen (Berger et al., 1995). Die LC-Domänen des Monolayers sind kristallin, so dass die Cantileverspitze nur mit den CH₃ Gruppen interagieren kann.

Aus diesem Grund scheint es sinnvoll, dass für das Verstehen der Ergebnisse sowohl attraktive Kräfte als auch die Eindringtiefe der Cantileverspitze in den Monolayer anzunehmen.

Das Modell B) hat im Gegensatz zu den Modellen A) und C) den Nachteil, dass keine Aussagen über die Höhe der attraktive Kräfte zwischen Cantilever und Lipidfilm in den rigiden und fluiden Bereichen möglich sind. Mit Hilfe der Dissipations-, „Landkarte“ lässt sich lediglich annehmen, dass die fluiden Domänen weicher sind als die rigiden.

Die Annahme des Extremfalls, dass die Spitze so gut wie gar nicht in den Film eintaucht, ist mit Sicherheit genauso extrem wie die Hypothese eines leichten Eindringens in die Lipidschicht. Wahrscheinlich befindet sich die Lösung zwischen den drei Modellen.

3.3.4 Druckabhängigkeit von Domänen in unterschiedlichen LPS-Monolayern

Es wurden LB Filme von Lipid A bei verschiedenen Drücken präpariert und anschließend AFM Höhenbilder von ihnen aufgenommen (DC Mode, MSCT-AUNM E) (Abb. 22A-E).

Die Größe und die Gesamtfläche der LE-Domänen nimmt mit zunehmendem Druck ab. Bei einem lateralen Druck $< 25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sind die Domänen nahezu kreisförmig. Bei höheren Drücken wird die Form der Domänen komplexer. Die bei lateralen Drücken $> 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ gebildeten Domänen waren gerade eben noch bzw. nicht mehr mit dem Epifluoreszenzmikroskop auflösbar.

In den Bildern ist eine offensichtliche Abnahme der Größe der LE-Domänen zu beobachten, dennoch muss in Betracht gezogen werden, dass es trotzdem möglich ist, dass bei zunehmendem lateralen Druck die Anzahl der Moleküle pro Fläche zunimmt.

Bezüglich dieser Frage, ob die Gesamtabnahme der Fläche der fluiden Domänen in den Lipid A-Monolayern durch die Flächenabnahme des Monolayers auf der Filmwaage oder der zunehmenden Rigidisierung der Lipide verursacht wird, wurden die fluiden Bereiche (im Höhenbild dunkel dargestellt) durch einen iterativen oder bimodalen Algorithmus (MFP-Software) bestimmt. Hierfür wurde für verschiedene Scanbereiche die durchschnittliche Größe der dunklen Bereiche bestimmt. Die Partikelanalyse bewertet nur bei kleinen Scanbereichen (5 und 10 μm) die Domänenränder nicht fehlerhaft. Bei größeren Scanbereichen (20 und 50 μm) steigt das Verhältnis zwischen Umfang und Fläche an und verursacht somit eine stark fehlerbehaftete Analyse. Im Folgenden wurde für die Auswertung ein Scanbereich von 10 μm betrachtet.

Die durchschnittliche Größe eines Lipid A Moleküls (1,2 nm^2) wurde aus der Filmwaagenisotherme bestimmt. Hierbei handelt es sich allerdings nur um eine Abschätzung, da sich in dem Monolayer sowohl fluide als auch rigide Moleküle befinden, die einen jeweils kleineren oder größeren Flächenbedarf besitzen können. Aus diesem Grund handelt es sich auch bei den in Abb. 22F verwendeten Werten für die Anzahl der Lipid A-Moleküle pro Domäne um einen Durchschnittswert. Eine Korrelation zwischen der durchschnittlichen Anzahl an Molekülen pro LE-Domäne und dem lateralen Druck Π zeigt einen annähernd exponentiellen Abfall (Abb. 22F). Dadurch ist ersichtlich, dass die druckabhängige Veränderung des Lipid A-LB Films auf eine zunehmende Rigidität zurückzuführen ist.

Es wurden außerdem LB Filme von R595 LPS präpariert. In Abb. 23 sind die im DC Mode abgescannten Filme für einen lateralen Druck von 10 und 30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ zu sehen. Hierbei fällt auf, dass die fluiden Domänen des R595 um ca. eine Größenordnung kleiner sind als die des Lipid A. Sie haben jedoch ebenfalls eine runde Form und weisen auch eine Druckabhängigkeit auf. Der Gesamtanteil der fluiden Domänen von R595 LPS ist bei einem festen Druck kleiner als der von Lipid A. R595 LPS hat beispielsweise bei 10 mNm^{-1} einen fluiden Anteil von $(21 \pm 5) \%$ und Lipid A von $(28 \pm 5) \%$.

Hinsichtlich der Übertragbarkeit, der biologischen Relevanz der nachfolgenden Ergebnisse, und auch bezüglich der Wirkung von Antibiotika ist die Ähnlichkeit zwischen Lipid A und R595 LPS-Domänen ein sehr wichtiges Resultat.

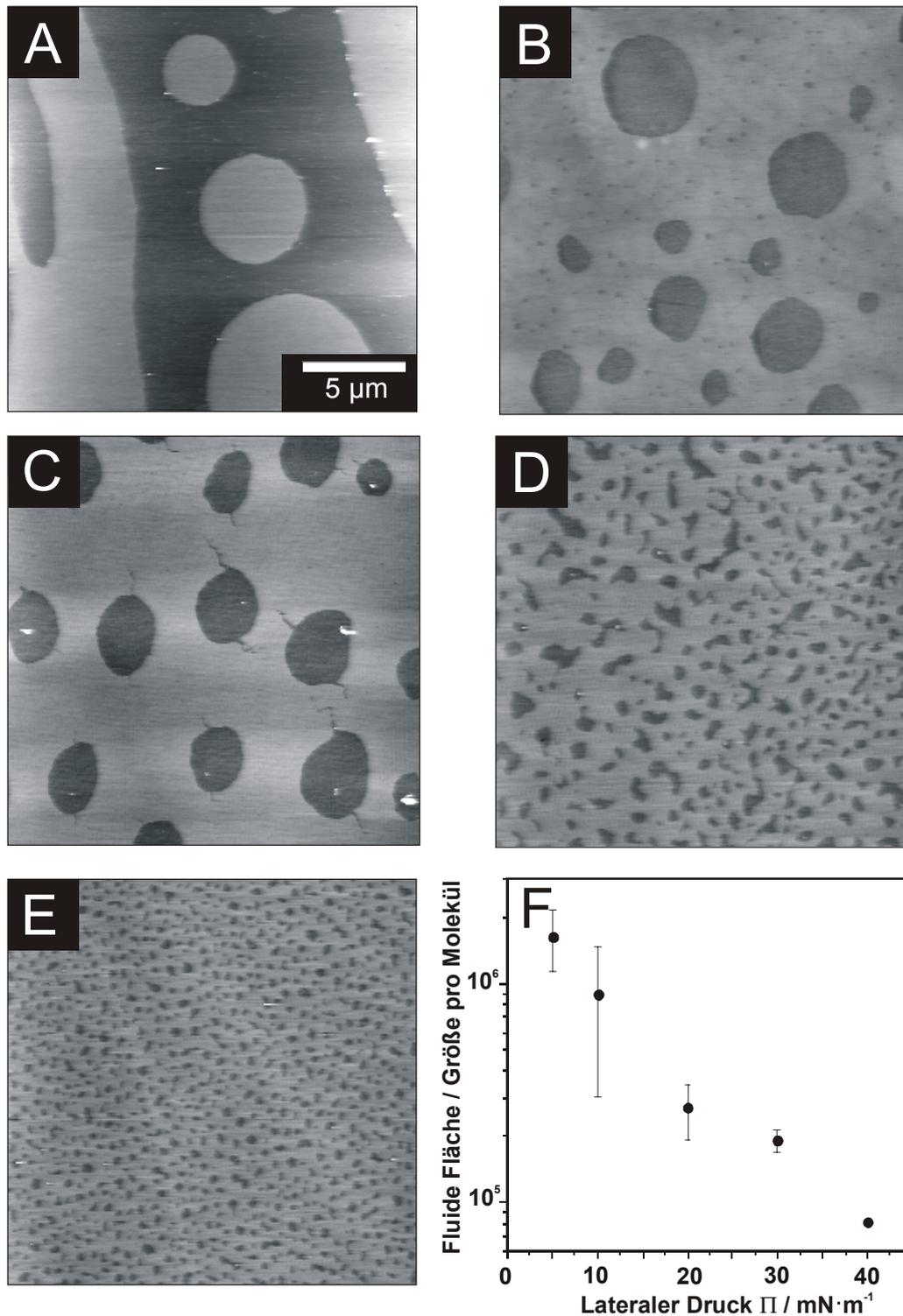


Abb. 22: AFM Höhenbilder (DC Mode, AUNM-MSCT E, Grauswertebereich jeweils 4 nm) von Lipid A-Monolayern, die bei verschiedenen lateralen Drücken präpariert wurden. Die Anzahl der fluiden Moleküle pro Domäne nimmt bei zunehmendem lateralen Druck ab: (A) 5 mN·m⁻¹, (B) 10 mN·m⁻¹, (C) 20 mN·m⁻¹, (D) 30 mN·m⁻¹ und (E) 40 mN·m⁻¹. (F) Korrelation zwischen der durchschnittlichen Anzahl der Lipidmoleküle pro fluiden Domäne und dem lateralen Druck. Die Anzahl der Moleküle wurde mit Hilfe der durchschnittlichen Fläche pro Molekül berechnet, deren Wert aus einer Isothermen bekannt war.

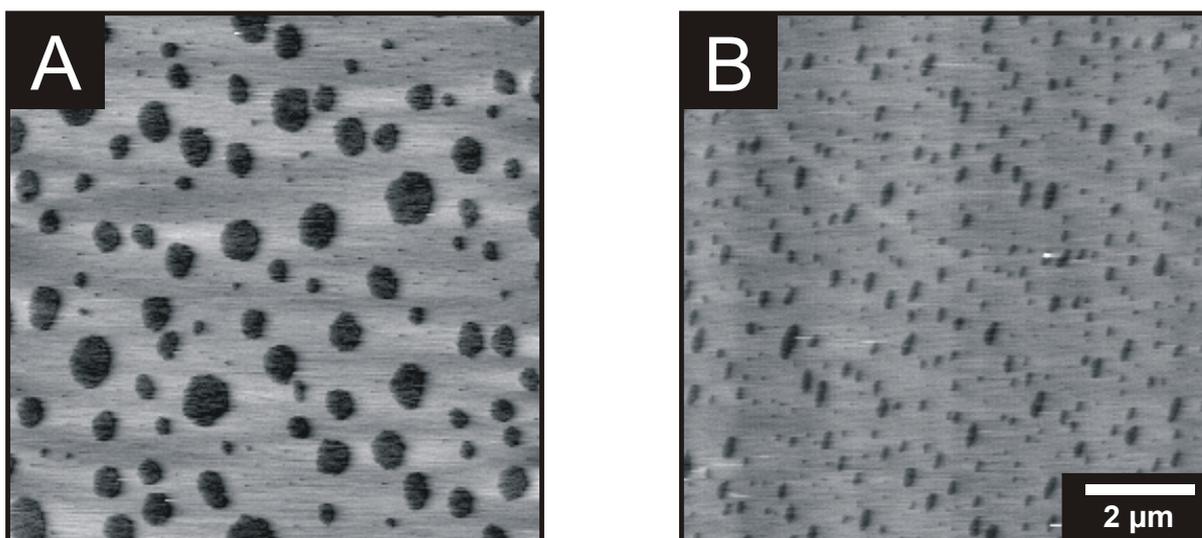


Abb. 23: Die fluiden Domänen von R595 LPS sind kleiner als die von Lipid A. AFM Höhenbilder (DC Mode, AUNM-MSCT E, Grauwertebereich jeweils 4 nm) von LB Filmen von R595 LPS bei (A) $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ und (B) $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Aus infrarotspektroskopischen Daten ist bekannt, dass die Temperatur des gel-flüssig kristallin Phasenübergangs der Kohlenwasserstoffketten von Lipid A ($T_c = 43^\circ\text{C}$) höher ist als die der Verbindung 406 ($T_c = 20^\circ\text{C}$) und auch von R595 LPS ($T_c = 33^\circ\text{C}$) (Brandenburg et al., 1997). Betrachtet man einen bei $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ aufgezogenen LB Film von der Verbindung 406 (Abb. 24), so erkennt man keinerlei Domänenbildung. Aus diesem Grund wird angenommen, dass sich alle Moleküle der Verbindung 406, die in ihrer Fettsäurezusammensetzung homogen sind, in dem Monolayer in der LE Phase befinden. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass in einem Film, der aus einer Mischung von Lipid A und der Verbindung 406 (1:1 M:M) bei $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ präpariert wurde, große LE-Domänen zu sehen sind.

Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass sich die Verbindung 406 hauptsächlich in den LE-Domänen aufhält, während sich das Lipid A in den LC-Domänen befindet (Daten nicht dargestellt).

Es könnte sein, dass die Heterogenität der Fettsäurezusammensetzung der Lipide die Phasenseparation verursacht. Da jedoch die Zusammensetzung nach massenspektroskopischer Analyse für das R595 LPS und seinem isolierten Lipid A fast identisch ist, ist die Annahme naheliegend, dass die unterschiedlichen Domänengrößen von R595 LPS und seinem Lipid A auf den Einfluss der zwei zusätzlichen 3-Deoxy-D-manno-Oct-2-Ulosensäuren zurückzuführen sind.

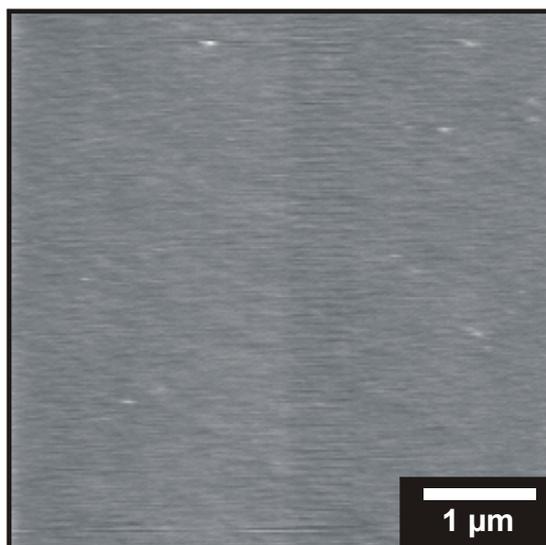


Abb. 24: Ein LB Film der synthetisch hergestellten Verbindung 406 ist bei $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ homogen (AFM Höhenbild, DC Mode, AUNM-MSCT E, Grauwertebereich 2 nm).

3.4 Wirkung antibakterieller Peptide auf Bakterien und LPS-Monolayer

Für die Entwicklung neuer antimikrobieller Agenzien ist es wichtig, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ihrer Interaktion mit Membranen, dem ersten Target zu verstehen. Um einen optischen Eindruck davon zu gewinnen, wie Bakterien auf antimikrobielle Substanzen reagieren sind in diesem Kapitel rasterkraftmikroskopische Aufnahmen eingetrockneter R595 Bakterien abgebildet, die zuvor mit antimikrobiellen Substanzen inkubiert wurden.

Hierzu wurde eine Bakterienvorkultur in 10 ml LB Medium (LB-Bouillon (Miller) von Merck, Darmstadt, Deutschland. Typische Zusammensetzung: 10 g/l Pepton aus Casein, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid) angelegt, die über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (160 U/min) aufbewahrt worden ist. Am zweiten Tag wurde die Vorkultur zunächst um den Faktor 1:100 verdünnt und anschließend nach drei Stunden Wartezeit 10 µM (Endkonzentration) humanes β -Defensin 3 (hBD-3) bzw. Polymyxin B (PMB) zugegeben. Von diesem Gemisch wurden nach einer halben Stunde 50 µl auf ein Micaplättchen gegeben. Nach weiteren fünf Minuten ist die Restflüssigkeit mit Filterpapier entfernt worden. Bevor die Bakterien mit dem AFM abgescannt wurden, sind die eingetrockneten Bakterien vorsichtig mit Leitungswasser abgespült worden, um Reste des eingetrockneten Mediums zu entfernen. Desweiteren sind die antimikrobiellen Substanzen (hBD-3 bzw. PMB) zur Interkalation unter einen R595 LPS- bzw. Lipid A-Monolayer gespritzt worden, um die entsprechenden LB Filme mit dem AFM topographisch zu untersuchen.

3.4.1 Wechselwirkung von humanem β -Defensin 3 (hBD-3) mit einem R595 LPS Langmuir-Blodgett Film

Humanes β -Defensin hBD-3 (Abb. 25) wurde erstmals aus Hautzellen von Psoriasispatienten isoliert (Harder et al., 1997; Harder et al., 2001). Es wird in den Keratinozyten und Lungenepithelzellen gebildet und weist antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram-positiven (*Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*) und Gram-negativen Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *S. Minnesota*), sowie gegen die Hefe *Candida albicans* auf. Das Defensin ist bereits bei niedrigen µg/ml Konzentrationen aktiv. Durch Kontakt der Epithelzellen mit Bakterien wird die Genexpression von hBD-3 induziert, was darauf hinweist, dass das Defensin durch inflammatorische Stimuli gebildet werden kann.

Das verwendete hBD-3 (MW 5155 Da) ist freundlicherweise von Jens Schröder (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt worden. Es wurde zu 0,1 mg/ml in 0,01 % Essigsäure gelöst, bei -70°C gelagert und unverdünnt bei der Präparation der LB Filme eingesetzt.

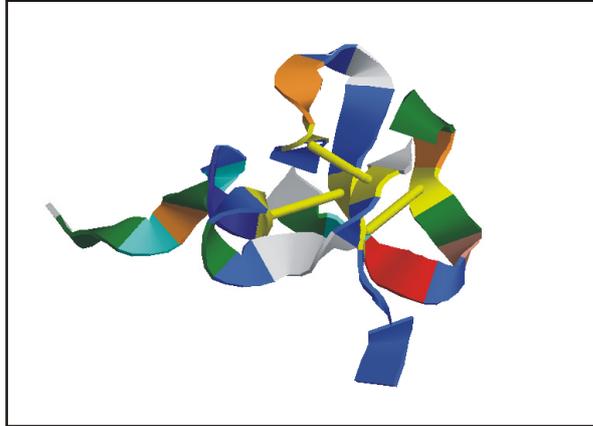


Abb. 25: Bänderdarstellung des hBD-3 im internationalen Farbcode für die Verschlüsselung der Aminosäuren (RasMol amino colour scheme). Hierbei handelt es sich um eine von 20 möglichen berechneten NMR Strukturen des PDB Codes (1KJ6) (Schibli et al., 2002).

In Abb. 26 ist rechts das Höhenbild eingetrockneter R595 Bakterien zu sehen, die wie zuvor in Abschnitt 3.4 beschrieben mit hBD-3 inkubiert worden sind. Links daneben befindet sich das Höhenprofil unbehandelter R595 Bakterien. Durch die Inkubation mit hBD-3 verändert sich die Oberfläche der Bakterien von einer glatten Struktur zu einer blasenartigen, sie wird rauer.

Um zu sehen, welchen Einfluss das humane β -Defensin hBD-3 auf die Domänenbildung von R595 LPS hat, wurden 100 μl hBD-3 (Endkonzentration 26 nM) vorsichtig mit einer Hamiltonspritze unter verschiedene Stellen eines stabilen R595 LPS-Monolayers gespritzt. Durch die Flächenzunahme des Monolayers konnte über 2 h ein Einbau beobachtet werden. Danach wurde ein LB Film von R595 LPS auf Mica erzeugt, der somit interkaliertes hBD-3 enthielt. Man erkennt deutlich die veränderte Domänenform im Vergleich zum reinen R595 LPS-LB Film (Abb. 27). Die fluiden Gebiete erscheinen an den Übergängen zwischen rigiden und fluiden Bereichen ausgefranst. Aus Messungen an planaren Membranen, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, ist bekannt, dass hBD-3 in künstlichen Membranen, die die Lipidmatrix der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien nachbilden, Läsionen verursacht und zu deren Permeabilisierung führt. In Bakterientests kommt es zum Absterben der mit hBD-3 behandelten Bakterien (Abb. 26). Die hier vorgestellten Messungen führen zu

der Hypothese, dass sich das hBD-3 bevorzugt in den Domänengrenzen einbaut und dabei Instabilitäten des Monolayers ausnutzt.

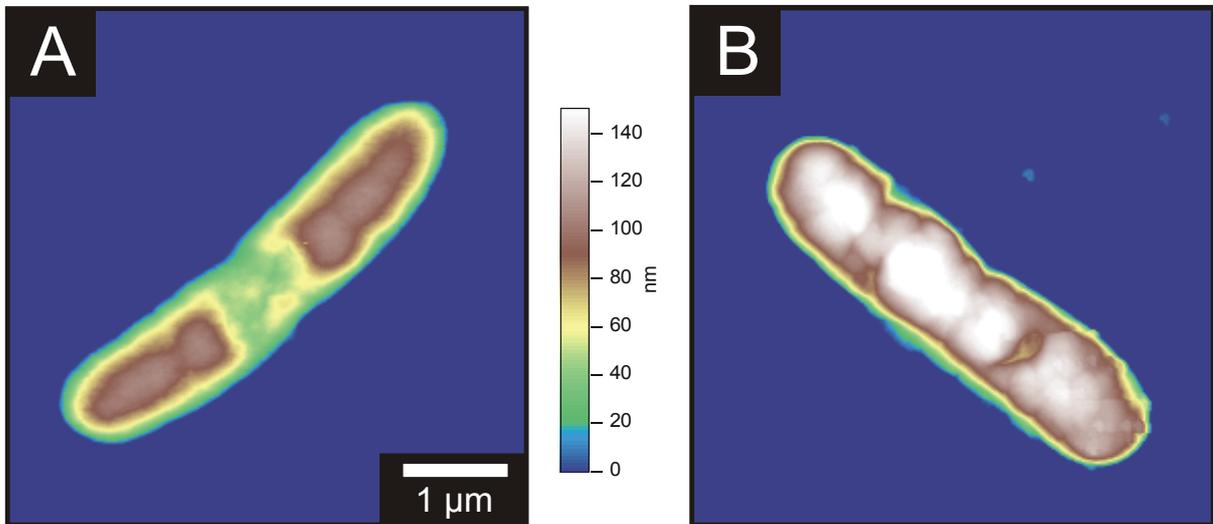


Abb. 26: AFM Höhenbilder (AC Mode, NSG11, Farbbereich 150 nm) eines (A) eingetrockneten R595 Bakteriums (Kontrolle) und (B) mit hBD-3 inkubierten R595 Bakteriums.

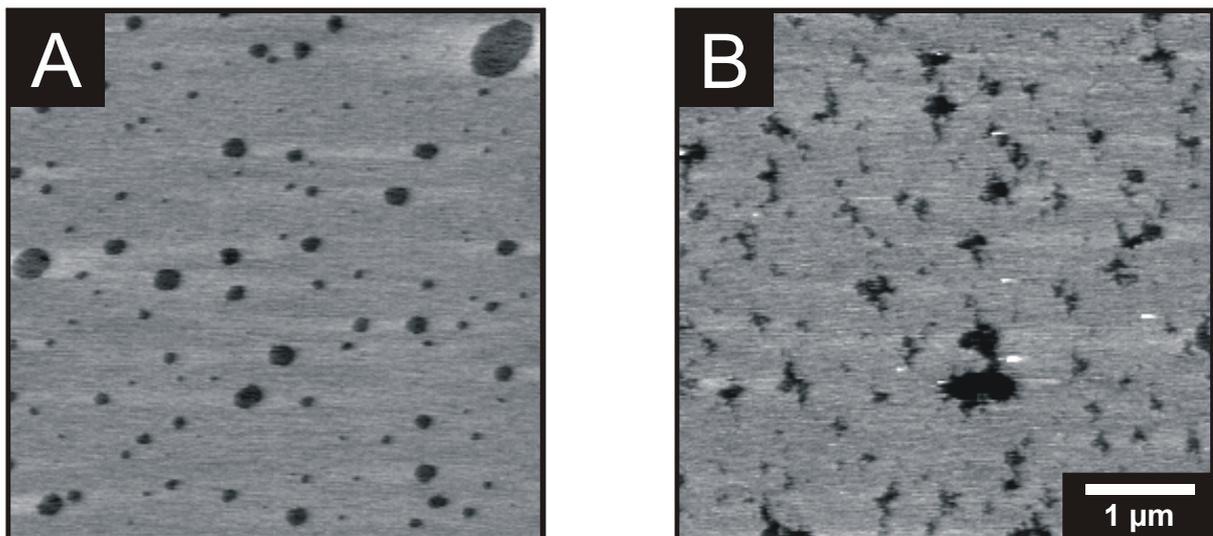


Abb. 27: Der Einbau des Defensins hBD-3 in einen R595 LPS-Monolayer verändert das Erscheinungsbild der Domänen. LB Filme bei $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ von (A) R595 LPS und (B) R595 LPS mit hBD-3 (AFM Höhenbilder, DC Mode, AUNM-MSCT E, Grauwertebereich jeweils 2 nm).

Um zu untersuchen, ob sich das hBD-3 an das in der Subphase hängende Micaplättchen anlagert, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dazu wurde ein Micaplättchen in die im Langmuir-Trog befindliche Flüssigkeit (5 mM HEPES, pH 7) gehängt und das hBD-3 in die Flüssigkeit hineingespritzt. Es befand sich kein Monolayer an der Luft/Wasser-Grenzfläche.

Nach 1 h Wartezeit wurde die Flüssigkeit abgesaugt und anschließend das Micaplättchen mit dem AFM abgescannt. Hierbei wurde eine sehr dünne, gleichmäßige Bedeckung sichtbar. Inwiefern die Bildung dieser Strukturen durch die Anwesenheit des R595 LPS-Monolayers an der Luft/Wasser Grenzfläche beeinflusst wird, ist nicht bekannt.

3.4.2 Wechselwirkung von Polymyxin B (PMB) mit einem Lipid A-Langmuir-Blodgett Film

PMB (Abb. 28) ist ein Stoffwechselprodukt aus *Bacillus polymyxa* und wurde erstmals 1947 isoliert. Es besitzt ein antibakterielles Wirkungsspektrum gegenüber Gram-negativen Bakterien, vor allem *Escherichia coli* und verschiedene Stämme von *Pseudomonas* und *Salmonella*. Alle Gram-positiven Keime und auch Mykobakterien sind gegenüber PMB resistent (Otten et al., 1975).

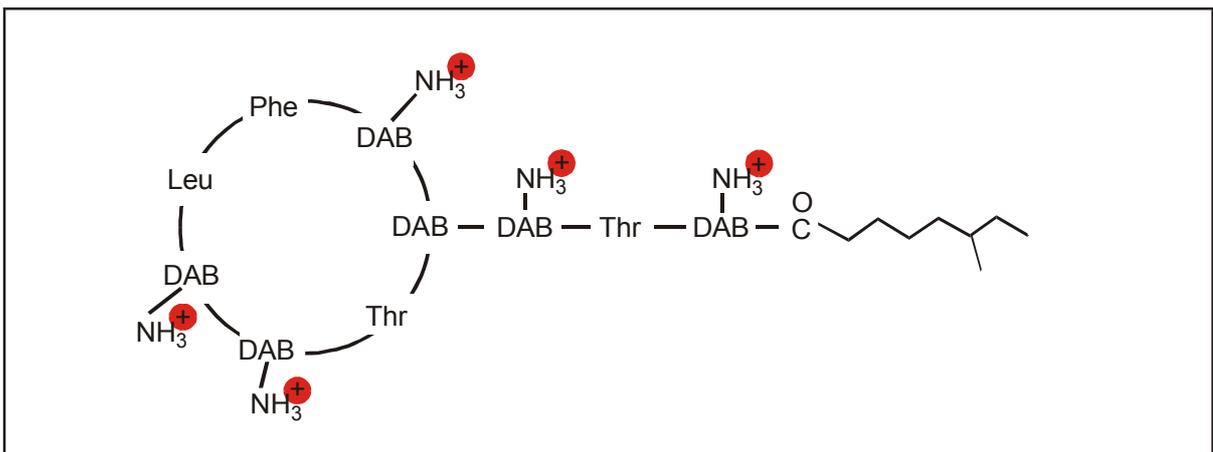


Abb. 28: Chemische Struktur von Polymyxin B. Die Diaminobuttersäurereste (NH_3^+) tragen die positiven Ladungen.

In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass PMB zunächst an die äußere Membran bindet und diese dann durch die Bildung von transienten Läsionen permeabilisiert (Schröder et al., 1992). Im zweiten Schritt führt die Störung der Integrität der Zytoplasmamembran zum Absterben der Zelle (Vaara, 1992).

Polymyxin B ist ein basisches, zyklisches Peptid mit einer Peptidseitenkette, an deren Ende Isopelargonsäure steht. Durch die Diaminobuttersäurereste weist PMB maximal fünf positive Nettoladungen auf. Der Durchmesser des amphiphilen PMB Moleküls beträgt 1,23 nm (El Mashak und Tocanne, 1980).

Das Polymyxin B wurde von der Firma Sigma Chemie (Deisenhofen, Deutschland) als Polymyxin B-Sulfat bezogen. Es hat eine relative Molmasse von etwa 1300 Da und wurde für die Experimente zu 0,1 mg/ml in Subphase gelöst und bei -20°C gelagert.

Das Höhenbild eines eingetrockneten *S. minn.* Bakteriums des Stammes R595, das zuvor mit PMB inkubiert worden ist (Abb. 29), zeigt eine großflächige Störung der Membranintegrität. Diese führt letztendlich zum Absterben des Bakteriums.

Zur Untersuchung des Verhaltens von PMB bezüglich eines Monolayers, wurde das PMB dicht unter die Oberfläche des Lipid A-Films gespritzt. Es interkalierte in den Monolayer bei einem Druck von $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, was durch eine Flächenzunahme beobachtet werden konnte. Aus vorangegangenen Publikationen der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass PMB zu einer Fluidisierung von LPS Membranen führt (Wiese et al., 1997). Auch in rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen des LB Films zeigt sich, dass PMB die Domänenstruktur des Lipid A-Monolayers stark verändert. Es sind jedoch in Abb. 30 zwei Effekte zu sehen. Zum einen existieren runde Strukturen mit einem Durchmesser von bis zu $20 \mu\text{m}$ und einer Höhe von bis zu 40 nm (Abb. 30B zeigt kleinere runde Strukturen). Zum anderen verändern sich die Strukturen der LE-Domänen, offensichtlich führt der Einbau von PMB in Lipid A zu einer Vergrößerung der fluiden Bereiche. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine schlichte Vergrößerung der Domänen. Wie man in der detaillierten Aufnahme (Abb. 30C) sehen kann, besitzen die durch PMB induzierten Domänen eine unregelmäßige Form. Es ist allerdings aus diesen Aufnahmen nicht zu entnehmen, ob die Domänen durch eine Separation der verschiedenen Phasen des Lipid A oder des Lipid A zusammen mit dem PMB verursacht werden.

Auch in den PMB-enthaltenden Lipid A-Domänen kommt es zu einer Invertierung von Höhen- und Phasenbild im repulsiven und attraktiven AC Mode. Aus diesem Grund wird postuliert, dass das PMB nicht die generellen Eigenschaften des Lipid A-Monolayers verändert.

Die Bindung des polykationischen PMB an das negativ geladene Lipid A kommt hauptsächlich durch eine elektrostatische Wechselwirkung zustande (Wiese et al., 1998). Die Höhe der großen runden Strukturen kann nicht alleine durch eine einfache Adsorption von PMB-Molekülen an den Lipid A-Monolayer erklärt werden. Vieles weist daraufhin, dass kleine Aggregate der PMB-Moleküle an die Kopfgruppe des Lipid A binden. Aus vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe bezüglich der durch PMB induzierten

Permeabilisierung planarer Membranen, die die äußere Membran Gram-negativer Bakterien imitierten, wurde geschlossen, dass die elektrostatische Wechselwirkung zwischen PMB und den negativ geladenen Lipiden zu einer Zunahme der PMB Konzentration in der Nähe der Membran führt.

Bei der Erstellung der LB Filme wurde eine PMB Stammlösung mit einer Konzentration von 60 μM verwendet. Dieser Betrag liegt weit unter der CMC (*critical micelle concentration*) von PMB (ca. 10 mM). Im Langmuir-Trog der Filmwaage wurde das PMB in einer Endkonzentration von 16 nM eingesetzt. Eine Anwesenheit von PMB Mizellen in der eingespritzten Lösung kann ausgeschlossen werden, unsere Hypothese geht jedoch davon aus, dass die hohe PMB Konzentration in der Nähe des Monolayers zu einer Bildung von Mizellen führt. Dieses wird dadurch unterstrichen, dass Mizellen an Lipidmonolayer binden. Die gezeigten Ergebnisse stimmen also gut mit dieser Hypothese überein.

Um wie bei hBD-3 zu untersuchen, ob sich das in der Subphase befindliche PMB an das Micaplättchen anlagert, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.1). Da PMB dazu neigt, selbst einen Monolayer auf einer wässrigen Phase zu bilden, wurde vor der Entnahme des Kontrollmicaplättchens aus dem Langmuir-Trog sehr sorgfältig die Luft/Wasser Grenzfläche und auch die restliche Subphase abgesaugt. Es konnte bei der rasterkraftmikroskopischen Überprüfung keine Veränderung der reinen Micaoberfläche festgestellt werden.

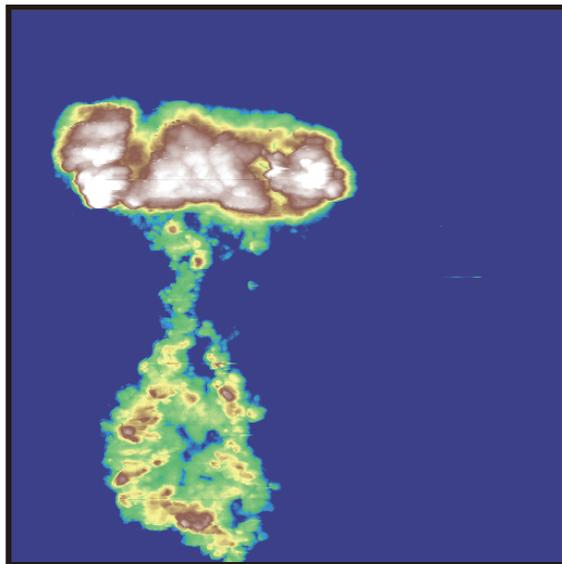


Abb. 29: AFM Höhenbild (AC Mode, NSG11, Farbereich 150 nm) eines mit PMB inkubierten *S. minn.* Bakteriums des Stammes R595.

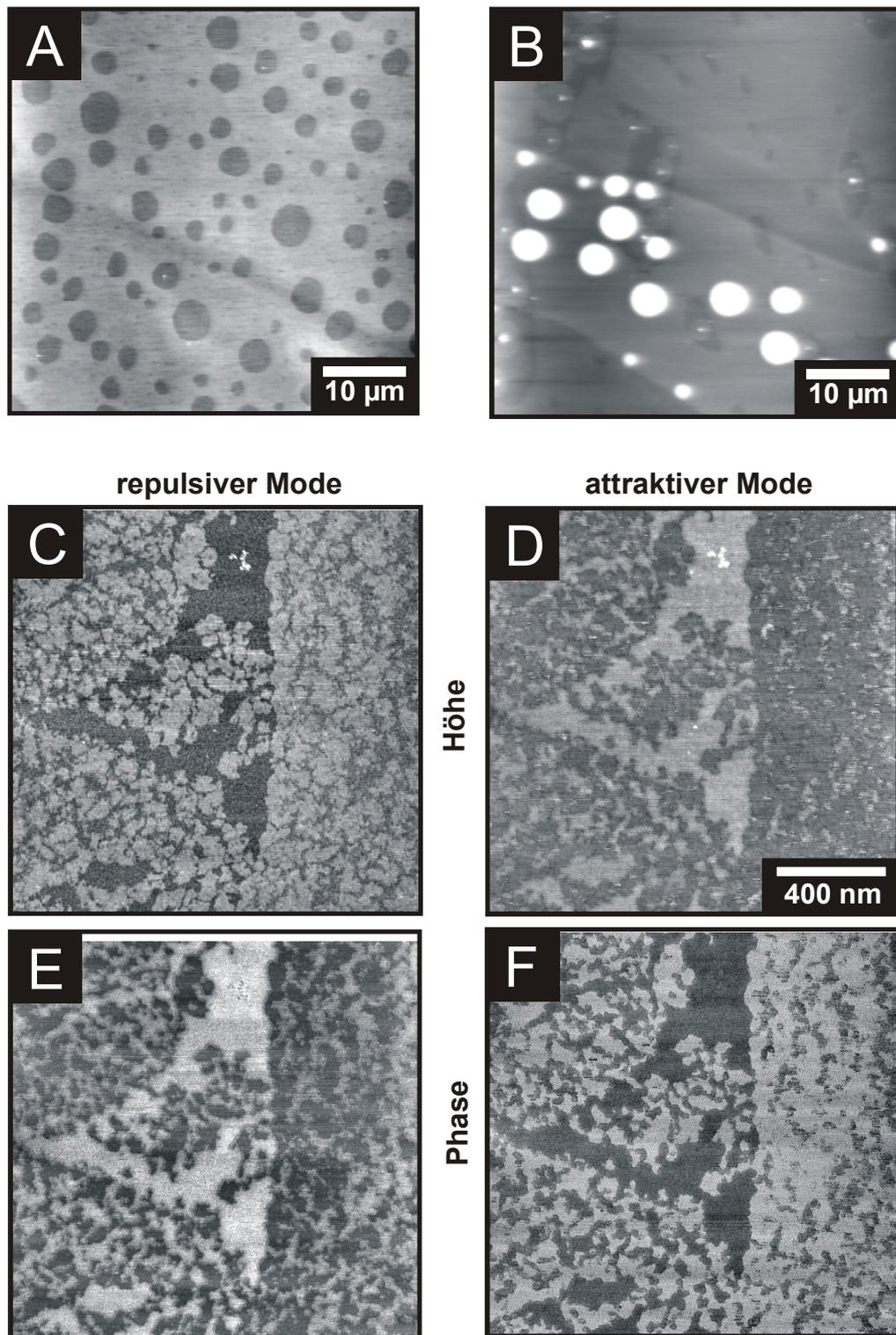


Abb. 30: Der Einbau von Polymyxin B (PMB) führt zu einer Fluidisierung des Lipid A-Monolayers und der Anlagerung von PMB Mizellen. AFM Höhenbilder (DC Mode) eines bei $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ präparierten LB Films aus (A) Lipid A (4 nm Grauswertebereich) und (B) Lipid A mit PMB (Grauswertebereich von -10 nm bis 6 nm). AFM Höhen- (Grauswertebereich 1 nm) und Phasenbilder im repulsiven (C, E) und im attraktiven (D, F) Mode.

3.5 Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel 3

Lipidmonolayer an der Luft/Wasser Grenzfläche oder auch festkörperunterstützt (*solid supported*) stellen das am stärksten vereinfachte Rekonstitutionsmodell biologischer Membranen dar. Aufgrund ihres einfachen Aufbaus ist es möglich, Eigenschaften wie z.B. die Domänenformation nicht nur für synthetische Phospholipide, sondern auch für komplexere Glykolipide wie LPS zu beschreiben.

Für das Verständnis antibakterieller Aktivität gegen Gram-negative Bakterien ist es sehr wichtig, die Eigenschaften der LPS Matrices zu kennen, da die Oberfläche dieser Bakterien aus LPS-Molekülen aufgebaut ist.

In vielen Arbeitsgruppen werden Phospholipide verwendet, um Bakterienmembranen nachzubilden. Um die spezifischen Interaktionsmechanismen und auch die Mechanismen, die zu einer Resistenz von Bakterien führen, zu verstehen, ist es jedoch notwendig, diejenigen Lipide genauer zu untersuchen, aus denen die äußere Membran Gram-negativer aufgebaut ist. In vorangegangenen Publikationen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die speziellen Eigenschaften des LPS ausschlaggebend für die Wirkungsmechanismen der Kathelizidine (Gutsmann et al., 1999), des Amöbapors (Gutsmann et al., 2003), des PMB (Wiese et al., 1998), und auch der Porine (Hagge et al., 2002) ist. In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf Monolayern, die aus LPS der Tiefrauhmutante R595 von *Salmonella enterica* sv. Minnesota (R595 LPS) und seinem isolierten Lipid A Teil präpariert worden sind.

Beide Lipide befinden sich bei biologisch relevanten Drücken (10 und $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) in einem Koexistenzbereich von LE und LC Phasen. Mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops und auch des Rasterkraftmikroskops können die LE- und LC-Domänen beobachtet werden. AFM Bilder enthalten jedoch zusätzlich Informationen über die unterschiedliche Höhe von den in unterschiedlichen Phasen befindlichen Lipiden. Es auch möglich, Bilder der verschiedenen Phasen bei höheren lateralen Drücken aufzunehmen, bei denen die optische Auflösung eines Lichtmikroskops nicht mehr ausreicht, die kleiner werdenden LE-Domänen sichtbar zu machen.

Die Interpretation der im dynamischen AC Mode gewonnenen AFM Bilder ist besonders komplex. Aufgrund unterschiedlich großer Anziehungskräfte zwischen der Cantileverspitze und den LE- bzw. LC-Domänen erscheinen die im repulsiven Mode aufgenommenen Höhenbilder im Vergleich zum attraktiven Mode invertiert.

Im Gegensatz zu Chen et al. konnten wir auch im attraktiven Mode eine Phasenverschiebung zwischen weichen (LE-Domänen) und harten (LC-Domänen) Materialien beobachten (Chen et al., 2002).

Hollars et al. stellten die Bildung kleiner Lipiddomänen fest, die durch den Trocknungsprozess nach dem Transfer des Lipidfilms auf Mica verursacht werden (Hollars und Dunn, 1998). Für die in dieser Arbeit verwendeten Glykolipide konnte jedoch gezeigt werden, dass die Domänen in dem Monolayer an der Luft/Wasser Grenzschicht und in dem LB Film nahezu identisch sind.

Die Interaktion des humanen Betadefensins hBD-3 und auch des polykationischen antimikrobiellen Peptids PMB mit einem anionischen LPS-Monolayer hat jeweils eine deutliche Änderung der Domänenstruktur zur Folge. Die Messungen führen im Falle des hBD-3 zu der Hypothese, dass sich das Defensin bevorzugt in den Domänengrenzen einbaut. Bei dem PMB kommt es zusätzlich zu einer Änderung der Domänenstruktur zu einer Adsorption von PMB-Aggregaten an den LPS-Monolayer.

4 Biophysikalische Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen dem LPS-bindenden Protein LBP, Phosphatidylserin und LPS

Beim Eindringen von Bakterien in den Organismus reagiert das Immunsystem von Säugern im Rahmen der zellulären Antwort mit der Aktivierung von Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (Abb. 1). Hierbei spielen die Makrophagen eine übergeordnete Rolle beim Erkennen, Phagozytieren und Abtöten der eingedrungenen Bakterien. Hervorgerufen wird die Aktivierung durch die Bindung von LPS an Zellmembranen des Immunsystems, von wo aus eine Signaltransduktion in das Zellinnere erfolgt.

Wie in Kapitel 1.2.4 ausgeführt, ist das Serumprotein sLBP an der initialen Phase der Signaltransduktion beteiligt. Jedoch konnte unsere Laborgruppe in den letzten Jahren überzeugende Evidenz für eine transmembrane Konfiguration von LBP (mLBP) erbringen (Gutsmann et al., 2001a). In beiden Formen bringt es LPS an die Zelloberflächenstrukturen, die in die Signaltransduktion eingebunden sind. In dieser Arbeit sollen weitere Belege für das Vorhandensein und die Funktion von mLBP erbracht werden.

LBP besteht aus 456 Aminosäuren mit einer vorangestellten hydrophoben Signalsequenz (Schumann et al., 1990) und wird in den Hepatozyten (Ramadori et al., 1990) und Darmepithelzellen synthetisiert (Vreugdenhil et al., 1999). LBP gehört zu einer lipidbindenden Proteinfamilie, zu der auch BPI (*bactericidal/permeability increasing protein*) zählt. BPI weist eine 44 %-ige Homologie der Aminosäuresequenz zu der des LBP auf (Schumann et al., 1990) und es ist auf der Oberfläche humaner peripherer Blutmonozyten zu finden (Dentener et al., 1996). Beide Proteine besitzen die Fähigkeit, LPS zu binden. LBP vermag dies bei einer Vielzahl von LPS Chemotypen, bei Lipid A und auch ganze Gram-negative Bakterien (Tobias et al., 1989; Tobias et al., 1986). LBP hat bei den Konzentrationen, bei denen BPI antimikrobiell sehr effektiv ist, keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit Gram-negativer Bakterien (Tobias et al., 1988). BPI hat allerdings bei allen Konzentrationen nur einen inhibierenden Effekt auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung mononuklearer Phagozytenzellen (Dentener et al., 1993).

Im Serum kommt das Glykoprotein LBP in Konzentrationen von 5 – 10 µg/ml vor, bis zu 24 h nach der Auslösung einer Akutphaseimmunantwort können sogar Konzentrationen um 200 µg/ml erreicht werden (Tobias et al., 1992). Der Anstieg des LBP Gehalts im Serum wird durch eine Aktivierung des LBP Gens über die Mediatoren Interleukin-1 (IL-1) und IL-6 verursacht (Kirschning et al., 1997). Dem LBP werden je nach Konzentrationsbereich zwei

Aufgaben zuteil (Gutsmann et al., 2001b). Bei niedrigen Konzentrationen verstärkt LBP die LPS induzierte Aktivierung mononuklearer Zellen (MNC) (Heumann et al., 1992; Dentener et al., 1993). Zum anderen vermag das LBP während der Akutphase, also bei höheren Konzentrationen, die LPS-vermittelte Zellstimulation zu verhindern (Heumann et al., 1992; Lamping et al., 1998).

Es wurde vermutet, dass LBP Phospholipide zu LPS-Mizellen und umgekehrt auch LPS zu Phospholipidliposomen transportiert, die in ihrer Zusammensetzung der Zytoplasmamembran von Makrophagen entspricht. Aus diesem Grund wurde das LBP lange Zeit für eine Art Shuttle-Protein gehalten, das dafür sorgt, dass das LPS an die Zellmembran gebracht wird (Schumann et al., 1990; Schromm et al., 1996). Die besonders wichtige Rolle von LBP bei der LPS-induzierten Zellaktivierung wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass Blutzellen von LBP Knock-out Mäusen mindestens 100-fach sensitiver auf LPS reagieren als Kontrollblutzellen (Wurfel et al., 1997). Auch ein LPS Transport durch CD14 konnte in diesen Mäusen nicht beobachtet werden (Jack et al., 1997). Für die Signaltransduktion muss eine Bindung von LBP/LPS Komplexen an das CD14 stattfinden (Wright et al., 1990). Aus diesem Grund wird eine Beteiligung von Mikrodomänen, bestehend aus LBP, CD14 und anderen in das LPS-Signalling involvierten Proteinen, wie z.B. ein Ionenkanal (Blunck et al., 2000), für sehr wahrscheinlich gehalten.

Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die bekannten Eigenschaften des LBP geben.

4.1 Die Rolle des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins LBP

Viele Erkenntnisse sprechen für eine Bindung von LBP an die Zytoplasmamembran. Folgende Beobachtungen sind dafür bei der Charakterisierung der **Interaktion zwischen LBP und Phospholipidmatrizes** von Bedeutung:

- (i) Nachweis der Bindung von LBP an immobilisiertes Phosphatidylserin (PS) (und in geringerem Ausmaß auch an Phosphatidylcholin (PC) durch Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) – Messungen (Gutsmann et al., 2001b).
- (ii) Nachweis der Anlagerung oder Interkalation von LBP an oder in negativ geladene (Abhängigkeit zu der negativen Nettoladung pro Lipidmolekül) und neutrale (PC) Phospholipidliposomen durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer- (FRET-) - Messungen (Gutsmann et al., 2001b). Hierbei ist für die weiteren Untersuchungen

der vorliegenden Arbeit von Bedeutung gewesen, dass die Zytoplasmamembran negativ geladene Lipide enthält, hauptsächlich PS und Cardiolipin, ihre genaue Zusammensetzung jedoch nicht bekannt ist (Kröner et al., 1981; Alvarez et al., 1993).

- (iii) Nachweis der Bedeutung negativer Ladungen (Wiese et al., 1997) für die Bindung und Interkalation des polykationischen BPI in die Zytoplasmamembran (Dentener et al., 1996).

Bei der Interaktion zwischen LBP und Phospholipidmatrizes sprechen folgende Ergebnisse für ein **transmembranes LBP**:

- (i) Nachweis der gerichteten Interkalation von LBP in PS-Bilayer durch elektrophysiologische Messungen an planaren Membranen. Hierbei wird das symmetrische intrinsische Membranpotential durch die Zugabe von LBP asymmetrisch. Es wurde auf beiden Seiten der Membran eine Bindung des polyklonalen α LBP-Antikörpers festgestellt (Gutsmann et al., 2001a).
- (ii) Nachweis der Bindung und gerichteten Interkalation von LBP in LPS-Aggregate und in planare LPS/PL-Bilayer durch elektrophysiologische Messungen an planaren Membranen (Gutsmann et al., 2001a).

Auch bei Untersuchungen bezüglich des **LBP-vermittelten Einbaus von LPS** in die Membran mononukleärer Zellen gibt es Gründe zur Annahme der Anwesenheit von LBP in diesen Membranen:

Für die Erklärung der biologischen Funktion von LBP ist die Charakterisierung der Interaktion dieses Proteins mit LPS von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass eine durch Endotoxin-induzierte Stimulation innerhalb weniger Minuten zu einer Reaktion auf der mRNA Ebene führt (Takayama et al., 1994). Aus diesem Grund muss angenommen werden, dass der LBP-vermittelte Einbau von LPS in eine Matrix von Bedeutung ist und nicht die unspezifische Interaktion zwischen Lipid A- und Phospholipidaggregaten, die im Bereich von Stunden stattfindet. Es können mehr als zehn LPS-Moleküle an ein LBP-Molekül binden, das an eine PS-Matrix gekoppelt ist. Es wird vermutet, dass das LBP Molekül einzelne LPS-Moleküle bis hin zu einem LPS-Aggregat an die Zielzellmembran bindet oder dass das LBP LPS-Moleküle in diese Membran einbaut (Gutsmann et al., 2001b).

Der LBP-vermittelte Einbau von LPS in Phospholipidmatrizes ist abhängig von deren Lipidzusammensetzung, was sowohl durch die unterschiedliche Geometrie der Lipidkopfgruppen oder auch einer unterschiedlichen Fluidität ihrer Acylketten beeinflusst werden kann. Aus der exponentiell ansteigenden Temperaturabhängigkeit des LBP-vermittelten LPS Einbaus ist ein Einfluss der Fluidität von LPS oder auch der Lipidmatrix zu entnehmen (Gutsmann et al., 2001b).

Es findet kein LBP-vermittelter Einbau von ungeladenen Endotoxinen in Lipidmatrizes statt. Diese Endotoxine besitzen auch keine agonistische oder antagonistische Aktivität. Der Einbau muss also eine Voraussetzung für die biologische Aktivität der Endotoxine sein (Schromm et al., 2000). Versuche an planaren Membranen lassen vermuten, dass die Interaktion zwischen LBP und LPS eine Änderung der Konformation des LBP oder der Orientierung in der Membran verursacht (Gutsmann et al., 2001a).

In unserer Arbeitsgruppe wird angenommen, dass die Interaktion von LPS mit membranständigem LBP (mLBP) eine äußerst wichtige Rolle bei der Aktivierung von MNC durch LPS spielt. Dieses mLBP-Konzept wäre dazu in der Lage, zu erklären, wieso LPS unter serumfreien Bedingungen und in Abwesenheit von CD14 an MNC bindet (Heumann et al., 1992). Für die anschließende Signaltransduktion wurde gezeigt, dass die Bindung von LPS/LBP Komplexen an CD14 ein notwendiger Schritt ist (Wright et al., 1990). Aus diesen Gründen wird eine Mikrodomänenbildung, bestehend aus LBP, CD14 und anderen in das LPS-Signalling involvierten Proteinen (z.B. Ionenkanäle oder Toll-like Rezeptoren) für sehr wahrscheinlich gehalten.

Neben der LBP-vermittelten Aktivierung von MNC konnte außerdem gezeigt werden, dass LBP unter bestimmten Bedingungen LPS auch neutralisieren kann. Messergebnisse bezüglich einer solchen **Neutralisierung von LPS durch LBP** bieten weiteren Anlass zur Annahme, dass LBP als in die Membran eingebautes Protein vorliegen muss:

Messungen an FRET-, SPR- (Gutsmann et al., 2001b) und planaren Membranen (Gutsmann et al., 2001a) haben gezeigt, dass LPS/LBP Komplexe weder an PS-Membranen binden noch interkalieren, auch dann nicht, wenn bereits weiteres LBP in die PS-Matrix interkaliert ist. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass: (i) LBP die Bindung von LPS-Aggregaten an LBP verhindert, welches bereits in eine Membran eingebaut wurde, (ii) LBP die Bindung von LPS an eine Membran verhindert und (iii) sich die Bindung von LPS an LBP von einer Bindung von LBP an Phospholipide unterscheidet. Durch die Komplexbildung von LPS mit LBP, das nicht in eine Membran eingebaut ist, kommt es zu einer LPS Neutralisierung und

somit einer Hemmung der MNC Aktivierung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Bindung des LPS/LBP-Komplexes an andere Proteine, z.B. CD14 kommt. Da durch die Zugabe von LPS/LBP-Komplexen zu MNC keine TNF α Produktion erfolgt, muss jedoch von einer neutralisierenden Wirkung des LBP ausgegangen werden.

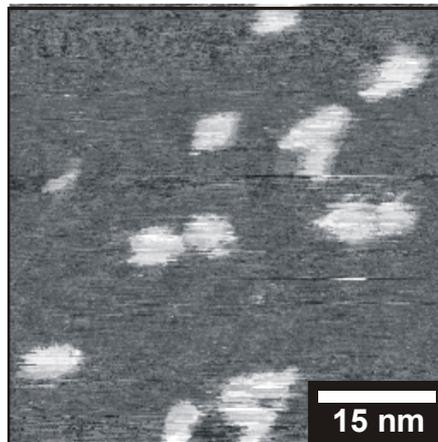


Abb. 31: AFM Höhenbildaufnahme einzelner LBP-Moleküle auf Mica (Nanoscope III, DC Mode, AUNM-MSCT E, 2 nm Grauwertebereich). Die Moleküle sind ungefähr 10 nm lang und 2-3 nm hoch.

In dem nachfolgenden Teil der Arbeit soll untersucht werden, wie sich das LBP in einer Membran anordnet. Dabei war es besonders wichtig zu erfahren, wie die topographische Verteilung des Proteins aussieht, z.B. ob es sich in Domänen organisiert und ob es eine transmembrane Stellung einnimmt. Hierzu soll auch die Wechselwirkung des LBP mit Lipid A näher charakterisiert werden. Zunächst wird versucht, diese Fragestellungen anhand von Lipidmonolayern, im Anschluss daran auch anhand von Bilayern mittels Kraftspektroskopie, Polarisationsmessungen und CD-Spektroskopie zu beantworten. Dabei wird sich das mLBP-Modell als zutreffend erweisen.

4.2 Lipopolysaccharid-bindendes Protein

In der vorliegenden Arbeit wurde das rekombinant hergestellte humane Protein LBP (MW = 53349 Da) verwendet (Abb. 32). Dabei handelt es sich um ein Holoprotein mit 456 Aminosäuren, das von der Firma Xoma Corp. (Berkely, CA, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Das Protein wurde in Aliquots einer Stammlösung (1 mg/ml) in einer detergenshaltigen Lösung (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 % F68, 0,002 % TWEEN80, pH 7,5) bei -70°C aufbewahrt.

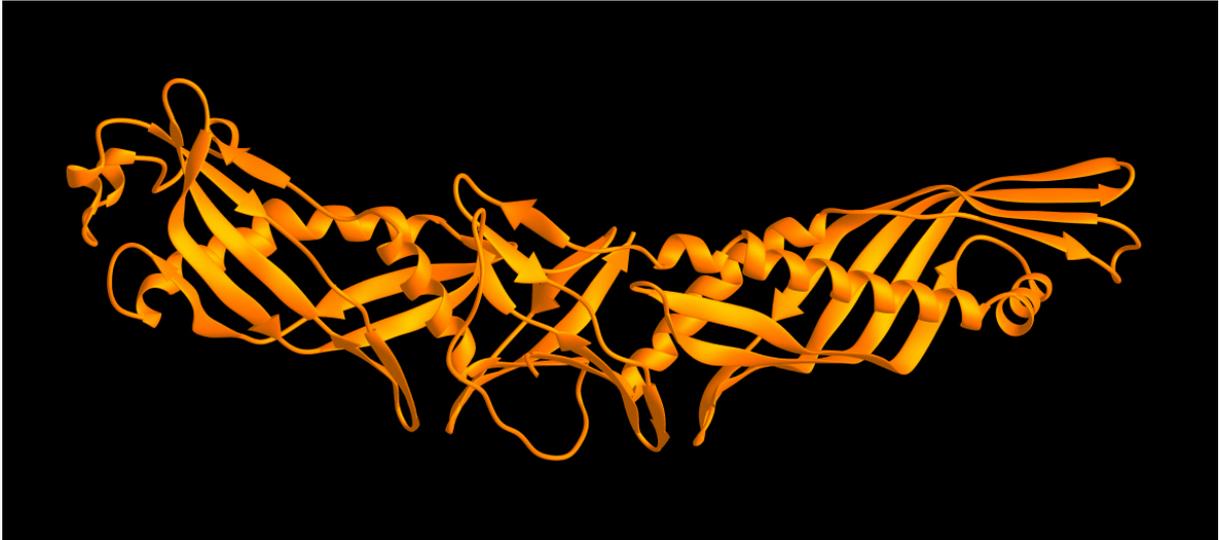


Abb. 32: Dreidimensionale Struktur des LBP (Bänderdarstellung). Die Struktur wurde aus der Homologie zum bactericidal/permeability increasing protein (BPI) berechnet und freundlicherweise von Herrn PD Dr. Joachim Grötzinger (AG Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt.

4.3 Phosphatidylserin

Als Repräsentant für ein Phospholipid mit einer negativen Nettoladung ist das Phosphatidylserin (PS) ausgewählt worden (Abb. 33). Das aus Rinderhirn gewonnene PS (MW = 812,05 Da) wurde von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) geliefert. Eine weitere Aufreinigung wurde nicht vorgenommen. Die Herstellung der PS-Liposomen, die für die Erstellung von PS-Bilayern benötigt werden, die somit eine negativ geladene Phospholipidmatrix darstellen, wird im Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

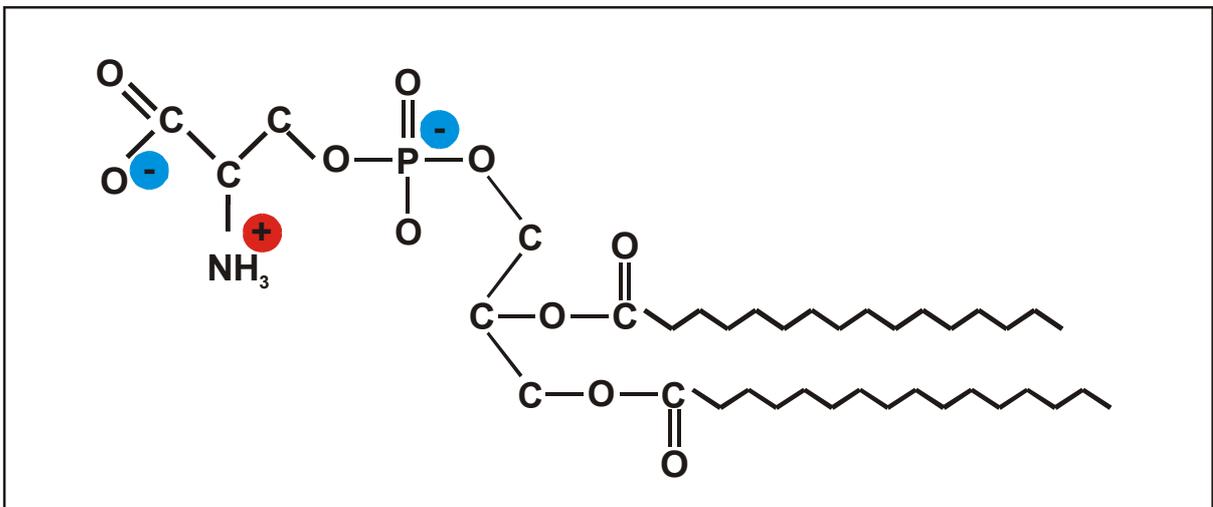


Abb. 33: Chemische Struktur von Phosphatidylserin (PS)

4.4 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

4.4.1 Charakterisierung von PS-Monolayern mit interkaliertem LBP und LPS

Für die nachfolgenden Experimente ist jeweils ein PS-Monolayer als LB Film präpariert worden (Abb. 34 A-C). In einem ersten Ansatz wurde ein reiner PS-Monolayer bei einem lateralen Druck von 15 mN/m auf Mica übertragen. In einem zweiten Ansatz wurde eine Stunde vor dem Übertrag LBP unter den PS-Monolayer gespritzt und im dritten Ansatz zunächst LBP und nach einer weiteren Stunde Wartezeit Aggregate aus Re LPS von *Escherichia coli* Stamm F515 (F515 LPS) in die Subphase appliziert. Bevor die Filme von der Subphase auf das Mica übertragen wurden, ist nach jeder Zugabe 1 h gewartet und ein eventueller Einbau gemessen worden. Die Endkonzentration des LBP betrug jeweils 36 nM, die der F515 LPS-Aggregate 400 nM und die des PS 20 nM.

Der PS-Monolayer (Abb. 34A) allein bildet einen flachen homogenen LB Film ohne Domänen. Die Zugabe des LBP führte zu einer Interkalation in den PS-Monolayer, was durch die Flächenzunahme des Monolayers deutlich wird. Bei der Höhenbildaufnahme des PS/LBP-Films (Abb. 34B) zeigen sich im Gegensatz zu dem reinen PS-Monolayer runde Strukturen, die bis zu ca. 6,5 nm höher als der PS-Monolayer sind (durchschnittliche Höhe $(2 \pm 0,5)$ nm) und einen Durchmesser von bis zu ca. 300 nm (durchschnittl. Durchmesser ca. (100 ± 20) nm) haben. Aufgrund dieser Dimensionen ist anzunehmen, dass das LBP aggregiert und dann entweder als Aggregat in den PS-Monolayer interkaliert oder erst in dem PS-Monolayer aggregiert. Der Einbau einzelner LBP-Moleküle kann nicht ausgeschlossen, jedoch auch nicht durch eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme bestätigt werden. Als Größenvergleich siehe Abb. 31, in der einzelne Moleküle des LBP auf Mica detektiert werden konnten.

Bei der Erstellung des PS/LBP/LPS-Film konnte keine Interkalation des LPS in den PS/LBP-Film festgestellt werden. Das Höhenbild des PS/LBP/LPS-LB Films (Abb. 34C) unterscheidet sich dennoch sehr stark von dem des PS/LBP-Films. Es sind keine großen runden Strukturen mehr zu erkennen, stattdessen zieht sich ein erhöhtes feines, linienartiges Netz durch das Bild, welches durch kleine kreisförmige Strukturen unterbrochen wird. Im Durchschnitt liegen die Linienformen $(0,7 \pm 0,6)$ nm von der Normalhöhe erhöht, es gibt aber auch Erhebungen von bis zu ca. 7 nm. Die Breite der Strukturen schwankt zwischen 60 und 240 nm. Aufgrund des optischen Unterschieds der beiden Aufnahmen (Abb. 34B-C) läßt eine mögliche Erklärung

eine durch das untergespritzte und nicht eingebaute LPS hervorgerufene Änderung der lateralen Organisation des LBP vermuten. Ob auch eine Änderung der Sekundärstruktur des LBP bei der Interaktion mit LPS eine Rolle spielt, soll später mit Hilfe der CD Spektroskopie untersucht werden (Kapitel 4.6.1).

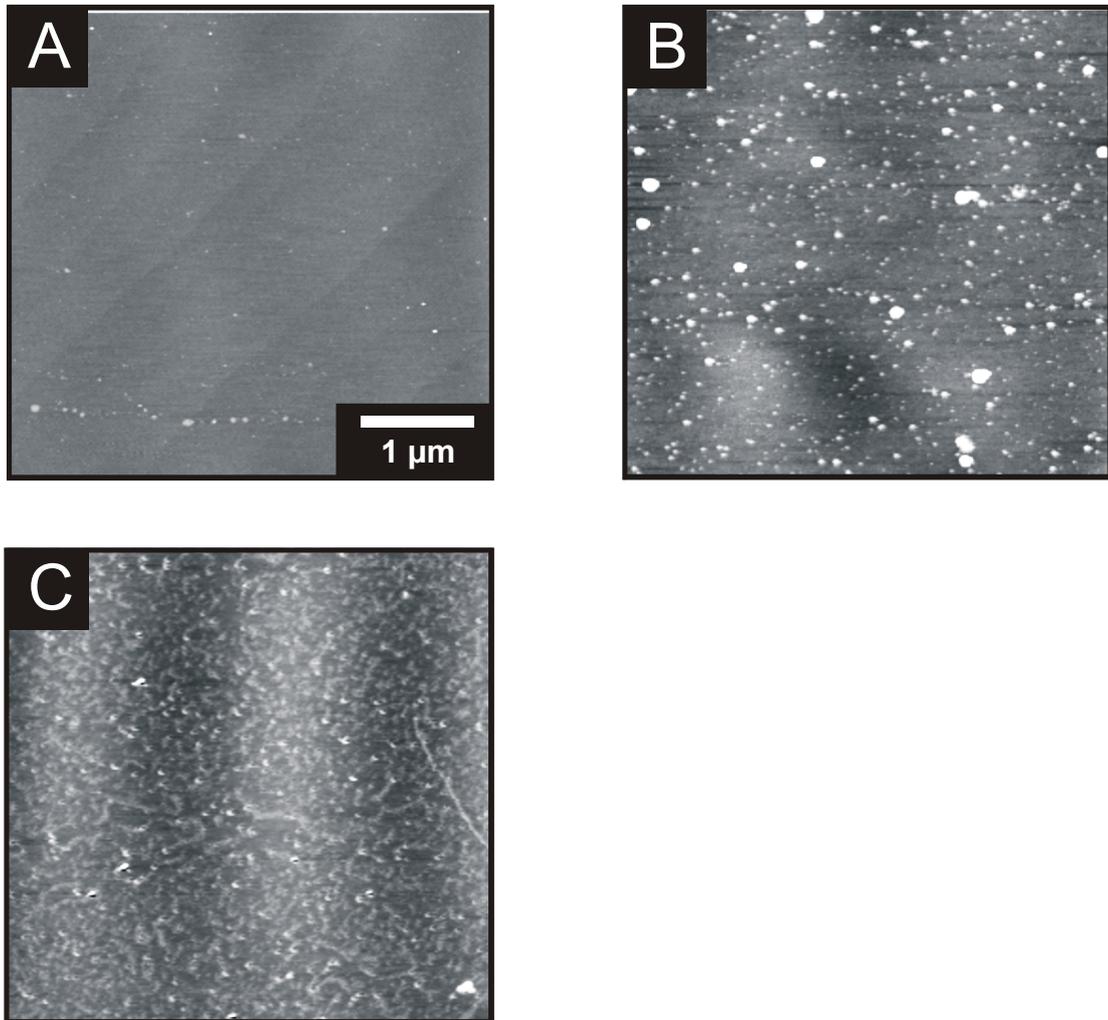


Abb. 34: AFM Höhenbilder (AC160TS, AC Mode, Nanoscope III) von verschiedenen bei $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ präparierten LB Filmen (10 nm Grauwertebereich). (A) PS-Monolayer, (B) PS-Monolayer mit interkaliertem LBP und (C) PS-Monolayer mit interkaliertem LBP und angelagertem F515 LPS.

Entsprechend den Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen LPS-Monolayern und antimikrobiellen Peptiden könnte es unter den vorliegenden Versuchsbedingungen sein, dass sich das LBP an das in der Subphase hängende Micaplättchen anlagert. Zu Klärung dieser Frage wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem LBP in Abwesenheit eines Lipidmonolayers in den Langmuir Trog gegeben wurde, um zu überprüfen, ob es sich an die

Micaoberfläche haftet (siehe auch Kapitel 3.4.1). Auf den erhaltenen AFM Höhenbilder konnte man erkennen, dass es sich nicht mehr um reines Mica handelt, sondern dass die vormals glatte Fläche mit größeren Strukturen überzogen ist. Diese Strukturen unterscheiden sich jedoch von denen in Abb. 34B. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass die PS/LBP- und PS/LBP/LPS-LB Filme durch bereits angelagertes LBP verfälscht dargestellt werden. Andererseits liegen auch keine Informationen darüber vor, inwieweit der PS-Layer die Anlagerung des LBP an Mica beeinflussen oder sogar unterbinden kann.

4.4.2 Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen PS-Liposomen, LBP und Lipid A-Aggregaten

Da man nicht per se davon ausgehen kann, dass eine eventuell andere Orientierung des LBP in einem Monolayer dieselbe Wechselwirkung mit LPS ermöglicht wie in einem Bilayer, wurden im Wesentlichen Versuche mit PS-Liposomen durchgeführt. Diese sind, wie im Material und Methoden Teil dieser Arbeit beschrieben, hergestellt worden. Sobald diese auf ein hydrophiles Substrat gegeben werden, beginnen sie zu adhären und fusionieren. Auf diese Weise bildet sich ein Bilayer aus, der im Falle des PS ca. 5 nm hoch ist und sich durch ein stärkeres Aufdrücken mit dem Cantilever wegkratzen lässt (Abb. 35).

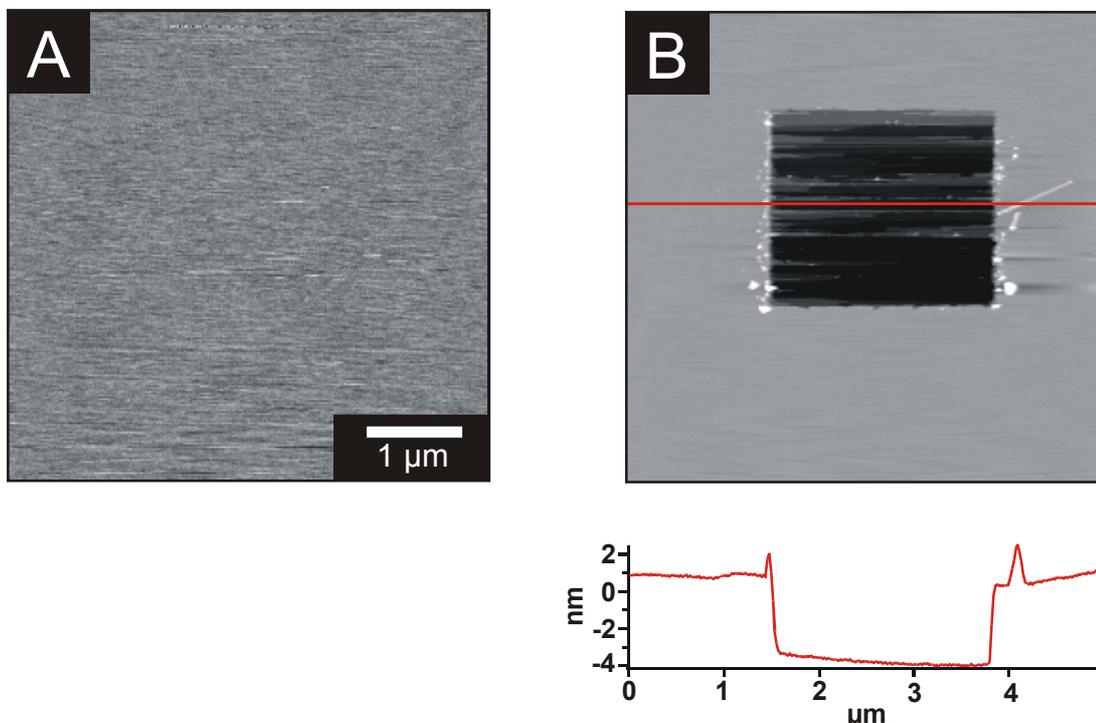


Abb. 35: AFM Höhenbilder (AC Mode, MSCT-AUNM E) eines PS-Bilayers auf Mica. Hierbei handelt es sich um einen Bilayer, der durch die Fusion von PS-Liposomen entstanden ist. (A) PS-Bilayer (Grauwertebereich 2 nm), (B) Überprüfung der Höhe der fusionierten Liposomen durch Kratzen: Die Bilayeroberfläche ist ca. 5 nm höher als die des Micas.

Hinsichtlich der Frage der Domänenbildung einer Lipidmatrix in Anwesenheit bzw. durch Einbau von LBP und Lipid A soll nun sukzessive geklärt werden, wie sich der reine PS-Bilayer durch die Zugabe von LBP und schließlich auch von Lipid A verändert.

LBP Einbau in PS-Liposomen

Für ein Verständnis des Einbaus von LBP in die Membran von MNC wurde zunächst im Rekonstitutionssystem untersucht, wie LBP mit PS-Liposomen interagiert. Als erstes wurde geprüft, welchen Einfluss die Präparationsmethode auf die Interaktion zwischen LBP und PS-Liposomen hat. Zu diesem Zweck sind zum einen 2000 μl einer 100 μM PS-Liposomenlösung mit 2 nM LBP für 15 min bei 37°C vorinkubiert worden. Anschließend ist die Lösung in den Petrischalendeckel auf ein Micaplättchen gegeben und über Nacht bei 4°C gelagert worden. Am nächsten Tag wurde der Film unter dem AFM abgescannt (Abb. 36A). Zum anderen wurde ein PS-Bilayer hergestellt, zu dem erst nachträglich 2 nM LBP hinzugegeben wurde. Hierfür wurde der Film für eine Viertelstunde bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gestellt. Auch von diesem Film wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen gemacht (Abb. 36B). Beide Aufnahmen zeigen einen relativ glatten Untergrund mit Bereichen von jeweils unterschiedlicher Höhe. Der vorinkubierte PS/LBP-Lipidfilm weist rundliche, ca. 10 nm hohe und im Durchmesser bis zu 200 nm breite Erhöhungen auf. Die nachträgliche Zugabe von LBP zum PS-Bilayer führt zu kleineren Erhebungen von 2-3 nm Höhe, die ca. 22 nm lang und 15 nm breit sind. Wahrscheinlich verhindert die durch die Festkörperunterstützung verminderte laterale Diffusion (Nollert et al., 1995; Schütz et al., 1997) der PS-Lipide einen Einbau des nachträglich zugebenen LBP. Aus diesem Grund ist bei den nachfolgenden Versuchen die Inkubationsmethode zur Herstellung von Lipidfilmen verwendet worden.

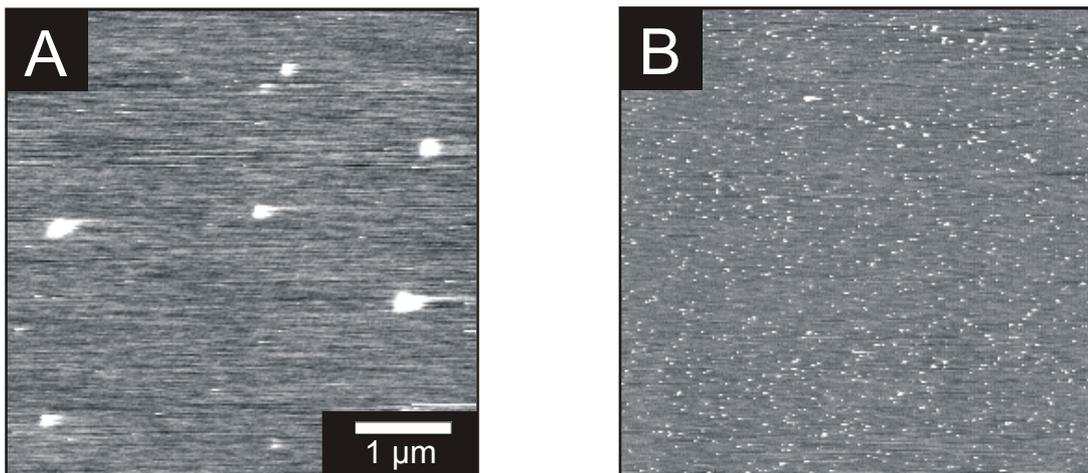


Abb. 36: AFM Höhenbilder (AC Mode, MSCT-AUNM E) von (A) fusionierten PS/LBP-Liposomen (Grauwertebereich 1nm) und (B) fusionierten PS-Liposomen und anschließend zugegebenem LBP auf Mica (Grauwertebereich 2 nm). Bei beiden Versuchen wurden 100 μM PS-Liposomen und 2 nM LBP verwendet.

In vorangegangenen FRET-Messungen der Arbeitsgruppe konnte erst bei einer LBP Konzentration von 200 nM eine Anlagerung oder ein Einbau von LBP in PS-Liposomen (10 μ M) beobachtet werden, also ab einem molaren Verhältnis von LBP:PS von 1:100. Es wurden für konzentrationsabhängige rasterkraftmikroskopische Versuche vorinkubierte PS/LBP-Liposomen in Verhältnissen von LBP:PS von 1:50000, 1:5000, 1:500, 1:100 und 2:100 (2 nM, 20 nM, 200 nM, 1 μ M und 2 μ M LBP) angesetzt und zur Fusion nach der beschriebenen Methode auf ein Micaplättchen gegeben. Die entsprechenden AFM Höhenbilder sind in Abb. 37 zu sehen. Mit Hilfe der MFP-3D Auswertesoftware wurde dann die Rauigkeit dieser Bilder bestimmt (Abb. 37F). Der Graph zeigt eine Zunahme der Rauigkeit bei ansteigender LBP Konzentration. Aufgrund des Erscheinungsbilds der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen läßt sich vermuten, dass eine Aggregation oder Umschichtung der LBP-Moleküle stattfindet. Die FRET-Messungen lagen also in einem sehr hohen LBP Konzentrationsbereich.

Nachweis von LBP in PS-Membranen mit Hilfe eines Antikörpers

Zur Überprüfung der Frage, ob in den aus PS/LBP-Liposomen hergestellten Lipidlayern neben den klar erkennbaren Strukturen in Abb. 37A LBP auch in vereinzelter Form enthalten ist, wurde ein monoklonaler α LBP-Antikörper (biG33) kovalent an einen Cantilever (MSCT-AUNM E_{biG33}) gebunden und damit ein PS/LBP-Lipidfilm abgetastet (schematische Darstellung in Abb. 38). In Abb. 39A ist eine Höhenbildaufnahme eines PS/LBP-Films mit einer sehr niedrigen LBP Konzentration zu sehen (100 μ M PS, 0,02 nM LBP), die mit einem unbehandelten Cantilever (MSCT-AUNM E) erstellt wurde. Man erkennt keine Unregelmäßigkeiten, es handelt sich um einen homogen flachen Film. Rastert man den selben Film mit dem MSCT-AUNM E_{biG33} Cantilever ab, so erhält man ein Kraftbild, das einen örtlichen Aufschluß über die Wechselwirkung zwischen dem Antikörper an der Spitze des Cantilevers und der Probe gibt (Abb. 39B). In den hell dargestellten Bildbereichen kommt es zu einem Zurückziehen des Cantilevers in z-Richtung durch die Rückkopplungsschleife des Controllers, die versucht, die auf den Cantilever wirkende Kraft immer möglichst konstant zu halten. Offensichtlich kommt es an diesen Punkten zu einer erhöhten Anziehung zwischen dem Antikörper und dem PS/LBP-Film.

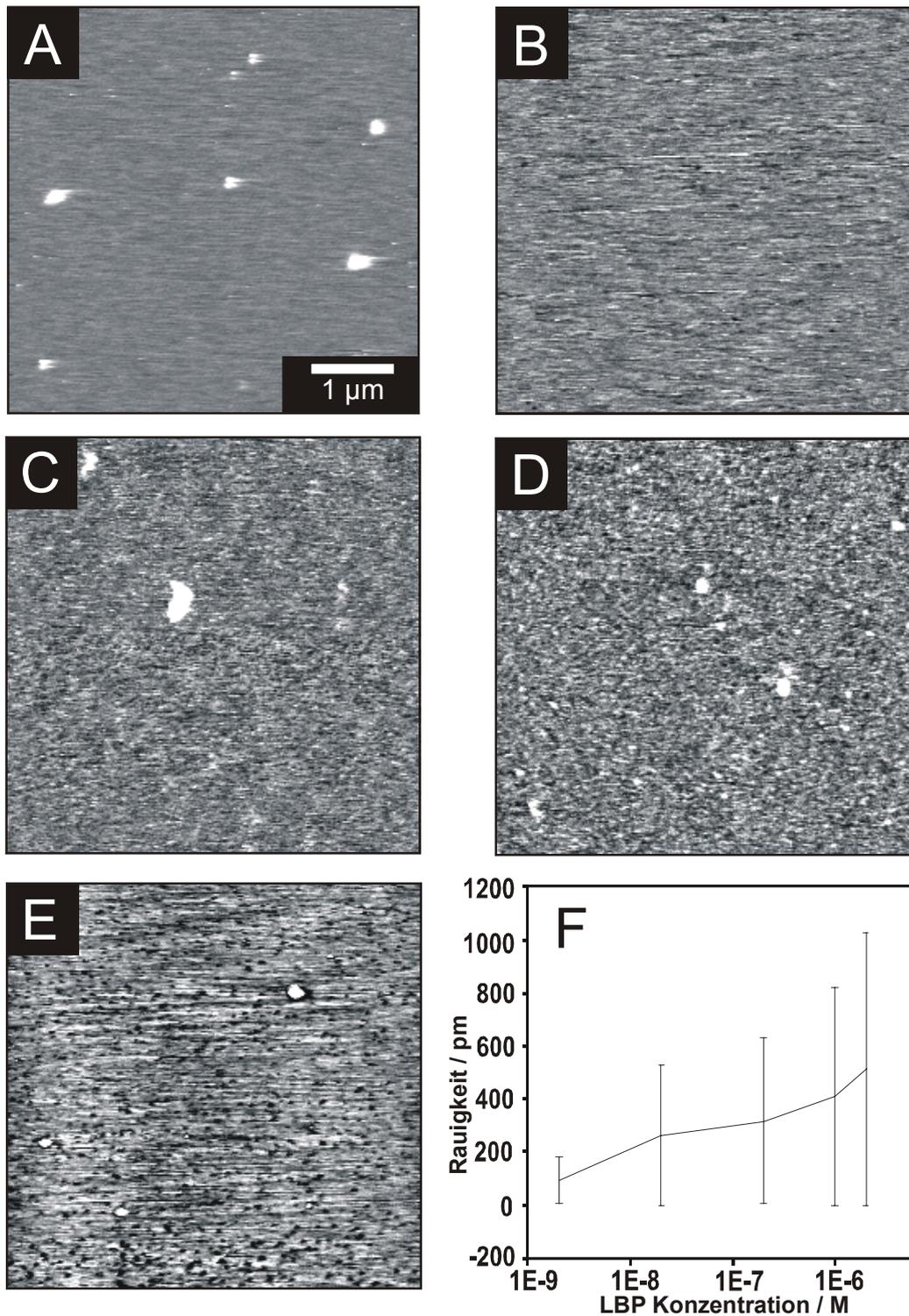


Abb. 37: AFM Höhenbilder von auf Mica fusionierten PS/LBP-Liposomen bei verschiedenen LBP Konzentrationen. (A) 2 nM, (B) 20 nM, (C) 200 nM, (D) 1 μM und (E) 2 μM LBP (Grauwertebereich jeweils 2 nm). Je mehr LBP verwendet wird, desto rauer wird die Oberfläche (F).

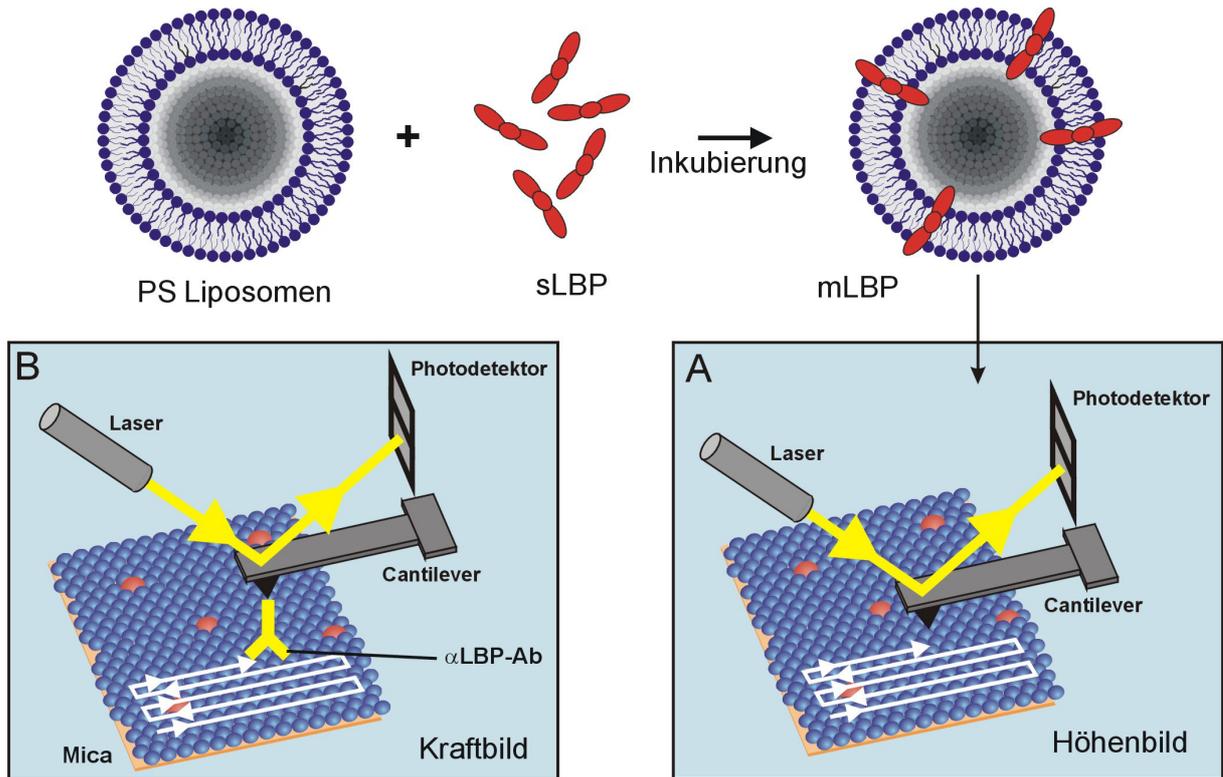


Abb. 38: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für die rasterkraftmikroskopische Untersuchung von auf Mica fusionierten Liposomen. Oben: Durch die Inkubation von PS-Liposomen mit LBP (sLBP) kommt es zu einem Einbau (mLBP). Unten: (A) Höhenbild der fusionierten PS/LBP-Liposomen und (B) Kraftbild desselben Bilayers mit einem kovalent an den Cantilever gebundenen α LBP-Antikörper.

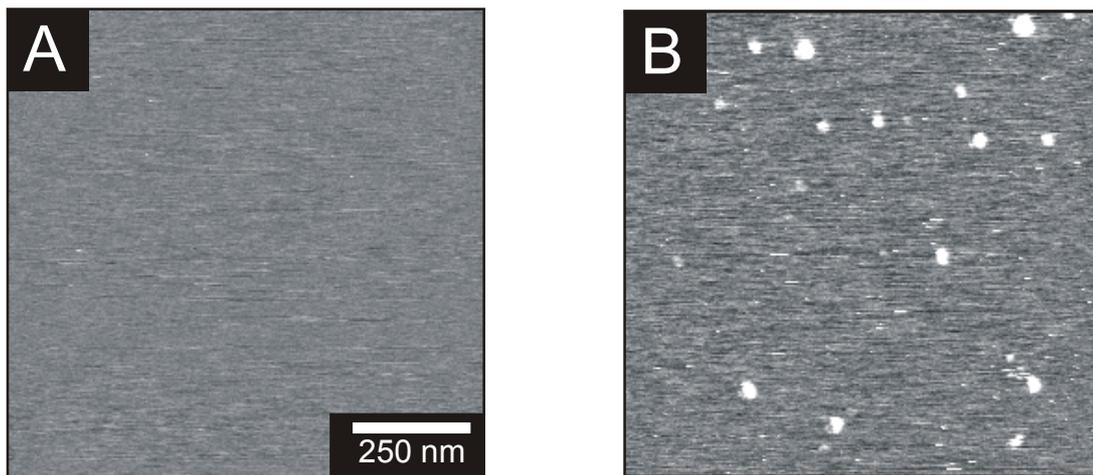


Abb. 39: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen desselben PS/LBP-Lipidfilms auf Mica (100 μ M PS-Liposomen, 0,02 nM LBP). (A) Höhenbild (AC Mode, MSCT-AUNM E, Grauwertebereich 2 nm), (B) Kraftbild mit kovalent an den Cantilever gebundenen α LBP-Antikörpern (AC Mode, MSCT-AUNM E_{biG33}).

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte von unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Lipid resultieren, wurde ein Kraftbild eines PS-Bilayers mit einem MSCT-AUNM E_{biG33} erstellt und auf ihm an 12 verschiedenen Stellen Kraft-Abstandskurven aufgenommen (Abb. 40A). Es wurden ebenfalls Kraftbilder und Kraft-Abstandskurven von PS/LBP-Filmen mit unterschiedlichen LBP Konzentrationen (100 μ M PS, 2 bzw. 0,02 nM LBP) erstellt (Abb. 40B-C).

Es konnte keine spezifischen Wechselwirkung zwischen dem reinen PS-Film und dem biG33 festgestellt werden (Abb. 40A). Das Kraftbild zeigt keine Bereiche mit unterschiedlich starker Anziehung. Auch die Kraft-Abstandskurve weist nur eine unspezifische adhäsive Bindung in der Nähe der Membran auf.

Betrachtet man das Kraftbild des PS/LBP-Films mit einer LBP Konzentration von 2 nM, so fällt eine im Vergleich zum PS-Film geringfügig höhere Unebenheit auf (Abb. 40B). Im Ganzen erscheint jedoch auch dieser Film sehr homogen und eben. Die zugehörigen Kraft-Abstandskurven zeigen allerdings an beliebigen Stellen der Membranoberfläche eine Wechselwirkung zwischen der Probe und dem Antikörper. Die LBP-spezifischen Bindungen reichen bis zu einem Abstand von ca. 60 nm von der Bilayeroberfläche. Wie die Kraft-Abstandskurven zeigen, handelt es sich dabei in der Regel um Mehrfachbindungen. Die gemessenen Bindungskräfte betragen bei einer Zuggeschwindigkeit von 0,77 μ m/s im Durchschnitt (118 ± 4) pN und können maximal 357 pN erreichen (Abb. 41). Man kann also annehmen, dass schon bei einer LBP-Konzentration von 2 nM auf 100 μ M PS-Liposomen eine relativ gleichmäßige Bedeckung der Lipidmembran mit LBP gegeben ist. Entsprechend kann man von einer hohen Belegungsdichte in allen in Abb. 40 gezeigten Bildern ausgehen, was die Bildung von kleineren LBP-Domänen sehr wahrscheinlich macht.

Das Kraftbild eines PS/LBP-Films mit einer LBP Konzentration von 0,02 nM ist bereits aus Abb. 39B bekannt. Führt man auf einem solchen Film Kraft-Abstandskurven mit einem MSCT-AUNM_{biG33}-Cantilever durch, so kommt es allein an den Punkten zu einer Wechselwirkung zwischen dem α LBP-Antikörper und der Probe, an denen auch eine Veränderung des Kraftbildes zwischen ihnen gemessen wurde (Abb. 40C (rote Kurve)). Auf Punkten des restlichen Bildbereichs verlaufen die Kraft-Abstandskurven wie auf einem reinen PS-Film (blaue Kurve). Da es sich bei dem biG33 um einen monoklonalen Antikörper gegen LBP handelt, muss es sich bei den im Kraftbild hell dargestellten Punkten um eine spezifische Erkennung von in die Membran eingebauten LBP-Molekülen handeln. Ob es sich hierbei um Einzelmoleküle oder Aggregate handelt, bleibt jedoch ungeklärt. Die in den Kraft-

Abstandskurven detektierten Mehrfachbindungen legen allerdings die Beteiligung mehrerer Moleküle nahe.

An den hier durchgeführten Antigen/Antikörper-Bindungsmessungen sind drei Bindungen beteiligt: (i) die kovalenten Bindungen in den Molekülen und zwischen dem Antikörper und der Cantileverspitze, (ii) die Bindung zwischen LBP und dem α LBP-Antikörper und (iii) die Bindung des LBP in der Membran. Da kovalente Bindungen erst bei Kräften von einigen nN aufbrechen (Grandbois et al., 1999), können diese nicht zu den Kraftkurven beitragen. Sollte die Bindung des LBP in der Membran bei geringeren Kräften aufbrechen als zwischen LBP und dem α LBP-Antikörper, dann müsste man die spezifische Bindung an allen Positionen auf der Membran detektieren. Dies ist allerdings nicht der Fall. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die gemessene Bindungskraft die Bindung zwischen LBP und α LBP-Antikörper widerspiegelt. Aus diesem Grund wird angenommen, dass der Antikörper an das LBP bindet und einen Teil des LBP aus dem PS-Lipidfilm herauszieht. Bei einem bestimmten Abstand ist die Bindungskraft zwischen LBP und Lipidfilm stärker als zwischen LBP und Antikörper und das LBP Molekül schnappt zurück. Da die gemessenen Bindungen deutlich länger als die Abmessungen des LBP und des Antikörpers sind, ist zu vermuten dass es entweder zu einer Auffaltung der Proteine und/oder einer transienten und lokalen Ausstülpung der Membran kommt.

Zur Auswertung von Kraft-Abstandskurven wird häufig das WLC (*worm-like chain*) Modell herangezogen. Es geht jedoch von sehr starr befestigten Proteinen und einem unbehandelten Cantilever aus. Es ist v.a. für Experimente geeignet, bei denen z.B. DNS, Titin oder ein anderes Protein direkt auf einem glatten Untergrund befestigt und dann mit einem Cantilever daran gezogen wird (Marszalek et al., 1999; Mueller et al., 1999). Eine einfache Anwendung dieses Modells ist also hier nicht möglich.

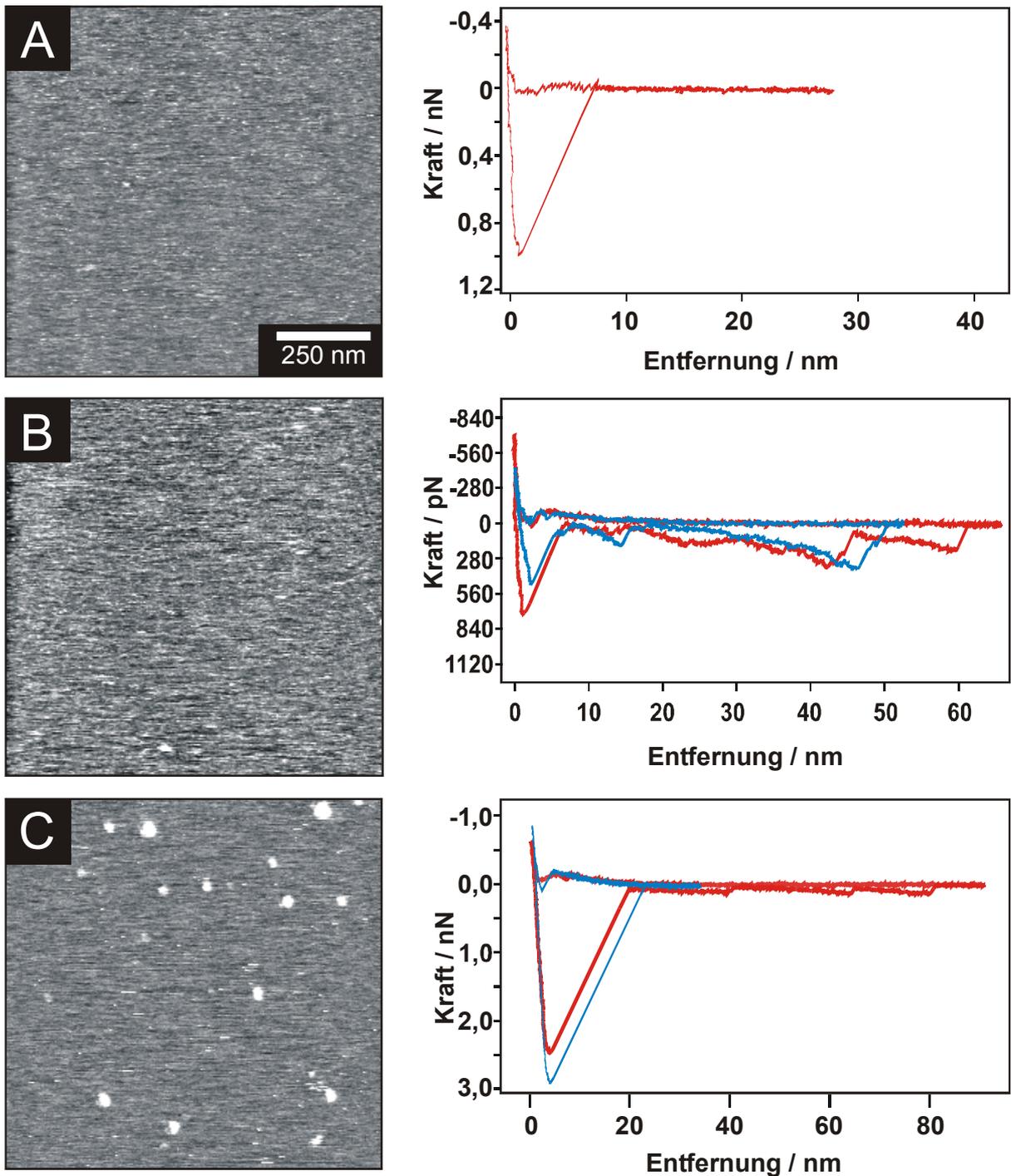


Abb. 40: AFM Kraftbilder (AC Mode, MSCT-AUNM E_{biG33} , Grauwertebereich 2 nm) von verschiedenen Lipidfilmen und jeweils rechts daneben die entsprechenden Kraftkurven. (A) Fusionierte PS-Liposomen (100 μ M), (B) fusionierte PS/LBP-Liposomen (100 μ M PS, 2 nM LBP) und (C) fusionierte PS/LBP-Liposomen (100 μ M PS, 0,02 nM LBP) auf Mica. Zwischen dem MSCT-AUNM E_{biG33} -Cantilever und dem reinen PS-Film kommt es zu keiner spezifischen Wechselwirkung (A, rechts). (B, rechts) zeigt zwei charakteristische Wechselwirkungskurven an beliebiger Position und in (C, rechts) kommt es nur auf den in den Kraftbildern hell erscheinenden Punkten zu einer Interaktion (rote Kurve), der Rest des Films wechselwirkt nicht spezifisch mit dem Antikörper am Cantilever (blaue Kurve).

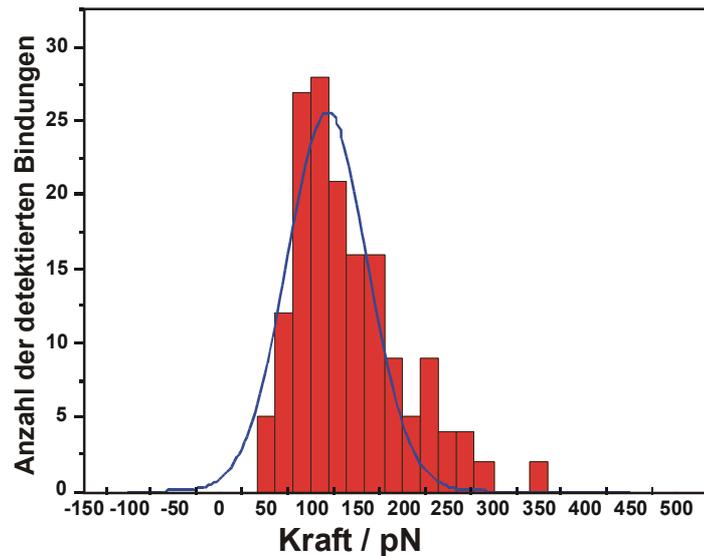


Abb. 41: Histogramm der detektierten spezifischen Bindungskräfte zwischen einer PS/LBP-Membran (2 nM LBP) und kovalent an den Cantilever gebundene α LBP-Antikörper. Die Bindungskräfte betragen bei einer Zuggeschwindigkeit von 0,77 $\mu\text{m/s}$ im Mittel (118 ± 4) pN und erreichen einen Maximalwert von 357 pN.

Schichtdicken von Membranen lassen sich ebenfalls mit Hilfe von Kraftkurven bestimmen (Franz et al., 2002). Um zu untersuchen, ob LBP einen Einfluss auf die Dicke der Membran hat, wurden mit einem relativ harten Cantilever (AC240TS) Kraft-Abstandskurven auf einem Film mit einer LBP Konzentration von 2 nM aufgenommen (Abb. 42). Zunächst erkennt man über einen Bereich von ca. 30 nm eine leichte Zunahme der Kraft, die benötigt wird, um durch diesen Abschnitt durchzudrücken. Dann verläuft die Kurve steiler, d.h. man braucht mehr Kraft zum Durchdrücken der letzten Schicht, die ca. 5 nm dick ist. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um den ersten, besonders stabilen Lipid/Proteinbilayer, vor den sich weitere sechs bis sieben Doppelschichten angelagert haben. Offensichtlich führt die Zugabe von LBP zu PS-Liposomen zu der Ausbildung von Mehrfachschichten. Ob dies in Lösung oder bei der Fusion auf das Mica geschieht, läßt sich aus diesen Messungen nicht klären. Da aber elektronenmikroskopische Aufnahmen eine LBP-induzierte Aggregation von PS-Liposomen in Lösung gezeigt haben, ist erstere Annahme wahrscheinlich zutreffend. Zum weiteren Verständnis dieses Aggregierungsprozesses sei darauf hingewiesen, dass LBP an den äußeren Enden mehrere positive Ladungen trägt und die PS-Liposomen negativ geladene Oberflächen haben. Auch zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} führen zu einer konzentrationsabhängigen Aggregation von PS-Liposomen.

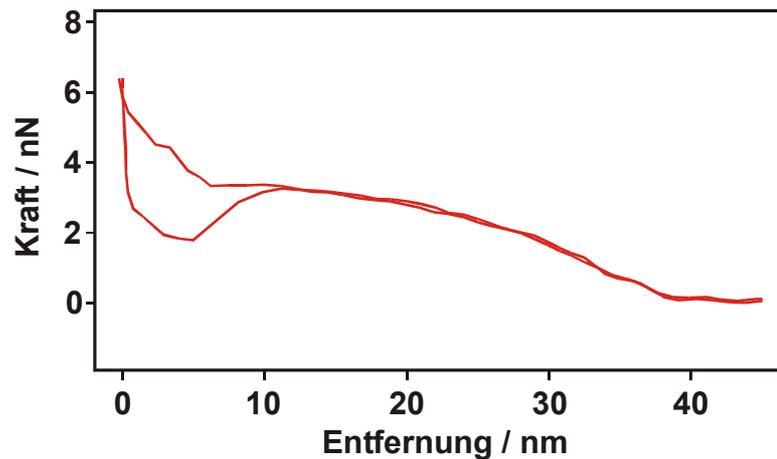


Abb. 42: Die Zugabe von LBP zu PS-Liposomen verursacht eine Bildung von Mehrschichten. Kraft-Abstandskurve (AC240TS) auf einem PS/LBP-Lipidfilm (100 μM PS, 2 nM LBP). Zunächst drückt der Cantilever durch eine ca. 30 nm dicke Schicht hindurch und trifft dann auf eine letzte, ca. 5 nm dicke Schicht.

LBP-vermittelter Einbau von Lipid A in PS-Membranen

Um die biologische Fragestellung nach der Interaktion zwischen Lipid A und dem LBP in der Zielzellmembran zu untersuchen, wurde Lipid A zu PS/LBP-Liposomen hinzugegeben. Hierzu wurden die PS/LBP-Liposomen eine weitere Viertelstunde mit 50 bzw. 100 μM Lipid A-Aggregaten vorinkubiert. Anschließend wurden sie wie bereits beschrieben zur Fusion auf das Micaplättchen gegeben und über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C aufbewahrt.

Die Zugabe von Lipid A zu den PS/LBP-Liposomen hat zur Folge, dass auf den AFM Höhenbildern großflächige Strukturen unterschiedlicher Natur zu sehen sind (Abb. 43A-B).

Zum einen sind dies große halbkugelartige Gebilde, die bis zu 16 nm hoch sind und einen Durchmesser von bis zu 20 μm besitzen. Zum anderen sieht man flachere Strukturen, die sich von dem Untergrund um ca. 1,5 nm (zu niedrig für eine Monoschicht) erheben. Hierbei muß erwähnt werden, dass es sich nicht um ein einfaches Aufsetzen kugelförmiger Aggregate handeln kann, da die Höhen an den Rändern zu klein für einen Bilayer sind. Desweiteren kommt es durch längeres Abtasten mit einer Cantileverspitze zu einer Veränderung der runden Domänen zu den Fusionsstrukturen. Die Bildung solcher Strukturen lässt sich sowohl für 50 als auch für 100 μM Lipid A durch die vorherige Zugabe des αLBP -Antikörpers unterbinden. Hierfür sind in den dargestellten Versuchen (Abb. 43C-D) zu den PS/LBP-Liposomen 100 ng/ml αLBP -Antikörper hinzugegeben worden, für eine Viertelstunde bei 37°C vorinkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, mit den Lipid A-Aggregaten

versetzt worden. Die Höhenbildaufnahmen zeigen, dass hierdurch die Bildung der großen runden oder flachen Strukturen verhindert wird. Eine Vorinkubation von PS-Liposomen und Lipid A-Aggregaten in Abwesenheit von LBP führt ebenfalls nicht zur Ausbildung der Domänen. Man kann folglich davon ausgehen, dass LBP die Fusion von PS-Liposomen und Lipid A-Aggregaten induziert.

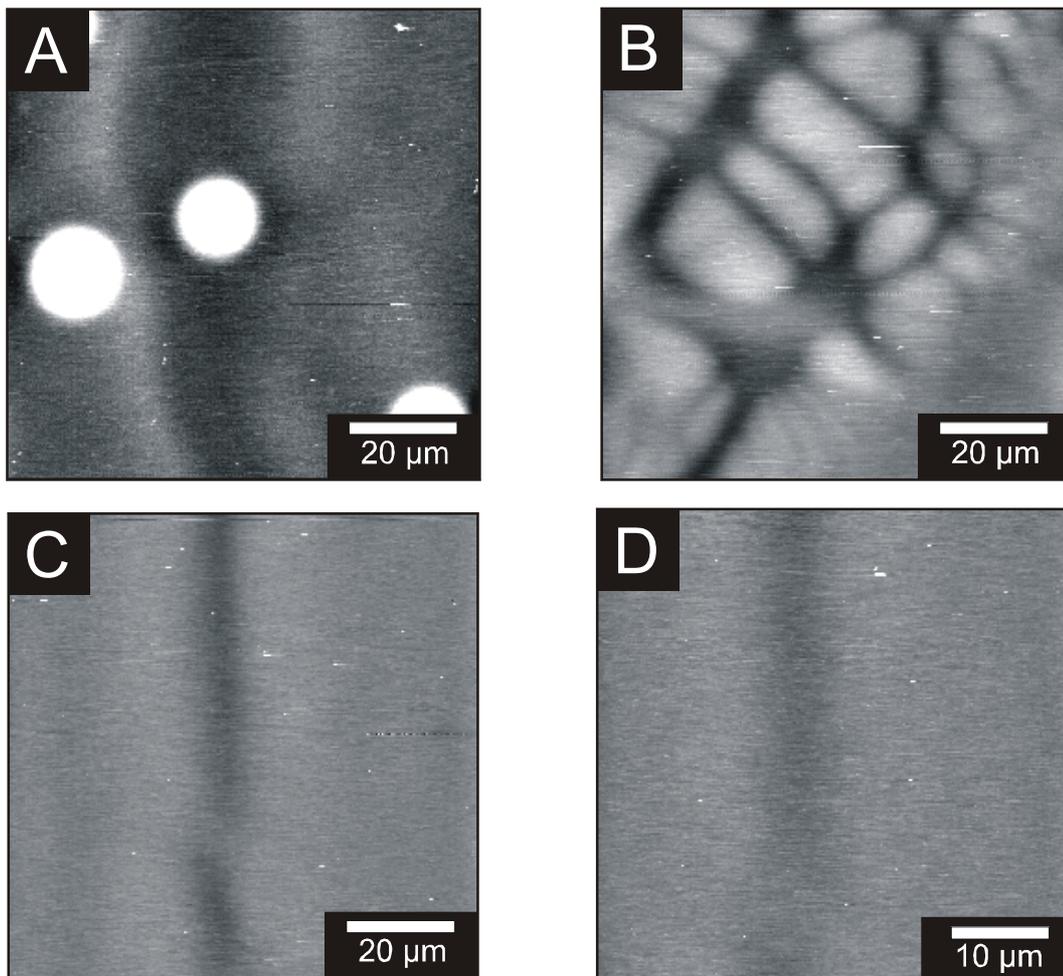


Abb. 43: AFM Höhenbilder von verschiedenen auf Mica fusionierten Liposomen (AC Mode, MSCT-AUNM E, Grauwertebereich 4nm) . Es handelt sich bei allen Bildern um PS-Liposomen, die nacheinander mit (A) 2 nM LBP und 50 μ M Lipid A, (B) 2 nM LBP und 100 μ M Lipid A, (C) 2 nM LBP, α LBP-Ab (biG33, Endkonzentration 100 ng/ml) und 50 μ M Lipid A und (D) 2 nM LBP, α LBP-Ab (biG33, Endkonzentration 100 ng/ml) und 100 μ M Lipid A vorinkubiert wurden.

Durch Kraft-Abstandsmessungen sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Lipid A-Aggregate auf den Lipidfilm haben. Der Graph (Abb. 44) weist in über einen Bereich von ca. 45 nm bei beiden Lipid A-Konzentrationen (50 und 100 μ M) einen Anstieg der Kraft um 13 nN auf, sowohl auf den erhöhten als auch den niedrigeren Bereichen. Dann ist mit der

Cantileverspitze kein weiteres Eindringen möglich. Man erkennt keine letzte Lipiddoppelschicht. Bei diesem Versuch ist im Vergleich zu der in Abb. 42 dargestellten Messung ein weicherer Cantilever verwendet worden. Es ist also nicht auszuschließen, dass dieser Cantilever nicht steif genug ist, um durch stabile Bereiche durchzudrücken. Es ist zu berücksichtigen, dass die Kräfte in Abb. 42 und Abb. 44 nicht direkt vergleichbar sind, da die Spitzengeometrien der verwendeten Cantilever verschieden waren. Dennoch reicht dieses Ergebnis dazu aus, um festzustellen, dass es auch bei den PS/LBP/Lipid A-Filmen zu einer Ausbildung von Mehrfachsichten kommt, die 10-15 nm dicker sind als die des PS/LBP-Films.

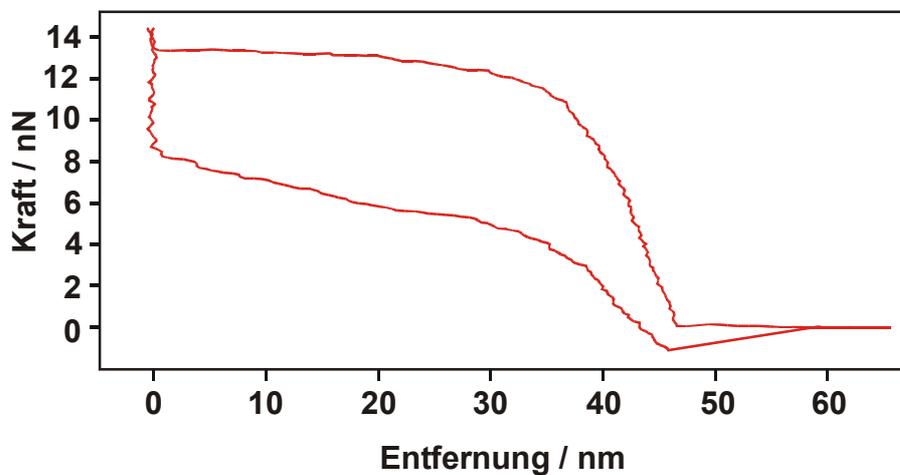


Abb. 44: Kraft-Abstandskurve (MSCT-AUNM E) auf einem PS/LBP/Lipid A-Film (100 μM PS, 2 nM LBP, 50 μM Lipid A). Bei diesem Film handelt es sich um Mehrfachsichten, die insgesamt ca. 45 nm dick sind.

4.5 Fluoreszenzspektroskopie mit polarisiertem Licht (Polarisationsmessungen) an Membransystemen

In diesem Kapitel wird der Einfluss des LBP auf die Lipideigenschaften mittels Polarisationsmessungen näher dargestellt. Zunächst wird im Folgenden der Begriff „Polarisation“ und das Prinzip der Polarisationsbestimmung an Membransystemen zur Messung des Ordnungszustandes der Lipidkohlenwasserstoffketten dargelegt. Anschließend wird auf die durchgeführten Experimente eingegangen

Um den Ordnungszustand zu bestimmen, werden die Kohlenwasserstoffketten mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem sogenannten Fluorophor markiert. In der vorliegenden Arbeit ist der Polarisationsfarbstoff DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene) verwendet worden. Das DPH

Molekül ordnet sich dabei aufgrund seiner hydrophoben und linearen Struktur parallel zu den Kohlenwasserstoffketten im Kettenbereich ein (Pottel et al., 1983). Der Ordnungszustand des DPH spiegelt somit den Ordnungszustand der Kohlenwasserstoffketten wieder (Van Blitterswijk et al., 1981). Das DPH wurde von der Firma Fluka Chemie (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) bezogen.

Monochromatisiertes und in vertikaler Richtung linear polarisiertes Licht regt die geeignet orientierten Farbstoffmoleküle (im Falle des DPH bei 360 nm) an. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, dass diejenigen Farbstoffmoleküle der Vesikelmembran angeregt werden, deren elektrische Dipolmomente zufällig in Richtung des elektrischen Feldvektors der Anregungswelle angeordnet sind, besonders hoch. Die Kohlenwasserstoffketten der Vesikelmoleküle und somit auch die Farbstoffmoleküle selbst sind mehr oder weniger beweglich. Somit stimmt das elektrische Dipolmoment zum Anregungszeitpunkt nicht mehr notwendigerweise mit dem zum Abstrahlungszeitpunkt überein. Je größer die Bewegungsfreiheit der Vesikelmoleküle ist, desto weniger bleibt die Richtungsselektion des Erregerlichts beim Fluoreszenzlicht erhalten.

Ein quantitatives Maß für die mögliche Maximalrotation der DPH-Moleküle und damit für den Ordnungszustand der Membran ist die Polarisation P , die aus der parallel und senkrecht polarisierten Fluoreszenzintensität I_{\parallel} bzw. I_{\perp} bestimmt wird, jeweils bezogen auf die Polarisationsrichtung des Anregungslichts (Van Blitterswijk et al., 1981). Die Fluoreszenzintensitäten wurden bei einer Emissionswellenlänge von 430 nm bestimmt. P ist folgendermaßen definiert (Lakowicz, 1998):

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (24)$$

P : Polarisation,

I_{\parallel} : Fluoreszenzintensität der Polarisationsrichtung parallel zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts

I_{\perp} : Fluoreszenzintensität der Polarisationsrichtung senkrecht zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts

Im Falle einer völligen Neuorientierung der fluoreszierenden Moleküle während ihrer Anregung sind die Fluoreszenzintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} gleich groß. Daraus ergibt sich als untere

Grenze 0 als minimaler Polarisationswert. Im Falle einer maximalen Erhaltung des Orientierungszustandes ergibt sich für die obere Grenze ein maximaler Wert von 0,5 für die Polarisation (Lakowicz, 1998). Bewegen sich die Fettsäureketten während der Lebensdauer des angeregten Zustandes des DPH aus der Polarisationsrichtung des eingestrahlten Lichtes heraus, so nimmt I_{\parallel} ab und I_{\perp} zu.

Aufgrund nicht vollständig symmetrischer Ausführung der beiden Photomultiplier, die zur Messung der Fluoreszenzintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} dienen, und der beiden Strahlengänge müssen die Intensitätssignale des Fluoreszenzlichts miteinander vergleichbar gemacht werden. Dies wird durch einen Korrekturfaktor f realisiert:

$$P = \frac{I_{\parallel} \cdot f - I_{\perp}}{I_{\parallel} \cdot f + I_{\perp}}. \quad (25)$$

Hierbei ist f der sogenannte Unsymmetriefaktor.

Der Korrekturfaktor wird vor jeder Messung experimentell bestimmt, indem der Polarisator derart eingestellt wird, dass der elektrische Feldvektor des Anregungslichts in der Verbindungsrichtung der beiden Photomultiplier schwingt. Hierbei befinden sich die beiden zueinander senkrecht stehenden Analysatoren (x- bzw. y-Achse) zusätzlich noch senkrecht zur Polarisationsrichtung (z-Achse). Dadurch müssten sich im ideal-symmetrischen Fall bei beiden Photomultipliern gleich große Fluoreszenzintensitäten ergeben. Der Faktor f berechnet sich zu:

$$f = \frac{I_{H,\perp}}{I_{H,\parallel}}. \quad (26)$$

$I_{H,\perp}$; $I_{H,\parallel}$: Fluoreszenzintensitäten der Photomultiplier für die x- bzw. y-Richtung bei horizontaler Polarisatorstellung

Das verwendete Fluorometer war ein Modell F1 T11 der Firma Spex Industries GmbH (Grasbrunn, Deutschland). Es ist als Zweistrahl-T-Anordnung aufgebaut (Abb. 45), d.h. es ermöglicht die gleichzeitige Messung der Parallel- und Senkrechtkomponente des Fluoreszenzlichts (bezogen auf die Polarisationsrichtung des Anregungslichts). Es besteht aus

einer Xenon-Lampe als Lichtquelle, drei Spiegelgittermonochromatoren, drei Glan-Thompsen-Prismen als Polarisator bzw. Analysatoren, sechs verstellbaren Schlitzblenden, zwei Photomultipliern und einer störlichtfreien Meßkammer.

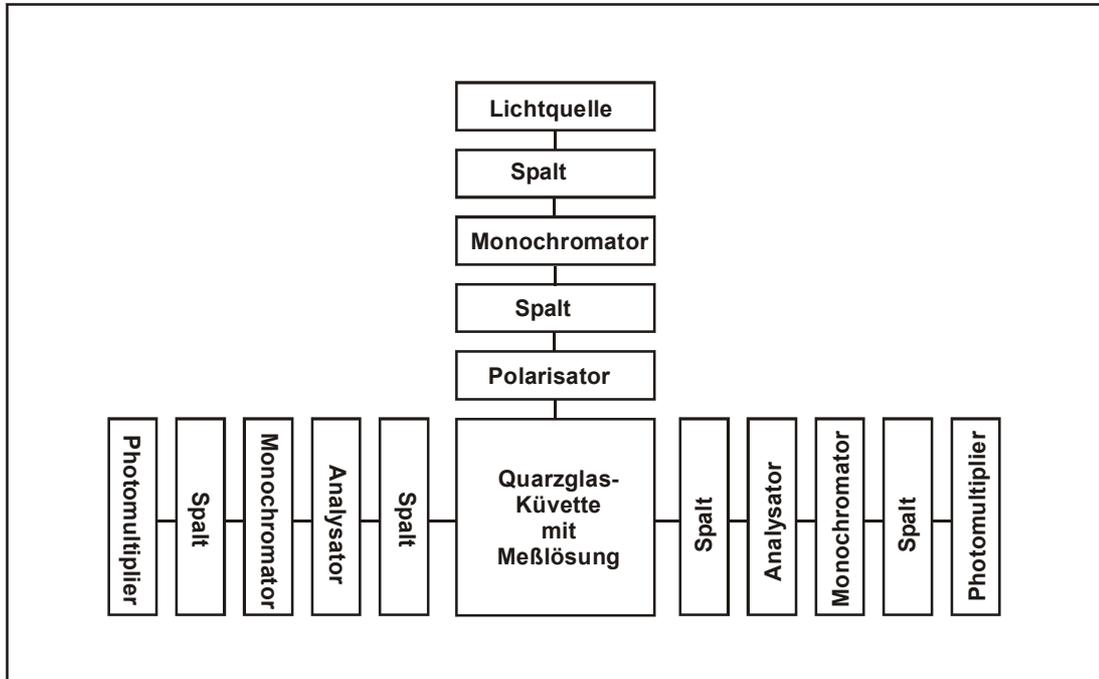


Abb. 45: Darstellung des Versuchsaufbaus für Polarisationsmessungen

Dabei dienen die Spiegelgittermonochromatoren der Monochromatisierung des Anregungslichts und der Filterung des Fluoreszenzlichts. Mit der Einstellung der Schlitzblenden werden die Anregungs- und Emissionsintensitäten und die Bandpassbreite der Wellenlängenfilterung geregelt. Die Fluoreszenzintensitäten beider Polarisationsrichtungen werden über einen Rechner mit der Software DM3000 der Firma Spex Industries GmbH verarbeitet.

4.5.1 Beeinflussung des Phasenübergangs der Kohlenwasserstoffketten zweier Phospholipide durch LBP

Es sollte untersucht werden, inwiefern die Phasenübergänge zweier Lipide, die in Vesikelform verwendet wurden, durch die Zugabe von LBP verändert werden. Als Regel für die Orientierung der Fettsäureketten gilt nach Formel (24): Je kleiner der Wert der Polarisation ist, desto fluider sind die Fettsäuren.

Da PS einen sehr breiten Phasenübergang hat, ist in den nachfolgenden Versuchen statt PS das synthetische Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) verwendet worden. Der Phasenübergang des Dimyristoylphosphatidylserins (DMPS), dem synthetischen Pendant des PS, liegt bei 37°C, also sehr nahe bei dem Phasenübergang des Lipid A, wodurch es nicht mehr möglich ist, sie zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde DMPG verwendet. Der Phasenübergang von DMPG liegt bei etwa 30°C, der von Lipid A etwas höher, nämlich bei etwa 40°C. Diese deutliche Trennung der Phasenübergänge ist Grundlage für die Interpretierbarkeit der Messungen. Es wurde bereits gezeigt, dass der Einbau von LBP in PS- bzw. PG-Liposomen vergleichbar ist (Gutsmann et al., 2001b).

Alle in diesem Abschnitt der Arbeit verwendeten Komponenten sind direkt vor der Messung frisch angesetzt und bis kurz vor ihrer Verwendung bei 4°C bzw. auf Eis gelagert worden. In den Messungen wurden jeweils beide Lipide (DMPG und Lipid A) mit DPH markiert.

Zunächst wurde eine 1:1 molare Mischung von jeweils 50 µM Lipid A und dem synthetischen DMPG in eine Küvette gegeben. Beide Lipide wurden dazu in einer wässriger Phase gelöst (5 mM HEPES, pH 7). Dann ist bei konstanter Temperatur von 37°C die Polarisation aufgezeichnet worden (Abb. 46). Nach 100 s wurde 1 µM LBP hinzugegeben. Dadurch stieg die Polarisation von ca. 0,27 auf ca. 0,3 an und blieb für den Rest des Versuchs bei diesem Wert.

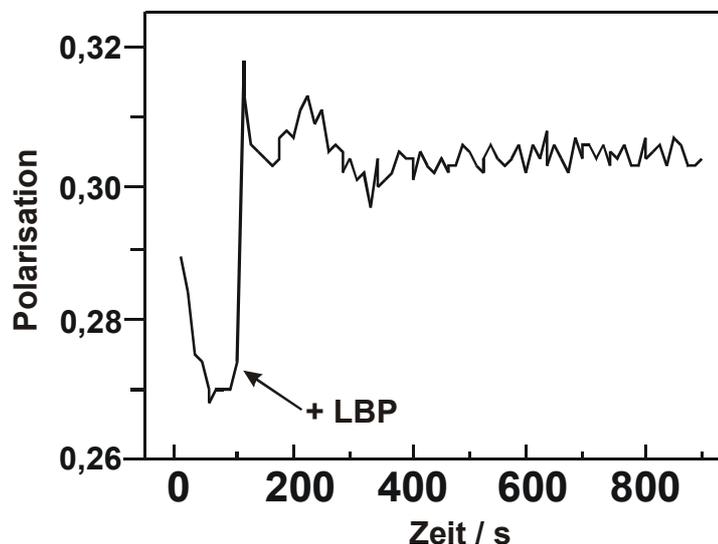


Abb. 46: Messung der Änderung der Polarisation einer 1:1 molaren Mischung von DMPG und Lipid A-Vesikeln bei konstanter Temperatur durch Zugabe von LBP nach 100 s. Der Wert der Polarisation wird durch das Protein dauerhaft zu einem höheren Wert verschoben.

Um das Zusammenwirken zwischen DMPG, Lipid A und LBP besser zu verstehen, sind die einzelnen Phasenübergänge von Lipid A und dem Phospholipid DMPG bei einer Lipidkonzentration von je 100 μM gemessen worden (Abb. 47). Wie bereits erwähnt, liegt der des DMPG bei etwa 30°C und der des Lipid A bei etwa 40°C. Beide Kurven werden durch die Zugabe von 1 μM LBP zu höheren Phasenübergangstemperaturen verschoben. Das bedeutet dass die Fettsäuren von DMPG und Lipid A in Anwesenheit von LBP etwas rigider sind. Dieser Effekt wurde auch für das strukturell dem LBP sehr ähnliche BPI beobachtet (Wiese et al., 1997).

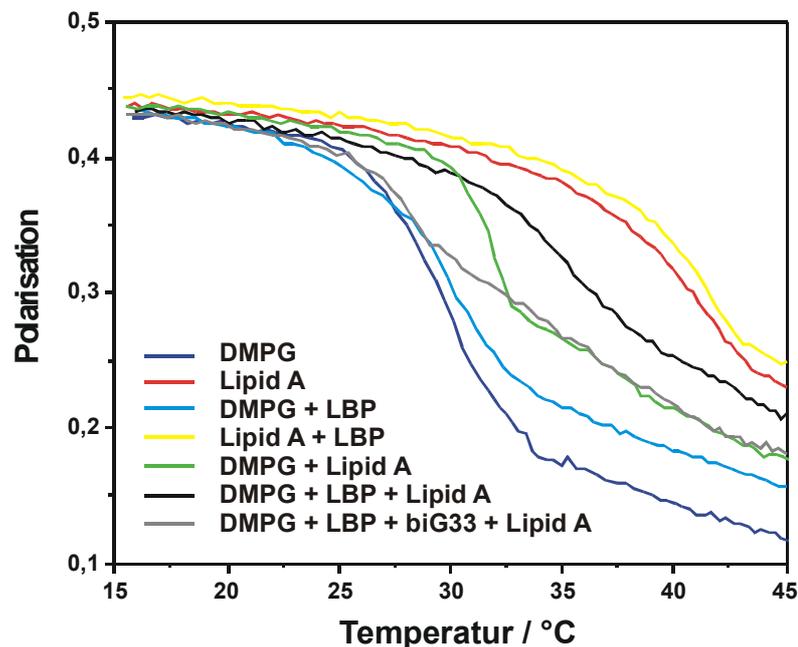


Abb. 47: Verlauf der Polarisation von verschiedenen mit DPH markierten Lipiden in An- und Abwesenheit von LBP bzw. αLBP -Antikörpern in Abhängigkeit von der Temperatur

Eine 1:1 Mischung von jeweils 50 μM DMPG- und Lipid A-Vesikeln besitzt eine Phasenübergangstemperatur bei ca. 33°C. Die Zugabe von 1 μM LBP zu DMPG-Vesikeln und anschließender Zugabe von Lipid A-Vesikeln führt zu einer Verschiebung der Phasenübergangstemperatur auf ca. 35°C, also zu einem Wert oberhalb der Phasenübergangstemperatur einer Mischung von DMPG- und Lipid A-Vesikeln. Gibt man LBP zu Lipid A-Vesikeln und nachfolgend DMPG hinzu, so hat dies den gleichen Kurvenverlauf für die Polarisation wie für Lipid A/LBP/DMPG zur Folge. Zugunsten einer besseren Übersicht wurde auf die Darstellung dieser Kurve in Abb. 47 verzichtet.

Die Zugabe des α LBP-Antikörpers biG33 zu DMPG-Liposomen und die anschließende Zugabe von Lipid A führt zu einem Kurvenverlauf für die Polarisierung wie für DMPG/Lipid A. Der Übersichtlichkeit halber wird auch diese Kurve nicht in Abb. 47 gezeigt.

Der Kurvenverlauf einer DMPG/LBP/biG33/Lipid A-Mischung ist ähnlich, jedoch für Temperaturen unterhalb von ca. 33°C deutlich zu niedrigeren Werten verschoben.

4.6 CD-Spektroskopie

Um im Vergleich zu den Polarisationsmessungen umgekehrt den Einfluss der Lipide auf die Struktur des LBP zu untersuchen, wurden CD-spektroskopische Messungen des Proteins in Ab- und Anwesenheit von PS-Liposomen und Lipid A-Aggregaten gemacht.

Die Messungen der Zirkulardichroismus (CD) - Spektren wurden mit einem Jasco J-720 Spektropolarimeter (JASCO Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Gross-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. In diesem Gerät wird ein linear polarisierter Lichtstrahl durch einen Quarzkristall geschickt, an dem eine hochfrequente Wechselspannung anliegt. Diese bewirkt eine Strukturänderung des Kristalls (Piezoelektrischer Effekt), und es wird ein zirkular polarisierter Lichtstrahl erzeugt. Bei der Bestimmung von Proteincharakteristiken wird ausgenutzt, dass optisch aktive Verbindungen im Bereich einer Absorptionsbande links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren (Velluz et al., 1965). Die Differenz der Lichtabsorption, die beim Durchtritt durch eine optisch aktive Substanz auftritt, wird mit einem Photodetektor gemessen, verstärkt und direkt als Elliptizität aufgezeichnet. Das dabei entstehende Licht lässt sich als elektromagnetische Welle beschreiben, deren elektrischer und magnetischer Vektor senkrecht zueinander stehen und phasenverschoben sind.

Die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht entspricht der Richtung des elektrischen Vektors. Fresnels Theorie zerlegt diesen Vektor in zwei entgegengesetzt zirkular polarisierte Teilvektoren. Der Summenvektor des linear polarisierten Lichts pflanzt sich nach einer Kosinusfunktion fort, ändert also phasisch Länge und Vorzeichen, bleibt aber in der Schwingungsebene.

Zirkular polarisiertes Licht hingegen entspricht einem Vektor gleichbleibenden Betrags, der sich um die Fortpflanzungsachse dreht. Es entsteht das Bild einer Schraube, die sich ohne Drehung vorwärtsschiebt. Die Addition eines rechts zirkular polarisierten Strahls mit einem links polarisierten Strahl gleicher Phase, Intensität und Wellenlänge ergibt durch Vektoraddition linear polarisiertes Licht.

Es wurden zwei unterschiedliche Quarzglas-Küvetten verwendet, eine Tandemküvette (2 x 4,375 mm Schichtdicke) und eine Rundküvette (1 mm Schichtdicke).

Die Tandemküvette besitzt zwei getrennte Kammern, deren Inhalte man durch Schütteln vermengen kann. Dies bietet den Vorteil, dass man zunächst das überlagerte Spektrum zweier voneinander getrennter Komponenten aufnehmen kann und nach dem Schütteln die Möglichkeit hat, eine spektroskopische Messung derselben Substanzen nach einer eventuellen Interaktion zu machen. Wegen der Eigendrehung des Lichts beim Durchtritt durch die Küvetten wird für alle Messungen einer Serie stets die selbe Küvette benutzt, die auch immer gleichartig in den Strahlengang ausgerichtet wird. Die Küvettenreinigung erfolgte mit reinem Ethanol.

Das Spektropolarimeter war mit einem PC für die Datenaufnahme verbunden. Die Spektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 200 und 250 nm mit einer Geschwindigkeit von $10 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ aufgenommen und jeweils zweimal gescannt. Es wurde ebenfalls die an den Photodetektor angelegte Spannung aufgezeichnet, um beurteilen zu können, ob das jeweilige Spektrum im linearen Bereich des Detektors aufgenommen wurde. Das Spektropolarimeter arbeitet bis zu einem Wert von ca. 600 V linear, d.h. es wurden bei der Auswertung keine Elliptizitätswerte berücksichtigt, die bei einem Spannungswert $> 600 \text{ V}$ aufgenommen wurden.

4.6.1 Untersuchung der Wechselwirkung von LBP mit amphiphilen Molekülen

Um Zirkulardichroismusspektren von LBP aufzunehmen, wurde das in einer detergenshaltigen Lösung vorliegende LBP zunächst mit Hilfe einer kleinen Gelsäule (NAP-5 Column von Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in 5 mM Hepes, pH 7 umgepuffert. Damit wurde sichergestellt, dass nur bekannte Komponenten bei den Messungen zugegen waren. Das CD-Spektrum des Puffers besitzt ebenso wie das der im folgenden verwendeten PS-Liposomen bzw. Lipid A-Aggregate einen beinahe geradlinigen Verlauf (Abb. 48A). Die Kurve der Lipid A-Aggregate verhält sich dabei leicht abfallend in Richtung niedriger Wellenlängen. Für diese Messungen wurde die Rundküvette verwendet und ein Wellenlängenbereich von 200 bis 250 nm betrachtet.

Die CD-spektroskopische Messung von LBP alleine (250 mg/ml) (Abb. 48A) ergibt im Wesentlichen eine β -Faltblattstruktur des Proteins handelt (Alder et al., 1973), so wie es auch

die theoretischen Modellrechnungen aus NMR-Daten des BPI vorschlagen (Beamer et al., 1998).

Um zu erfahren, ob die PS-Liposomen bzw. Lipid A-Aggregate einen Einfluss auf das CD-Spektrum bzw. die Struktur des LBP haben, wurden verschiedene Versuche durchgeführt (Abb. 48B). Zunächst wurden in die eine Kammer einer Tandemküvette 500 μ l PS-Liposomen (200 μ M) und in die andere 500 μ l LBP (9 μ M) gefüllt. Anschließend ist das überlagerte CD-Spektrum der beiden getrennten Komponenten aufgenommen worden. Es ergab sich eine typische β -Faltblattstruktur für das Protein (Abb. 48B). Durch Schütteln wurden die PS-Liposomen mit dem LBP in der Tandemküvette vermischt. Die CD-spektroskopische Aufnahme dieser PS/LBP-Mischung zeigt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Spektrums in Richtung höherer Wellenlängen von ca. 220 nm auf 224 nm. Eine solche Verschiebung wird als Einbau des Proteins in eine hydrophobere Umgebung gedeutet (Persönliche Mitteilung von Herrn PD Dr. Joachim Grötzinger, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

Auf die gleiche Weise wurde der Einfluss von Lipid A-Aggregaten auf LBP untersucht. Hierzu wurden 500 μ l Lipid A-Aggregate (200 μ M) in die eine der beiden Tandemküvettenkammern und 500 μ l des LBP (9 μ M) in die andere Kammer gefüllt. Ein CD-Spektrum wurde aufgenommen. Dann sind durch Schütteln die Inhalte der Tandemküvette miteinander vermischt worden und ein weiteres CD-Spektrum der Lipid A/LBP-Mischung aufgenommen worden. Auch hier zeigt sich wie bei der PS/LBP-Mischung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in die Richtung höherer Wellenlängen von ca. 222 nm zu 224 nm, was bedeutet, dass das LBP auch durch Lipid A-Aggregate in eine hydrophobere Umgebung gebracht wird.

Desweiteren wurde die Wirkung der Lipid A-Aggregate auf die PS/LBP-Mischung untersucht. Hierzu wurden 500 μ l der PS/LBP-Mischung (100 μ M / 4,5 μ M) in die eine der beiden Kammern der Tandemküvette und 500 μ l der Lipid A-Aggregate (100 μ M) in die andere Kammer gefüllt. Dann wurde ein überlagertes CD-Spektrum aufgenommen und anschließend die Tandemküvette wie in den vorangegangenen Versuchen geschüttelt. Das CD-Spektrum dieser PS/LBP/Lipid A-Mischung zeigt im Vergleich zu der PS/LBP-Mischung eine kleine Verschiebung des Absorptionsmaximums in Richtung höherer Wellenlängen von ca. 222 nm auf 222,5 nm. Sowohl durch die Zugabe von LBP zu PS-Liposomen bzw. Lipid A-Aggregaten alleine als auch als PS/LBP-Mischung zu Lipid A-Aggregaten kommt es trotz jeweils gleichbleibender Menge LBP zu einer Abnahme der Absorptionsmaxima.

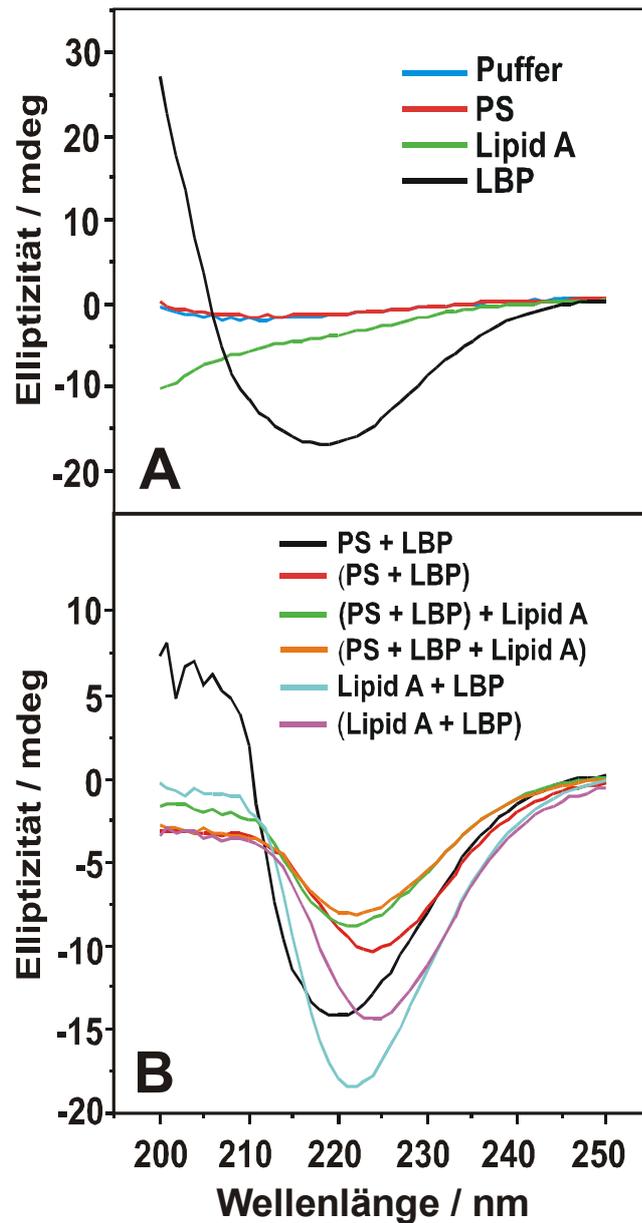


Abb. 48: CD-spektroskopische Darstellung der Wechselwirkung von dem vorwiegend in β -Faltblattstruktur vorliegenden Protein LBP mit PS-Liposomen und/oder Lipid A-Aggregaten. Verwendung einer (A) normalen Rundküvette und (B) Tandemküvette verwendet. Der Vorteil einer Tandemküvette liegt in der Möglichkeit, ein Spektrum von zwei Komponenten gleichzeitig aufnehmen zu können. Durch Schütteln der Tandemküvette können die beiden Komponenten miteinander vermischt und anschließend ein neues Spektrum aufgenommen werden. Die Verschiebung eines Spektrums zu höheren Wellenlängen bedeutet, dass das Protein in eine hydrophobere Umgebung eingebettet wird. Dies geschieht sowohl in Anwesenheit von PS als auch von Lipid A. Ein Spektrum einer PS/LBP-Mischung mit Lipid A hingegen zeigt eine Verschiebung zu niedrigeren Wellenlängen. In der Abbildung werden gemischte Komponenten durch Klammern deutlich gemacht.

Dies wird als eine verstärkte Ausprägung der β -Faltblattstruktur gedeutet (Persönliche Mitteilung von Herrn PD Dr. Joachim Grötzinger, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Demzufolge muss bei allen Experimenten eine Interaktion stattgefunden haben, die einen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins LBP hat.

4.7 Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel 4

Die Wechselwirkung zwischen LBP und Phospholipid-Liposomen bzw. LPS-Aggregaten wurde bislang in Experimenten untersucht, in denen es nicht möglich war, spezifische Interaktionen einzelner Komponenten zu detektieren, und die somit sehr komplexe Ergebnisse geliefert haben. Ziel dieser Arbeit war insbesondere die Untersuchung der lateralen Organisation. Hierzu wurden AFM-Messungen an Mono- und Bilayern durchgeführt, deren Ergebnisse durch Polarisationsmessungen und CD-spektroskopische Messungen unterstützt wurden.

Ein Phosphatidylserin (PS)-Monolayer zeigt trotz der gegebenen Inhomogenität natürlicher Phospholipide im Gegensatz zu Lipid A keine Domänen. Da der Phasenübergang natürlicher Phospholipide bei niedrigen Temperaturen liegen, kann davon ausgegangen werden, dass sich der PS-Monolayer bei Raumtemperatur in einem fluiden Zustand befindet. Die innerhalb des aus PS/LBP bestehenden LB-Films erfolgte Domänenbildung lässt jedoch keine Rückschlüsse dahingehend zu, ob die Aggregation des LBP bereits in der Subphase oder erst im Monolayer stattgefunden hat. Da sich Lipid A nicht in einen PS/LBP-Monolayer einbaut, wird aufgrund der Veränderung der Topographie des aus PS/LBP/Lipid A bestehenden LB Films davon ausgegangen, dass es zu einer Anlagerung des Lipid A an den PS/LBP-Film kommt, was zu einer Umstrukturierung der LBP-Domänen führt.

Ein mit Hilfe von Liposomen präparierter PS-Bilayer zeigt ebenfalls keinerlei Domänen. Er ist ca. 5 nm dick, und es wird wie bei den Monolayern auch hier davon ausgegangen, dass er sich in einem fluiden Zustand befindet. Inkubiert man PS-Liposomen mit LBP vor, so bilden sich wie bei dem Monolayerexperiment größere LBP-Domänen aus. Eine nachträgliche Zugabe von LBP zu einem PS-Bilayer führt zu vielen kleinen einzelnen Domänen. Aufgrund der verringerten lateralen Platzwechselrate in festkörperuntersetzten Lipidlayern (Nollert et al., 1995; Schütz et al., 1997) ist vermutlich kein LBP-Einbau in den Bilayer möglich. Da im Gegensatz zu den PS/LBP-Monolayer- und den vorinkubierten PS/LBP-Liposomenversuchen bei der nachträglichen Zugabe des LBP zu einem PS-Bilayer keine Aggregatbildung des LBP stattfindet, muss die Aggregation bzw. Domänenbildung innerhalb der Membran erfolgen.

Offensichtlich spielt die Probenpräparation eine ganz entscheidene Rolle für die Interaktion der beteiligten Reagenzien.

Um zu klären, ob sich LBP ausschließlich in den beobachteten Domänen befindet, sind PS-Liposomen mit unterschiedlichen Mengen LBP vorinkubiert und zur anschließenden Fusion auf Mica gegeben worden. Obwohl die Rauigkeit der PS/LBP-Filme mit zunehmender Menge LBP ansteigt, werden die beobachteten Domänen nicht beliebig groß. Hieraus wird geschlossen, dass sich das LBP nicht ausschließlich in Aggregatdomänen aufhält. Wird mit einem Cantilever, an den kovalent α LBP-Antikörper gebunden sind, eine PS/LBP-Schicht abgescannt, die PS und LBP im molaren Verhältnis $5 \cdot 10^6:1$ enthält, so wird in dem entstehenden Kraftbild LBP sichtbar, das in dem korrespondierenden Höhenbild nicht zu sehen ist. Ob das LBP in Einzelmolekülform oder in kleinen Aggregaten vorliegt, ist nicht abschließend zu klären, da die Antikörper an der Spitze die laterale Auflösung reduzieren (Raab et al., 1999). Außerdem kann zumindest zur Zeit keine Aussage darüber gemacht werden, wie viele α LBP-Antikörper an die Cantileverspitze binden, und somit auch nicht darüber, wie viele Antikörper/LBP-Kontakte gleichzeitig hergestellt werden.

Während bei einem molaren PS:LBP Verhältnis von $5 \cdot 10^4:1$ überall, auch in den Bereichen ohne die im Höhenbild sichtbaren Domänen eine Bindung gezeigt werden konnte, war die Detektion bei einem molaren PS:LBP Verhältnis von $5 \cdot 10^6:1$ nur dort möglich, wo auch im Kraftbild Domänen zu sehen waren. Da das LBP bei einem molaren PS:LBP Verhältnis von $5 \cdot 10^6:1$ in den Höhenbildern nicht zu sehen ist, in den Kraftbildern jedoch nachgewiesen werden kann, muß das LBP tief in die Membran eingebettet sein und nur soweit herausragen, dass es für den Antikörper noch erreichbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine kurzreichweitige (bis zu ca. 3 nm) unspezifische Wechselwirkung zwischen α LBP-Antikörpern und PS und sowohl eine unspezifische als auch eine langreichweitige (bis zu 80 nm) spezifische Wechselwirkung zwischen α LBP-Antikörpern und LBP stattfindet. Aufgrund der Größe der gemessenen Kräfte (im Mittel (118 ± 4) pN) kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der spezifischen Wechselwirkung um das Aufreißen der kovalenten Bindung zwischen Antikörper und Cantileverspitze handelt. Um eine kovalente Bindung aufzubrechen, wären Kräfte von über 1 nN erforderlich (Grandbois et al., 1999). Ebenfalls kann ein Aufreißen einer Bindung zwischen einem an den α LBP-Antikörper gebundenen LBP-Molekül und der PS-Schicht ausgeschlossen werden. Würde LBP an die Antikörper an der Cantileverspitze gebunden bleiben, so müsste in einer Kraftkurve, die an einer Stelle

durchgeführt wird, an der kein LBP detektiert wurde, ebenfalls die spezifische Bindung gemessen werden. Dies war in keinem der Experimente der Fall. Demzufolge muß es sich bei dem aus den Kraftkurven ersichtliche spezifische Wechselwirkungsbereich um ein Aufreißen der Bindung zwischen LBP und Antikörper handeln. Bereits in vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe an planaren Membranen war es möglich, durch Messung der Änderung des Membranpotentials eine Bindung des α LBP-Antikörpers auf beiden Seiten eines PS-Bilayers, zu dem LBP hinzugegeben wurde, indirekt nachzuweisen (Gutsmann et al., 2001a). Ein einzelnes LBP Molekül ist ca. 13 nm lang und 4 nm breit. Da ein PS-Bilayer ca 5 nm dick ist, muss nach den vorangegangenen Überlegungen davon ausgegangen werden, dass sich LBP transmembran in Lipidmatrizes einbaut. Es ist aus den gewonnenen Bildern dennoch nicht möglich, eine Aussage über die Orientierung der LBP-Moleküle in der Membran zu treffen. Aufgefallen ist allerdings, dass keine laterale Diffusion der LBP-Moleküle beobachtet werden konnte. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die eingeschränkte Beweglichkeit der Membran durch die Festkörperunterstützung zurückzuführen.

Um Schichtdicken von Membranen zu bestimmen, die mit Hilfe von Liposomen präpariert wurden, sind ebenfalls Kraftkurven aufgenommen worden. Drückt man mit einem Cantilever durch eine Membran, so kommt es während des Durchdrückens zu einem Anstieg der dazu benötigten Kraft. Die Dicke einer PS/LBP-Schicht, die mit vorinkubierten PS/LBP-Liposomen präpariert worden ist, ergibt sich zu ca. 30 nm. Hieraus läßt sich schließen, dass es durch die Zugabe von LBP zu einer Quervernetzung mehrerer PS-Bilayer kommt. Ebenso wie die indirekten Messungen an den planaren Membranen zeigt diese Multilayerausbildung, dass LBP-Moleküle mindestens zwei Bindungsstellen für Lipide besitzen müssen. Durch die Bildung der Multischichten „spürt“ der letzte Bilayer vermutlich die Festkörperunterstützung nur noch wenig, so er sich eher wie ein natürliches System verhält. Es sollte auch hier erwähnt werden, dass die gemessene Kraft von der Spitzengeometrie abhängt. Da wir zur Zeit noch keine Aussagen über die Spitzengeometrie machen können, sind aus diesem Grund auch keine Rückschlüsse auf die Membranelastizitäten möglich.

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen PS-Liposomen, LBP-Molekülen und Lipid A-Aggregaten sind vorinkubierte PS/LBP-Liposomen mit Lipid A-Aggregaten inkubiert worden. Rasterkraftmikroskopische Höhenbilddaufnahmen zeigen, dass es nur in Anwesenheit von LBP zu einer Fusion zwischen PS und Lipid A kommt. Hierbei sind unterschiedliche Stadien der Fusion zu beobachten gewesen. Mittels Kraftspektroskopie konnte gezeigt werden, dass es auch unter diesen Bedingungen zur Ausbildung von Mehrfachsichten

kommt. Da es möglich ist, die Lipid A-Domänen nachträglich „einzuarbeiten“, wird die Vermutung bestätigt, dass die genügend weit von der Festkörperunterstützung entfernten Lipidschichten beweglicher sind als die darunterliegenden Schichten.

Es ist durch die Zugabe eines α LBP-Antikörpers zu PS/LBP-Liposomen möglich, die Fusion mit Lipid A zu inhibieren. Auch Präparationen aus PS-Liposomen, die mit Lipid A-Aggregaten vorinkubiert waren, zeigen nicht die Bildung der spezifischen Strukturen. Aus diesen Experimenten wird geschlossen, dass die LBP-Moleküle mit ihren positiven Ladungen an den äußeren Enden als Fusionsproteine für die anionischen Lipidmembranen/-aggregate wirken.

Durch Polarisationsmessungen wurde der Einfluss von LBP auf das Phasenverhalten von Lipiden untersucht. Da das natürliche PS inhomogen bezüglich der Kohlenwasserstoffketten vorliegt, kann kein gut definierter Phasenübergang bestimmt werden, daher wurde statt PS DMPG verwendet, dessen Phasenübergang bei ca. 30°C liegt. Bei den Versuchen wurde eine Erhöhung der Phasenübergangstemperaturen durch LBP festgestellt. Die Zugabe von LBP zu DMPG und anschließender Zugabe von Lipid A führt zu einem Phasenübergang, der sich von den Phasenübergängen unterscheidet, der durch die Zugabe von LBP zu den einzelnen Lipidvesikeln verursacht wird. Auch aus den Polarisationsmessungen lässt sich schließen, dass es durch die Wechselwirkung der Lipide mit LBP zu einer Rigidisierung der Lipide kommt und dass LBP als Fusionsprotein zwischen DMPG- und Lipid A-Vesikeln wirkt.

Mit CD-spektroskopischen Messungen wurde der Einfluss von Lipiden auf die physikochemischen Eigenschaften von LBP untersucht. Es konnte infolge der Zugabe von PS und auch von Lipid A ein Einbau des LBP in eine hydrophobere Umgebung beobachtet werden. Einen ähnlichen, jedoch verringerten Effekt bewirkt die Zugabe von Lipid A zu vorinkubierten PS/LBP-Liposomen. Diese Ergebnisse sprechen wie die der AFM- und Polarisationsmessungen für einen Einbau von LBP in eine Lipidmatrix aus PS bzw. Lipid A und für LBP als Fusionsprotein zwischen PS-Liposomen und Lipid A-Aggregaten.

Unsere Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Befunden in der Literatur, die LBP als Shuttleprotein beschreiben (Schumann et al., 1990). Dabei soll ein LBP-Molekül aus einem LPS-Aggregat ein einzelnes LPS-Molekül herauslösen und dieses an den löslichen Rezeptor sCD14 weiterreichen, der es schließlich an Zelloberflächenstrukturen abgibt. Das freie LBP bewegt sich dann wieder zu einem LPS-Aggregat und so fort. Wir vermuten, dass LBP transmembran in der Wirtszelle angeordnet ist und LPS-Aggregate mit der Wirtszellmembran

fusioniert. Durch Wechselwirkung mit weiteren Signalproteinen wie z.B. den Toll-like Rezeptoren wird dann ein transmembranes Signal getriggert.

5 Gesamtzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Eigenschaften von Membranen, kooperative Prozesse in Membranen und Lipid-Protein Wechselwirkungen mit molekularer lateraler Auflösung untersucht. Hierfür ist die Rasterkraftmikroskopie (AFM) angewandt worden. Biologische Zellen und Organismen besitzen einen sehr komplexen Aufbau. Zur Charakterisierung der oben genannten elementaren Prozesse sind deshalb vereinfachte rekonstituierte Membranen verwendet worden, die für die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen festkörperunterstützt wurden. Es sind sowohl Lipidmono- als auch -bilayer präpariert worden. Im Gegensatz zu Bilayern sind Monolayer über mehrere Wochen an Luft stabil und es ist möglich, Untersuchungen der direkt zugänglichen Fettsäureketten durchzuführen. Allerdings sind Ergebnisse aus Monolayer-Experimenten nicht ohne weiteres auf Bilayer übertragbar.

Im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 3) wurden Lipidmonolayer aus R595 LPS und seinem Lipid A mit Hilfe einer Langmuir Filmwaage präpariert. Sie wurden mit dem AFM hinsichtlich ihrer Eigenschaften, wie Topographie und Phasenverhalten, aber auch ihrer Wechselwirkung mit antibakteriellen Peptiden untersucht. Im Folgenden sind hierzu die wichtigsten Ergebnisse stichpunktartig aufgezeigt:

- Etablierung der AFM-Technik und der Präparation von Langmuir-Blodgett Filmen in unserer Arbeitsgruppe
- Detektion druckabhängiger Domänen mit dem AFM und dem Epifluoreszenzmikroskop
- Identifizierung von LE- und LC-Domänen aufgrund von Höhenunterschieden und unterschiedlicher Energiedissipation durch unterschiedlich große attraktive und repulsive Kräfte zwischen Cantileverspitze und Lipiden in den Domänen
- Erstmalige Detektion einer Invertierung des Höhenbildes durch Anwendung attraktiver und repulsiver Kräfte mit dem AFM
- Detailliertere Erklärung der in der Arbeitsgruppe mit elektrischen Messungen an planaren Lipidbilayern erarbeiteten Wirkmechanismen (Wiese et al., 1998) des antibakteriellen Peptids Polymyxin B (PMB) durch die hohe Auflösung des AFM
- Detektion veränderter Domänengrenzen zwischen LE- und LC-Bereichen durch das antibakteriell wirkende humane β -Defensin 3 (hBD-3) mit dem AFM

Der zweite Teil dieser Arbeit (Kapitel 4) befasste sich mit der lateralen Organisation des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) auch in Gegenwart von Lipid A in einer Phosphatidylserin (PS) - Lipidschicht. LBP ist an der Signalkaskade bei der Aktivierung von Immunzellen durch Gram-negative Bakterien beteiligt und wird in der Literatur als Shuttleprotein beschrieben (Schumann et al., 1990). Es wurden zunächst AFM-Messungen an Monolayern durchgeführt (Kapitel 4.4.1). Dabei ergaben sich folgende Resultate:

- Detektion des Einbaus (verifiziert durch die Flächenzunahme bei konstant gehaltenem lateralen Druck während einer Filmwaagenmessung) von LBP in einen PS-Monolayer und der Domänenbildung mittels AFM-Messungen an Langmuir-Blodgett Filmen
- Detektion der Anlagerung von LPS an einen PS-Monolayer, der LBP enthält, durch AFM-Aufnahmen

Es wurden des weiteren AFM-Messungen bezüglich der lateralen Organisation von LBP an Bilayern durchgeführt, die aus Liposomen hergestellt wurden (Kapitel 4.4.2). Außerdem sind ergänzende Experimente zur Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen der Kohlenwasserstoffketten von Lipiden mittels Fluoreszenzspektroskopie mit polarisiertem Licht (Kapitel 4.5) und zur Untersuchung des Einflusses von Lipiden auf die physikochemischen Eigenschaften von LBP mit der CD-Spektroskopie (Kapitel 4.6) gemacht worden. In der vorliegenden Arbeit konnte die oben erwähnte Rolle von LBP als Shuttleprotein widerlegt werden. Für LBP wurde eine Funktion als Fusionsprotein zwischen Phospholipidmembranen und LPS nachgewiesen. Die wichtigsten Ergebnisse sind:

- Etablierung der Präparation von festkörperunterstützten Bilayern durch Liposomen in unserer Arbeitsgruppe
- Detektion von Domänen in PS/LBP-Schichten durch AFM-Höhenbilder
- Nachweis mittels AFM-Bildern der Aggregation von LBP in einer Lipidmembran durch unterschiedliche Probenpräparationen der PS/LBP-Filme
- Nachweis des LBP-vermittelten Einbaus von Lipid A in PS-Bilayer durch AFM-Höhenbilder
- Detektion der Ausbildung von PS-Mehrfachschichten in Anwesenheit von LBP durch AFM-Kraftspektroskopie

- Detektion unterschiedlicher LBP-Domänengrößen in PS-Mono- und -Bilayern und Detektion der/des LBP-vermittelten Anlagerung/Einbaus von Lipid A in PS-Mono-/Bilayer. Dies wird als Hinweis auf eine unterschiedliche Orientierung des LBP in PS-Mono- und Bilayern gedeutet.
- Direkte Detektion von membranständigem LBP durch kraftspektroskopische Bindungsmessungen zwischen LBP und kovalent an den Cantilever gebundenen antiLBP-Antikörpern und somit
- Erstmalige Detektion eines in einer Membran befindlichen Proteins mittels eines Antikörpers
- Nachweis der LBP-vermittelten Interaktion von Lipid A mit dem synthetischen Phospholipid DMPG durch die LBP-induzierte Verschiebung der Phasenübergangstemperatur eines Lipid A/DMPG-Gemisches mittels Fluoreszenzspektroskopie mit polarisiertem Licht (Polarisationsmessungen)
- Nachweis des Einbaus von LBP in eine hydrophobere Umgebung in Anwesenheit von PS bzw. Lipid A mittels CD-Spektroskopie

Das AFM hat sich als ein bildgebendes Verfahren erwiesen, welches sich insbesondere auch zur Untersuchung von Domänen geeignet ist. Hierbei verhält sich ein Monolayer im Vergleich zum Bilayer unterschiedlich. Bilayer sind dem realen biologischen System näher und eignen sich somit besser z.B. für die Charakterisierung transmembraner Proteine. Mit Hilfe der Kraftspektroskopie hat sich durch das Hineindrücken des Cantilevers in Lipidschichten ergeben, dass es in Anwesenheit von LBP zu einer Ausbildung von Mehrfachsichten kommt. Hierbei wird der oberste Bilayer am wenigsten durch die Festkörperunterstützung beeinflusst (keine verminderte laterale Platzwechselrate) und verhält sich natürlicher, d.h. fluider. Diese Mehrfachsichten könnten in Zukunft als Grundlage für weitere Protein/Lipid-Wechselwirkungen dienen. Die Detektion eines Proteins mittels Antikörper bietet für die Zukunft neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Protein-Verteilung in der Zytoplasmamembran von Wirtszellen vor und nach einer Aktivierung durch LPS. Diesbezüglich sind bereits die ersten Vorversuche in unserer Laborgruppe begonnen worden. Zukünftiges Ziel wird dabei sein, zu untersuchen, inwieweit andere an der Signalkaskade der Zellaktivierung durch Gram-negative Bakterien beteiligte Proteine die Domänenbildung von LBP beeinflussen bzw. mit LBP gemeinsam in Lipiddomänen (den sogenannten *Rafts*) angeordnet sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Albrecht, T.R., P.Gruetter, D.Horne, and D.Rugar. 1991. Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscopy sensitivity. *J. Appl. Phys.* 69:668-673.
2. Alder, A.J., N.J.Greenfield, and G.D.Fasman. 1973. Circular dichroism and optical rotary dispersion of proteins and polypeptides. *Meth. Enzymol.* 27:675.
3. Alexander, S., L.Hellems, O.Marti, J.Schneir, V.Elings, and P.K.Hansma. 1989. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *J. Appl. Phys.* 65:164-167.
4. Alvarez, E., V.Ruiz-Gutierrez, M.C.Santa, and A.Machado. 1993. Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech. Ageing Dev.* 71:1-12.
5. Anczykowski, B., D.Krueger, K.L.Babcock, and H.Fuchs. 1996. Basic properties of dynamic force spectroscopy with the scanning force microscopy in experiment and simulation. *Ultramicroscopy* 66:251-259.
6. Bayston, K.F. and J.Cohen. 1990. Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *J. Med. Microbiol.* 31:71-83.
7. Beamer, L.J., S.F.Carroll, and D.Eisenberg. 1998. The BPI/LBP family of proteins: A structural analysis of conserved regions. *Protein Sci.* 7:906-914.
8. Benz, M., T.Gutsmann, N.Chen, R.Tadmor, and J.Israelachvili. 2004. Correlation of AFM and SFA measurements concerning the stability of supported lipid bilayers. *Biophys. J.* 86:870-879.
9. Berger, C.E.H., K.O.van der Werf, R.P.H.Kooyman, B.G.de Grooth, and J.Greve. 1995. Functional group imaging by adhesion AFM applied to lipid monolayers. *Langmuir* 11:4188-4192.
10. Biggs, S. 1995. Steric and bridging forces between surfaces bearing adsorbed polymer: An atomic force microscopy study. *Langmuir* 11:156-162.
11. Binnig, G., C.F.Quate, and C.Gerber. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56:930-933.
12. Binnig, G., H.Rohrer, and C.Gerber. 1982. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 49:57-61.

13. Binnig,G. and D.P.E.Smith. 1986. Single-tube three-dimensional scanner for scanning tunneling microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 57:1688.
14. Blodgett,K.B. 1934. Monomolecular films of fatty acids on glass. *J. Am. Chem. Soc.* 56:495.
15. Blodgett,K.B. 1935. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid state surface. *J. Am. Chem. Soc.* 57:1007-1022.
16. Blodgett,K.B. and I.Langmuir. 1937. Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Phys. Rev.* 51:964-982.
17. Blume,A. 1979. A comparative study of the phase transition of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 557:32-44.
18. Blunck,R., O.Scheel, M.Müller, K.Brandenburg, U.Seitzer, and U.Seydel. 2000. New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: Involvement of a K⁺ channel in transmembrane signaling. *J. Immunol.* 166:1009-1015.
19. Bone,R.C. 1991. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.* 115:457-469.
20. Brandenburg,K., S.Kusumoto, and U.Seydel. 1997. Conformational studies of synthetic lipid A analogues and partial structures by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1329:193-201.
21. Brown,D.A. and E.London. 1997. Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:1-7.
22. Brown,D.A. and E.London. 1998. Function of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-136.
23. Bushan,B. 2004. Self-assembled monolayers for controlling adhesion, friction and wear. *In Nanotechnology*. B.Bushan, editor. Springer, Heidelberg. 831-60.
24. Butt,H.J. and M.Jaschke. 1995. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology* 6:1-7.
25. Butt,H.J., P.Siedle, K.Seifert, K.Fendler, and T.Seeger. 1993. Scan speed limit in atomic force microscopy. *J. Microsc.* 169:75-84.
26. Cai,X.-E. and J.Yang. 2002. Molecular forces for the binding and condensation of DNA molecules. *Biophys. J.* 82:357-365.

27. Chen,C.J. 1992. In situ testing and calibration of tube piezoelectric scanners. *Ultramicroscopy* 42-44:1653-1658.
28. Chen,X., C.J.Roberts, M.C.Zhang, and S.J.B.Tendler. 2002. Phase contrast and attraction-repulsion transition in tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science* 519:L593-L598.
29. Cleveland,J.P., B.Anczykowski, A.E.Schmid, and V.Elings. 1998. Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 72:2613-2615.
30. Cleveland,J.P., S.Manne, D.Bocek, and P.K.Hansma. 1993. Nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning probe microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 64:403-405.
31. Deleu,M., K.Nott, R.Brasseur, P.Jacques, P.Thonart, and Y.F.Dufrene. 2001. Imaging mixed lipid monolayers by dynamic atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1513:55-62.
32. Dentener,M.A., G.J.M.Francot, and W.A.Buurman. 1996. Bactericidal/permeability-increasing protein, a lipopolysaccharide-specific protein on the surface of human peripheral blood monocytes. *J. Infect. Dis.* 173:232-235.
33. Dentener,M.A., E.J.U.Von Asmuth, G.J.M.Francot, M.N.Marra, and W.A.Buurman. 1993. Antagonistic effects of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein on lipopolysaccharide- induced cytokine release by mononuclear phagocytes: Competition for binding to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 151:4258-4265.
34. Dufrene,Y.F. and G.U.Lee. 2000. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochim. Biophys. Acta* 1509:14-41.
35. El Mashak,E.M. and J.F.Tocanne. 1980. Polymyxin B-phosphatidylglycerol interactions: A monolayer ($\pi, \Delta V$) study. *Biochim. Biophys. Acta* 596:165-179.
36. Erlandsson,R., G.M.McClelland, C.M.Mate, and S.Chiang. 1988. Atomic force microscopy using optical interferometry. *J. Vac. Sci. Technol. A* 6:266-270.
37. Fielding,C.J. and P.E.Fielding. 2003. Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochim. Biophys. Acta* 1610:219-228.
38. Franz,V., S.Loï, H.Müller, E.Bamberg, and H.J.Butt. 2002. Tip penetration through lipid bilayers in atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23:191-200.

39. Galanos,C., M.A.Freudenberg, T.Katschinski, R.Salomao, H.Mossmann, and Y.Kumazawa. 1992. Tumor necrosis factor and host response to endotoxin. *In* Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides. J.L.Ryan and D.C.Morrison, editors. CRC Press, Boca Raton. 75-102.
40. Galanos,C., O.Luederitz, and O.Westphal. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9:245-249.
41. Ganz,T. and R.I.Lehrer. 1995. Defensins. *Pharmacol. Ther.* 66:191-205.
42. Ganz,T. and R.I.Lehrer. 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today* 5:292-297.
43. Gibson,C.T., G.S.Watson, and S.Myhra. 1996. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy. *Nanotechnology* 7:259-262.
44. Gibson,C.T., G.S.Watson, and S.Myhra. 1997. Scanning force microscopy - calibrative procedures for 'best practice'. *Scanning* 19:564-581.
45. Giessibl,F.J. 1995. Atomic resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic force microscopy. *Science* 267:68-71.
46. Giocondi,M.C., L.Pacheco, P.E.Milhiet, and C.Le Grimellec. 2001. Temperature dependence of the topology of supported dimirystoyl-distearoyl phosphatidylcholine bilayers. *Ultramicroscopy* 86:151-157.
47. Glaser,M. 1993. Lipid domains in biological membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:475-481.
48. Goddenhenrich,T., H.Lemke, U.Hartmann, and C.Heiden. 1990. Force microscopy with capacitive displacement detection. *J. Vac. Sci. Technol. A* 8:383-387.
49. Grandbois,M., M.Beyer, M.Rief, H.Clausen-Schaumann, and H.E.Gaub. 1999. How strong is a covalent bond? *Science* 283:1727-1730.
50. Gutschmann,T., M.Fix, J.W.Larrick, and A.Wiese. 2000a. Mechanisms of action of rabbit CAP18 on monolayers and liposomes made from endotoxins or phospholipids. *J. Membr. Biol.* 176:223-236.
51. Gutschmann,T., N.Haberer, U.Seydel, and A.Wiese. 2001a. Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. *Biol. Chem.* 382:425-434.

52. Gutschmann,T., J.W.Larrick, U.Seydel, and A.Wiese. 1999. Molecular mechanisms of interaction of rabbit CAP18 with outer membranes of gram-negative bacteria. *Biochemistry* 38:13643-13653.
53. Gutschmann,T., M.Müller, S.F.Carroll, R.C.MacKenzie, A.Wiese, and U.Seydel. 2001b. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect. Immun.* 69:6942-6950.
54. Gutschmann,T., B.Riekens, H.Bruhn, A.Wiese, U.Seydel, and M.Leippe. 2003. Interaction of amoebapores and NK-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry* 42:9804-9812.
55. Gutschmann,T., A.B.Schromm, M.H.J.Koch, S.Kusumoto, K.Fukase, M.Oikawa, U.Seydel, and K.Brandenburg. 2000b. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated interaction of lipid A from different origin with phospholipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2:4521-4528.
56. Hagge,S.O., H.De Cock, T.Gutschmann, F.Beckers, U.Seydel, and A.Wiese. 2002. Pore formation and function of phosphoporin PhoE of Escherichia coli are determined by the core sugar moiety of lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 277:34247-34253.
57. Hames,B.D. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. *In* Gel electrophoresis of proteins. B.D.Hames and D.Rickwood, editors. IRL Press, Oxford.
58. Harder,J., J.Bartels, E.Christophers, and J.M.Schröder. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861.
59. Harder,J., J.Bartels, E.Christophers, and J.M.Schroder. 2001. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276:5707-5713.
60. Harder,T. and K.Simons. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:534-542.
61. Hassan,E., W.F.Heinz, M.D.Antonik, N.P.D'Costa, S.Nageswaran, C.A.Schoenenberger, and J.H.Hoh. 1998. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 74:1564-1578.
62. Haworth,R., N.Platt, S.Keshav, D.Hughes, E.Darley, H.Susuki, Y.Kurihara, T.Kodama, and S.Gordon. 1997. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal septic shock. *J. Exp. Med.* 186:1431-1439.

63. Haziot,A., B.Z.Tsuberi, and S.M.Goyert. 1993. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 150:5556-5565.
64. Heumann,D., P.Gallay, C.Barras, P.Zaech, R.J.Ulevitch, P.S.Tobias, M.P.Glauser, and J.D.Baumgartner. 1992. Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 148:3505-3512.
65. Hoessli,D.C., S.Ilangumaran, A.Soltermann, P.J.Robinson, B.Borisch, and U.D.Nasir. 2000. Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform. *Glycoconj. J.* 17:191-197.
66. Hoh,J.H. and P.K.Hansma. 1992. Atomic force microscopy for high-resolution imaging in cell biology. *Trends Cell Biol.* 2:208-213.
67. Hollars,C.W. and R.C.Dunn. 1998. Submicron structure in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers probed with confocal, atomic force, and near-field microscopy. *Biophys. J.* 75:342-353.
68. Hu,Y., P.L.Fisette, L.C.Denlinger, A.G.Guadarrama, J.A.Sommer, R.A.Proctor, and P.J.Bertics. 1998. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* 273:27170-27175.
69. Hutter,J.L. and J.Bechhoefer. 1993. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* 64:1868-1873.
70. Israelachvili,J.N. 1991. Intermolecular and surface forces. Academic Press, London.
71. Jack,R.S., X.Fan, M.Bernheiden, G.Rune, M.Ehlers, A.Weber, G.Kirsch, R.Mentel, B.Fürli, M.Freudenberg, G.Schmitz, F.Stelter, and C.Schütt. 1997. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature* 389:742-745.
72. Jacobson,K., E.D.Sheets, and R.Simon. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 270:1441-1442.
73. Janshoff,A., D.T.Bong, C.Steinem, J.E.Johnson, and M.R.Ghadiri. 1999. An animal virus-derived peptide switches membrane morphology: possible relevance to nodaviral transfection processes. *Biochemistry* 38:5328-5336.
74. Janshoff,A. and C.Steinem. 2001. Scanning force microscopy of artificial membranes. *ChemBiochem* 2:798-808.

75. Jarvis,S.P., A.Oral, T.P.Weihls, and J.B.Pethica. 1993. A novel force microscope and point contact probe. *Rev. Sci. Instrum.* 64:3515-3520.
76. Jass,J., T.Tjarnhage, and G.Puu. 2000. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* 79:3153-3163.
77. Jürgens,G., M.Müller, M.H.J.Koch, and K.Brandenburg. 2001. Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A. Physicochemical characterization and biological activity. *Eur. J. Biochem.* 268:4233-4242.
78. Kassing,R. and E.Oesterschulze. 1997. Sensors for scanning probe microscopy. *In* Micro/Nanotribology and Its Applications. B.Bushan, editor. Kluwer,Dordrecht, 35-54.
79. Khan,S.A., P.Everest, S.Servos, N.Foxwell, U.Zaehringer, H.Brade, E.T.Rietschel, G.Dougan, I.G.Charles, and D.J.Maskell. 1998. A lethal role for lipid A in Salmonella infections. *Mol. Microbiol* 29:571-579.
80. Kirkland,T.N., F.Finley, D.Leturcq, A.Moriarty, J.-D.Lee, R.J.Ulevitch, and P.S.Tobias. 1993. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. *J. Biol. Chem.* 268:24818-24823.
81. Kirschning,C., A.Unbehaun, N.Lamping, D.Pfeil, F.Herrmann, and R.R.Schumann. 1997. Control of transcriptional activation of the lipopolysaccharide binding protein (LBP) gene by proinflammatory cytokines [published erratum appears in Cytokines Cell Mol Ther 1997 Jun;3(2):137]. *Cytokines Cell Mol. Ther.* 3:59-62.
82. Kirschning,C.J., H.Wesche, M.Ayers, and M.Rothe. 1999. Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial LPS. *J. Exp. Med* 188:2091-2097.
83. Kröner,E.E., B.A.Peskar, H.Fischer, and E.Ferber. 1981. Control of arachidonic acid accumulation in bone marrow-derived macrophages by acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 256:3690-3697.
84. Lakowicz,J.R. 1998. Introduction to fluorescence. *In* Principles of fluorescence spectroscopy. J.R.Lakowicz, editor. Plenum Press, New York.
85. Lamping,N., R.Dettmer, N.W.J.Schroeder, D.Pfeil, W.Hallatschek, R.Burger, and R.R.Schumann. 1998. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J. Clin. Invest.* 101:2065-2071.
86. Langmuir,I. and V.J.Schäfer. 1938. Activities of urease and pepsin monolayers. *J. Am Chem. Soc.* 60:1351-1360.

87. Lee,A.G. 1977. Lipid phase transitions and phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* 472:237-344.
88. Lee,A.G. 1978. Calculation of phase diagrams for non ideal mixtures of lipids and a possible non random distribution of lipids of lipid mixtures in the liquid crystalline phase. *Biochim. Biophys. Acta* 507:433-444.
89. Li,Y.Q., N.J.Tao, J.Pan, A.A.Garcia, and S.M.Lindsay. 1993. Direct measurement of interaction forces between colloidal particles using the scanning force microscope. *Langmuir* 9:637-641.
90. Lipowsky,R. and U.Seifert. 1991. Adhesion of Vesicles and membranes. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 202:17-25.
91. Loppnow,H. 1994. LPS, recIL1 and smooth muscle cell-IL1 activate vascular cells by specific mechanisms. In *Bacterial Endotoxins: Basic Science to Anti-Sepsis Strategies*. J.Levin, S.J.H.van Deventer, T.van der Poll, and A.Sturk, editors. Wiley-Liss, New York. 309-21.
92. Magonov,S.N., V.Elings, and M.H.Whangbo. 1997. Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. *Surface Science* 375:L385-L391.
93. Marcelja,S. 1974. Chain ordering in liquid crystals. II. Structure of bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 367:165-176.
94. Marszalek,P.E., H.Lu, H.Li, M.Carrion-Vazquez, A.F.Oberhauser, K.Schulten, and J.M.Fernandez. 1999. Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature* 402:100-103.
95. Marti,O., J.Colchero, and J.Mlynek. 1990. Combined scanning force and friction microscopy of mica. *Nanotechnology* 1:141-144.
96. Martin,Y., C.C.Williams, and H.K.Wickramasinghe. 1987. Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *J. Appl. Phys.* 61:4723-4729.
97. Mate,C.M. 1992. Atomic-force-microscope study of polymer lubricants on silicon surfaces. *Phys. Rev. Lett.* 68:3323-3326.
98. Mate,C.M., G.M.McClelland, R.Erlandsson, and S.Chiang. 1987. Atomic-scale friction of a tungsten tip on a graphite surface. *Phys. Rev. Lett.* 59:1942-1945.
99. Mattern,T., A.Thanhäuser, N.Reiling, K.-M.Toellner, M.Duchrow, S.Kusumoto, E.T.Rietschel, M.Ernst, H.Brade, H.-D.Flad, and A.J.Ulmer. 1994. Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J. Immunol.* 153:2996-3004.

100. Meyer,E. 1992. Atomic force microscopy. *Surface Science* 41:3-49.
101. Meyer,G. and N.M.Amer. 1988. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 53:1045-1047.
102. Meyer,G. and N.M.Amer. 1990a. Optical-beam deflection atomic force microscopy: The NaCl(001) surface. *Appl. Phys. Lett.* 56:2100-2101.
103. Meyer,G. and N.M.Amer. 1990b. Simultaneous measurement of lateral and normal forces with an optical-beam-deflection atomic force microscope. *Appl. Phys. Lett.* 57:2089-2091.
104. Morrisett,J.D., H.J.Pownall, R.T.Plumlee, L.C.Smith, L.C.Smith, Z.E.Zehner, M.Esfahani, and S.J.Wakil. 1975. Multiple thermotropic phase transitions in Escherichia coli membranes and membrane lipids. A comparison of results obtained by nitroxyl stearate paramagnetic resonance, pyrene excimer fluorescence, and enzyme activity measurements. *J. Biol. Chem* 250:6969-6976.
105. Mou,J., D.M.Czajkowsky, and Z.Shao. 1996. Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 35:3222-3226.
106. Mouritsen,O.G. 1991. Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* 57:179-194.
107. Mueller,H., H.J.Butt, and E.Bamberg. 1999. Force measurements on myelin basic protein adsorbed to mica and lipid bilayer surfaces done with the atomic force microscope. *Biophys. J.* 76:1072-1079.
108. Neubauer,G., S.R.Coben, G.M.McClelland, and C.M.Mate. 1990. Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor. *Rev. Sci. Instrum.* 61:2296-2308.
109. Nikaido,H. and M.Vaara. 1987. Outer membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. C.Neidhardt, J.L.Ingraham, K.Brooks Low, B.Magasnaik, M.Schaechter, and H.E.Umbarger, editors. American Society for Microbiology, Washington, DC. 7-22.
110. Nollert,P., H.Kiefer, and F.Jähnig. 1995. Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces. *Biophys. J.* 69:1447-1455.
111. Oikawa,M., A.Wada, H.Yoshizaki, K.Fukase, and S.Kusumoto. 1997. New efficient synthesis of a biosynthetic precursor of lipid A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 70:1435-1440.
112. Otten,H., M.Plempel, and W.Siegenthaler. 1975. Antibiotika-Fibel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

113. Pedersen,S., K.Jorgensen, T.R.Baekmark, and O.G.Mouritsen. 1996. Indirect evidence for lipid-domain formation in the transition region of phospholipid bilayers by two-probe fluorescence energy transfer. *Biophys. J.* 71:554-560.
114. Petty,M.C. 1996. Langmuir-Blodgett films: an introduction. Cambridge University Press, Cambridge.
115. Pfeiffer,R. 1892. Untersuchungen über das Cholera Gift. *Zf. f. Hygiene* 11:393-412.
116. Pottel,H., W.Van Der Meer, and W.Herreman. 1983. Correlation between the order parameter and the steady-state fluorescence anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and an evaluation of membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta Bio-Membr.* 730:181-186.
117. Puu,G. and I.Gustafson. 1997. Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes - factors of importance for kinetics and stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1327:149-161.
118. Raab,A., W.Han, D.Badt, S.Smith-Gill, S.M.Lindsay, H.Schindler, and P.Hinterdorfer. 1999. Antibody recognition imaging by force microscopy. *N. Biotech.* 17:902-905.
119. Rabinovich,Ya.I. and R.H.Yoon. 1994. Use of atomic force microscope for the measurements of hydrophobic forces between silanated silica plate and glass sphere. *Langmuir* 10:1903-1909.
120. Ramadori,G., Meyer zum Buschenfelde K.H., P.S.Tobias, J.C.Mathison, and R.J.Ulevitch. 1990. Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology* 58:89-94.
121. Reviakine,I. and A.Brisson. 2000. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 16:1806-1815.
122. Rief,M., M.Gautel, F.Oesterhelt, J.M.Fernandez, and H.E.Gaub. 1997. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276:1109-1112.
123. Rietschel,E.T., L.Brade, K.Brandenburg, H.-D.Flad, J.de Jong-Leuveninck, K.Kawahara, B.Lindner, H.Loppnow, T.Lüderitz, U.Schade, U.Seydel, S.Sidorzyk, A.Tacke, U.Zähringer, and H.Brade. 1987. Chemical structure and biological activity of bacterial and synthetic lipid A. *Rev. Infect. Dis.* 9, Suppl. 5:527-536.
124. Rinia,H.A. and B.de Kruijff. 2001. Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 504:194-199.

125. Rinia,H.A., R.A.Kik, R.A.Demel, M.M.Snel, J.A.Killian, J.P.Der Eerden, and B.de Kruijff. 2000. Visualization of highly ordered striated domains induced by transmembrane peptides in supported phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 39:5852-5858.
126. Rothe,G.M. and W.D.Maurer. 1986. One-dimensional PAA-gel electrophoretic techniques to separate functional an denaturated proteins. *In* Gel electrophoresis of proteins. M.J.Dunn, editor. IOP Publishing, Bristol.
127. Ruano,M.L., K.Nag, L.A.Worthman, C.Casals, J.Perez-Gil, and K.M.Keough. 1998. Differential partitioning of pulmonary surfactant protein SP-A into regions of monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine/dipalmitoylphosphatidylglycerol. *Biophys. J.* 74:1101-1109.
128. Sader,J.E. 2002. Calibration of atomic force microscope cantilevers. *In* Encyclopedia of surfaces and colloid science. Marcel Dekker, Inc., New York. 846-56.
129. Sader,J.E., J.W.M.Chon, and P.Mulvaney. 1999. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.* 70:3967-3969.
130. Sader,J.E., I.Larson, P.Mulvaney, and L.R.White. 1995. Method for calibrating of atomic force microscope cantilevers. *Appl. Phys.* 66:3789-3798.
131. Sarid,D. and V.Elings. 1991. Review of scanning force microscopy. *J. Vac. Sci. Technol. B* 9:431-437.
132. Sarid,D., D.Iams, V.Weissenberger, and S.L.Bell. 1988. Compact scanning-force microscope using laser diode. *Opt. Lett.* 13:1057-1059.
133. Schibli,D.J., H.N.Hunter, V.Aseyev, T.D.Starner, J.M.Wiencek, P.B.J.McCray, B.F.Tack, and H.J.Vogel. 2002. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of bd3 against staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* 277:8279-8289.
134. Schoenenberger,C. and S.F.Alvarado. 1989. A differential interferometer for force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 60:3131-3135.
135. Schoenenberger,C. and S.F.Alvarado. 1990. Understanding magnetic force microscopy. *Z. Phys. B* 80:373-383.
136. Schröder,G., K.Brandenburg, and U.Seydel. 1992. Polymyxin B induces transient permeability fluctuations in asymmetric planar lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry* 31:631-638.

137. Schromm,A.B., K.Brandenburg, H.Loppnow, A.P.Moran, M.H.Koch, E.T.Rietschel, and U.Seydel. 2000. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* 267:2008-2013.
138. Schromm,A.B., K.Brandenburg, E.Th.Rietschel, H.-D.Flad, S.F.Carroll, and U.Seydel. 1996. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett.* 399:267-271.
139. Schumann,R.R., S.R.Leong, G.W.Flaggs, P.W.Gray, S.D.Wright, J.C.Mathison, P.S.Tobias, and R.J.Ulevitch. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431.
140. Schütz,G.J., H.Schindler, and T.Schmidt. 1997. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys. J.* 73:1073-1080.
141. Seifert,U. 1997. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Ad. Phys.* 46:13-137.
142. Senden,T.J. and W.A.Ducker. 1994. Experimental determination of spring constants in atomic force microscopy. *Langmuir* 10:1003-1004.
143. Seydel,U., M.Oikawa, K.Fukase, S.Kusumoto, and K.Brandenburg. 2000. Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur. J. Biochem.* 267:3032-3039.
144. Simons,K. and E.Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
145. Stahl,U., YuanC.W., A.L.Delozanne, and M.Tortonese. 1994. Atomic force microscope using piezoresistive cantilevers and combined with a scanning electron microscope. *Appl. Phys. Lett.* 65:2878-2880.
146. Takayama,K., D.H.Mitchell, Z.Z.Din, P.Mukerjee, C.Li, and D.L.Coleman. 1994. Monomeric Re lipopolysaccharide from *Escherichia coli* is more active than the aggregated form in the *Limulus* ameocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 269:2241-2244.
147. Tobias,P.S., J.Mathison, D.Mintz, J.D.Lee, V.Kravchenko, K.Kato, J.Pugin, and R.J.Ulevitch. 1992. Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:239-245.
148. Tobias,P.S., J.C.Mathison, and R.J.Ulevitch. 1988. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J. Biol. Chem.* 263:13479-13481.

149. Tobias,P.S., K.Soldau, and R.J.Ulevitch. 1986. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164:777-793.
150. Tobias,P.S., K.Soldau, and R.J.Ulevitch. 1989. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J. Biol. Chem* 264:10867-10871.
151. Torii,A., M.Sasaki, K.Hane, and S.A.Okuma. 1996. A method for determining the spring constant of cantilevers for atomic force microscopy. *Meas. Sci. Technol.* 7:179-184.
152. Tortonese,M. and M.Kirk. 1997. Characterization of application specific probes for SPMs. *Proc. SPIE* 3009:53-60.
153. Ulevitch,R.J. and P.S.Tobias. 1999. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 11:19-22.
154. Vaara,M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56:395-411.
155. Van Blitterswijk,W.J., R.P.Van Hoeven, and B.W.Van der Meer. 1981. Lipid structural order parameter (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarisation measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 644:323-332.
156. Velluz,L., M.Legrand, and M.Grosjean. 1965. Optical circular dichroism principles, measurements and applications. Academic press, New York.
157. Vinckier,A. and G.Semenza. 1998. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 430:12-16.
158. Vogel,S.N. and M.M.Hogan. 1990. Role of cytokines in endotoxin-mediated host response. *In* The Role of Cells and Cytokines in Immunity and Inflammation. J.J.Oppenheim and E.M.Shevach, editors. Oxford University Press, New York. 238-58.
159. von Tscherner,V. and H.M.McConnell. 1981. An alternative view of phospholipid phase behavior at the air-water interface. Microscope and film balance studies. *Biophys. J.* 36:409-419.
160. Vreugdenhil,A.C., M.A.Dentener, A.M.Snoek, J.W.Greve, and W.A.Buurman. 1999. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J. Immunol.* 163:2792-2798.

161. Walters,D.A., J.P.Cleveland, N.H.Thomson, P.K.Hansma, M.A.Wendman, G.Gurley, and V.Elings. 1996. Short cantilevers for atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 67:3583-3590.
162. Weis,R.M. 1991. Fluorescence microscopy of phospholipid monolayer phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* 57:227-239.
163. Wiese,A., K.Brandenburg, B.Lindner, A.B.Schromm, S.F.Carroll, E.Th.Rietschel, and U.Seydel. 1997. Mechanisms of action of the bactericidal/permeability-increasing protein BPI on endotoxin and phospholipid monolayers and aggregates. *Biochemistry* 36:10301-10310.
164. Wiese,A., T.Gutsmann, and U.Seydel. 2003. Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of the interaction between antibacterial peptides and model membranes. *J. Endotox. Res.* 9:67-84.
165. Wiese,A., M.Münstermann, T.Gutsmann, B.Lindner, K.Kawahara, U.Zähringer, and U.Seydel. 1998. Molecular mechanisms of Polymyxin B-membrane interactions: direct correlation between surface charge density and self-promoted uptake. *J. Membr. Biol.* 162:127-138.
166. Wright,S.D., R.A.Ramos, P.S.Tobias, R.J.Ulevitch, and J.C.Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
167. Wurfel,M.M., B.G.Monks, R.R.Ingalls, R.L.Dedrick, R.Delude, D.Zhou, N.Lamping, R.R.Schumann, R.Thieringer, M.J.Fenton, S.D.Wright, and D.Golenbock. 1997. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact. *J. Exp. Med.* 186:2051-2056.
168. Yang,R.B., M.R.Mark, A.Gray, A.Huang, M.H.Xie, M.Zhang, A.Goddard, W.I.Wood, A.L.Gurney, and P.J.Godowski. 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* 395:284-288.
169. Yuan,C. and L.J.Johnston. 2002. Phase evolution in cholesterol/DPPC monolayers: atomic force microscopy and near field scanning optical microscopy studies. *J. Microsc.* 205:136-146.
170. Zähringer,U., B.Lindner, and E.T.Rietschel. 1994. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 50:211-276.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an einer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, den

.....

Lebenslauf

Name		Roes, Stefanie
Anschrift		Parkallee 26 23845 Borstel
Geboren	17. Juli 1977	in Bad Oldesloe
Familienstand		ledig
Staatsangehörigkeit		deutsch
Hochschul- ausbildung	Seit Mai 2001	Promotion am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissen- schaften, Abteilung für Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie, Laborgruppe Biophysik
	Oktober 1996 - April 2001 (9 Semester)	Studium der Physik an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel, Abschluss mit Diplom Prüfungsfächer: Theoretische Physik, Geophysik, Biophysik, Atomphysik Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr Seydel (Forschungszentrum Borstel): Patch-Clamp Messungen an einem Ionenkanal nach Rekonstitution in einer Zelllinie: Etablierung eines definierten Meßsystems
Schulbildung	1987-1996	Gymnasium Elmschenhagen in Kiel
	1983-1987	Theodor-Möller Grundschule in Kiel

Danksagung

Als erstes gilt mein besonderer Dank **Herrn Prof. Dr. U. Seydel**, Leiter der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel, für die interessante Themenstellung und die Promotionsstelle. Er konnte mir bei vielen wissenschaftlichen Problemen hilfreich zur Seite stehen und so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Herrn Prof. Dr. E. Th. Rietschel, Direktor des Institutsbereichs Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie am Forschungszentrum Borstel, danke ich für die finanzielle Ermöglichung dieser Arbeit.

Bei **Herrn Dr. Thomas Gutschmann** möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders für die hervorragende fachliche Unterstützung, die hilfreichen und v.a. konstruktiven Diskussionen und natürlich für die außerordentlich gute Betreuung bedanken.

Vielen herzlichen Dank an **Herrn Dr. Stefan Vinzelberg**, der mir speziell in der Anfangszeit mit dem MFP-Prototypen eine große Hilfe gewesen ist.

Many thanks to **Mr. Jason Cleveland** and for the helpful discussion concerning the attractive and repulsive mode.

Very special thanks to **Mr. Clint Callahan**. He taught me how to make afm images and how to deal with old Cantilevers.

I would also like to thank **Miss Signe Danielsen**, who provided me with “attaching stuff to cantilevers”-informations. Furthermore, she makes the best omeletes in Norway.

Für das freundliche Überlassen seiner AFM-Bakterienbilder danke ich **Herrn cand. Dipl. Phys. Arne Böhling**.

Herrn PD Dr. Joachim Grötzinger sei zum einen dafür gedankt, dass es möglich gewesen ist, die CD-Spektroskopie-Messungen in der Arbeitsgruppe Biochemie an der Christian-

Albrechts-Universität durchzuführen und zum anderen für die hilfreiche Diskussion der Messergebnisse.

Für die Bereitstellung des rekombinanten LBP danke ich **Mr. Steve F. Carroll** von der Firma Xoma Corp. (Berkeley, USA).

Der **gesamten Biophysik-Laborgruppe** danke ich für das gute Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Hierzu gehört auch **Frau Christine Hamann**, der hiermit ganz herzlich für die Polarisationsmessungen und die vielen Bemühungen mit den FRET-Messungen gedankt sei.

Bei **Frau Helga Lüthje** möchte ich mich für die Extraktion und massenspektroskopische Charakterisierung von Endotoxin bedanken.

Herrn PD Dr. Klaus Brandenburg danke ich für die schnelle Mitteilung vieler Informationen, nach denen man sonst Tage gesucht hätte.

Ganz besonders bedanke ich mich auch bei **Herrn Dr. Sven-Olaf Hagge** und **Herrn Dipl. Chem. Alexander H. David** für ihre ständige Bereitschaft zu wertvollen Diskussionen.

Frau Dr. Mareike Müller danke ich für die Durchsicht des Literaturverzeichnisses und nicht nur für die unterhaltsamen Stunden im Labor.

Frau Maren Lohs gebührt vielen Dank für die Anfertigung der schönen Zeichnungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken, die mich nicht nur während der Studienzeit immer unterstützt, sondern das Studium überhaupt ermöglicht haben.

Besonders lieb war mir die verständnisvolle Hilfe von **Thomas** während der letzten drei Jahre und ganz besonders während der letzten Monate dieser Arbeit.