

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

**Charakterisierung der Eigenschaften rekonstituierter
planarer Membranen und deren Änderung
durch porenbildende Proteine mit Hilfe von
elektrischen und optischen Methoden**

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

vorgelegt von
Sven-Olaf Hagge

Kiel
2003

Referent: Prof. Dr. Ulrich Seydel

Koreferent: Prof. Dr. Ulf-Peter Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 2004

Zum Druck genehmigt: Kiel, den.....

.....

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>i</i>
<i>Abkürzungen</i>	<i>iv</i>
<i>Symbole</i>	<i>vi</i>
<i>Konstanten</i>	<i>vii</i>
<i>Kurzdarstellung</i>	<i>viii</i>
<i>Abstract</i>	<i>ix</i>
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Biologische und biochemische Grundlagen von Lipidmembranen und Membranlipiden	4
2.1. Aufbau der Zellhülle	4
2.1.1. Die bakterielle Zellhülle	5
2.1.2. Die Membran der eukaryotischen Zelle	7
2.2. Chemische Struktur von Membranlipiden	7
2.2.1. Glycerophospholipide	7
2.2.2. Sphingophospholipide	9
2.2.3. Lipopolysaccharide	9
2.2.4. Cholesterol	11
3. Elektrische und physikochemische Eigenschaften von Membranen	13
3.1. Elektrisches Ersatzschaltbild der Membran	13
3.2. Membranpotentiale	14
3.2.1. Gouy-Chapman-Potential	15
3.2.2. Dipol-Potential	17
3.2.3. Born-Potential	18
3.2.4. Das Trapezkurvenmodell nach Schoch	19
3.2.5. Transmembranpotentiale	20
3.3. Fluidität der Lipidmatrix	21
4. Methoden	24

4.1. Präparation planarer Lipiddoppelschichten	24
4.1.1. Membranpräparation nach der Methode von Montal und Mueller	24
4.1.2. Mechanischer Aufbau	26
4.1.3. Durchführung der Membranpräparation	27
4.2. Elektronischer Aufbau	28
4.3. Messung der Membrankapazität	30
4.3.1. Bestimmung der Membrankapazität nach der Spannungssprungmethode	31
4.3.2. Bestimmung der Membrankapazität aus der Stromantwort auf eine sinusförmige Wechselspannung	32
4.4. Messung der intrinsischen Membranpotentialdifferenz	32
4.4.1. Die Carrier-Transport-Methode	32
4.4.2. Die Inner Field-Compensation Methode	34
4.5. Aufbau für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten	35
5. Einfluß der Glycostruktur von Lipopolysacchariden auf die Porenbildung durch Porine	39
5.1. Struktur und Eigenschaften von Porinen	40
5.2. Verwendete Materialien	41
5.3. Ergebnisse	43
5.3.1. Porenbildung von Phosphoporin PhoE von <i>Escherichia coli</i>	43
5.3.2. Einfluß der Lipidmatrix auf die Porengröße	44
5.3.3. Einfluß der Glycostruktur von Lipopolysacchariden auf den Einbau von Porinen in die äußere Membran Gram-negativer Bakterien	46
5.3.4. Einfluß der Glycostruktur von Lipopolysacchariden auf das Schaltverhalten von Porinen in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien	49
5.4. Diskussion	54
6. Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ asymmetrischer Lipiddoppelschichten	60
6.1. Verwendete Materialien	61
6.2. Ergebnisse und Diskussion	61

7. Wechselwirkung polykationischer antimikrobieller Peptide mit asymmetrischen planaren Membranen	67
7.1. Kathelizidine	67
7.2. Defensine	69
7.3. Verwendete Materialien	70
7.4. Ergebnisse	71
7.4.1. rCAP18 ₁₀₆₋₁₃₇	71
7.4.2. hBD-3	74
7.5. Diskussion	75
8. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten	78
8.1. Domänenbildung	78
8.2. Verwendete Materialien	80
8.3. Ergebnisse	80
8.3.1. Untersuchung an asymmetrischen LPS/PL Doppelschichten	80
8.3.2. Untersuchungen an symmetrischen Phospholipiddoppelschichten	84
8.4. Diskussion	86
9. Zusammenfassung und Ausblick	90
10. Literaturverzeichnis	94
Eidesstattliche Erklärung	104
Lebenslauf	105
Danksagung	106

Abkürzungen

Lipide und Lipidbestandteile

Chol	Cholesterol
DOPC	Dioleoyl-Phosphatidylcholin
DPG	Diphosphatidylglycerol
DPhyPC	Diphytanoyl-Phosphatidylcholin
Kdo	2-Keto-3-deoxyoktonat
L-Arap4N	4-Amino-4-deoxy-L-arabino-pentopyranose
LPS	Lipopolysaccharid
PE	Phosphatidylethanolamin
NBD-PE	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol markiertes PE
PG	Phosphatidylglycerol
PL	Phospholipidgemisch, das in seiner Zusammensetzung der Innenseite der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien entspricht
PS	Phosphatidylserin
SM	Sphingomyelin

Peptide/Proteine

CAP18	kationisches antimikrobielles Peptide/Protein 18 kDa
hBD-3	humanes β -Defensin-3
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
PhoE	Phosphoporin von <i>Escherichia coli</i>
rCAP18	CAP18 vom Kaninchen (rabbit)

Methoden

FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FTIR	Fourier-Transform Infrarot
IFC	Inner Field-Compensation

Sonstige

MDO Membrane-derived oligosaccharides

Bakterienpezies

E. coli *Escherichia coli*

P. denitrificans *Paracoccus denitrificans*

P. mirabilis *Proteus mirabilis*

S. minnesota *Salmonella enterica* serovar Minnesota

S. paucimobilis *Sphingomonas paucimobilis*

S. typhimurium *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Symbole

A	Fläche
c	Konzentration
C	Kapazität
d	Abstand
f	Frequenz
I	Strom
l_d	Debye-Hückel-Länge
M_r	relative Molmasse
Q	Ladung
R	Widerstand
t	Zeit
T	Temperatur
U, V	Spannung
z	Ionenwertigkeit
ϵ	relative Dielektrizitätskonstante
$\Delta\Phi, \Delta\Psi$	Membranpotentialdifferenzen
σ	Oberflächenladungsdichte, Leitfähigkeit
Λ	Einzelkanalleitfähigkeit

Konstanten

$$e_0 = 1,6021 \cdot 10^{-19} \text{ C}$$

Elektrische Elementarladung

$$F = 9,6487 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Faraday-Konstante

$$k = 1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$$

Boltzmann-Konstante

$$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

Avogadro-Konstante

$$R = 8,3166 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$$

Gaskonstante

$$\epsilon_0 = 8,55 \cdot 10^{-12} \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$$

Elektrische Feldkonstante

Kurzdarstellung

Die Lipidmatrix der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ist eine asymmetrische Lipiddoppelschicht mit Phospholipiden auf der Innen- und Lipopolysacchariden (LPS) auf der Außenseite. In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe elektrischer und optischer Untersuchungen an einem planaren Rekonstitutionssystem für diese Membran gezeigt, welchen Einfluß die Zusammensetzung der Lipidmatrix auf Eigenschaften und unterschiedliche Funktionen der Membran – zum einen als Trägermatrix für bakterielle Membranproteine und zum anderen als Barriere für antimikrobielle Peptide der Immunabwehr des Wirts – hat. Im Mittelpunkt stand dabei stets die Rolle des LPS, insbesondere dessen Zuckerstruktur und effektive negative Ladung.

Am Beispiel des Phosphoporins von *Escherichia coli*, einem bakteriellen Membranprotein, konnte nachgewiesen werden, daß insbesondere die Struktur des Zuckerteils von LPS einen starken Einfluß auf die Porenbildung durch Porine hat, wobei die Porenbildungsrate mit länger werdendem Zuckerteil des LPS steigt. Des weiteren konnte für ein kationisches antimikrobielles Peptid aus der Familie der Kathelizidine gezeigt werden, daß eine Reduzierung der effektiven negativen Ladung des LPS durch positiv geladene Zuckergruppen zu einer verringerten elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Peptid und dem LPS und somit zu einer Reduktion der An- bzw. Einlagerung des Peptids führt. Durch diesen Mechanismus wird eine Lipidvermittelte Resistenz beschrieben. Erste fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an dem Rekonstitutionsmodell der äußeren Membran ergaben bemerkenswerte Befunde: Domänen, die in der LPS-Monoschicht deutlich erkennbar waren, wurden durch die Anlagerung der Phospholipidgegenseite aufgelöst. Dieses Ergebnis demonstriert, daß zwischen den beiden Monoschichten der Lipiddoppelschicht eine starke Wechselwirkung besteht.

Abstract

The lipid matrix of the outer membrane of Gram-negative bacteria is an asymmetric bilayer composed of a phospholipid inner leaflet and a lipopolysaccharide (LPS) outer leaflet. In the present study, electrical and optical measurements on a planar reconstitution system of these membranes were performed to show the influence of the composition of the lipidmatrix on properties and functions of the membrane – on the one hand as a matrix, in which bacterial membrane proteins are embedded, and on the other hand as a barrier for antimicrobial peptides of the immune system of the host. The focus was mainly directed on the role of LPS, in particular the structure of its sugar moiety and its net negative charge.

It could be shown exemplarily for the phosphoporin from *Echerichia coli* that LPS – in particular the structure of the sugar moiety – has a strong influence on the pore formation by porins. In general, the pore formation rate increased with increasing length of the sugar moiety of LPS. Furthermore, it could be shown for a cationic antimicrobial peptide of the cathelicidin family that a reduction of the net negative charge of LPS by positively charged sugar groups leads to a decrease of the electrostatic interaction between the peptide and LPS and, thus, causing a reduction of the accumulation and/or intercalation of the peptide. A very remarkable result was obtained from first fluorescence microscopic experiments on the reconstitution system of the outer membrane: domains, which were clearly visible in the LPS-monolayer, disappear after adding the opposing phospholipid-monolayer, indicating a strong interaction between both side of the lipid bilayer.

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien besteht aus einer inneren Membran mit vorgelagerter Peptidoglycanschicht, die von einer weiteren, der äußeren Membran, umschlossen sind. Während die innere Membran aus einem Gemisch unterschiedlicher Phospholipide aufgebaut ist, ist das Hauptmerkmal der äußeren Membran ihre Asymmetrie: lediglich die Innenseite besteht aus Phospholipiden, die Außenseite wird von einem Glycolipid, in der Regel einem Lipopolysaccharid (LPS), gebildet. LPS besteht aus einem Membrananker, dem Lipid A, und einem Zuckerteil variabler Länge. LPS hat somit als Bestandteil der äußeren bakteriellen Membran eine **Funktion** im Sinne einer Erhöhung der Barriereigenschaften der Membran und ist Angriffsort für Peptide des Immunsystems des Wirts und für antimikrobielle Wirkstoffe. Gleichzeitig hat LPS aber auch eine biologische **Wirkung**. Gelangen Bakterien in die Blutbahn des Wirts und freigesetztes LPS interagiert mit den Immunzellen, kann es diese zur Produktion und Ausschüttung von sogenannten proinflammatorischen Zytokinen aktivieren. Dies steht am Anfang der Gram-negativen Sepsis (Blutvergiftung), die auch heute noch eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen darstellt.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe elektrischer und optischer Untersuchungen an einem Rekonstitutionssystem der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zur Beschreibung der **Funktion** beigetragen werden. Dabei wurde die Membran auf ihre Hauptkomponente, nämlich die Lipidmatrix, reduziert. Als sehr leistungsfähiges Modellsystem haben sich planare Membranen herausgestellt, die aus zwei unabhängig voneinander präparierten Lipidmonoschichten dargestellt werden. Nur diese Methode eröffnet die Möglichkeit, Messungen an asymmetrischen planaren Membranen durchzuführen. Sie kommt somit dem natürlichen System deutlich näher als es beispielsweise bei Untersuchungen an Lipidvesikeln, die bislang nicht gezielt asymmetrisch hergestellt werden können, oder Lipidmonoschichten, die nur eine der beiden Lipidschichten darstellen, der Fall ist.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war das in der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel bereits seit einigen Jahren etablierte Rekonstitutionssystem der planaren Lipiddoppelschichten. Dieses System sollte weiterentwickelt und um zusätzliche Meßparameter erweitert werden, um die Möglichkeit zu schaffen, eigene biologische Fragestellungen zu beantworten und

gleichzeitig die meßtechnischen Grundlagen für eine Vielzahl weiterer Untersuchungen zu schaffen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Rolle der Lipidmatrix für die Ausbildung von Poren durch bakterielle Membranproteine, die Porine, untersucht. Porine bilden in der äußeren Membran wassergefüllte Kanäle und erlauben somit den Transport von Molekülen bis zu einer relativen Molmasse von ca. 600 Da. Im Zentrum des Interesses stand insbesondere der Einfluß des LPS-Zuckerteils. In der Literatur werden eine Vielzahl von Prozessen in der Porinbiogenese beschrieben, die durch die Anwesenheit von LPS beeinflusst bzw. deutlich begünstigt werden. Zudem wird beschrieben, daß Porine bei Bakterien, die LPS mit einem kurzen Zuckerteil exprimieren, in geringerer Anzahl in der äußeren Membran vorliegen als bei solchen Bakterien, die LPS mit einem langen Zuckerteil exprimieren. Zur Klärung der Frage, ob die LPS-Zuckerstruktur einen wesentlichen Einfluß auf die Biogenese der Porinkanäle hat, wurde die Änderung der Porin-induzierten Leitfähigkeit planarer Lipiddoppelschichten in Abhängigkeit von der Länge des Zuckerteils des LPS untersucht.

Die äußere bakterielle Membran hat zudem eine wichtige **Funktion** als Barriere gegen antimikrobielle Substanzen. Es gibt verschiedene Hinweise aus der Literatur, daß auch hier die Zuckerstruktur und insbesondere die negative Ladung der Lipide bei der Wechselwirkung mit positiv geladenen Peptiden/Proteinen eine wichtige Rolle bei der Permeabilisierung der Membran spielt. Hier sollte beispielhaft für zwei prominente Vertreter der Klasse der antimikrobiellen Peptide, der Kathelizidine und der Defensine, durch die Messung der Peptid-induzierten Änderungen der Membrankapazität und der intrinsischen Membranpotentialdifferenz planarer Lipiddoppelschichten geklärt werden, welchen Einfluß die Lipidmatrix – insbesondere deren Ladung – auf die Wechselwirkung mit den Peptiden hat. Dies könnte zur Klärung der Mechanismen von lipidvermittelter Resistenzbildung beitragen.

Biologische Membranen bestehen aus einer Vielzahl (physiko)chemisch unterschiedlicher Lipide und Proteine, die sich nicht zwangsläufig homogen mischen. Vielmehr kommt es zur Ausbildung von Lipid- und auch Protein-Lipid-Domänen. Bekannt ist zum Beispiel die Ausbildung von Sphingomyelin- und Cholesterol-reichen Lipid-Rafts in eukaryotischen Zellen, deren Beteiligung an einer Vielzahl von biologischen Prozessen diskutiert wird. Uns interessierten in diesem Zusammenhang besonders Domänen unterschiedlicher Fluidität in LPS-Monoschichten und

asymmetrischen LPS/Phospholipid-Doppelschichten. Um diese Domänen sichtbar zu machen, wurde das System der planaren Membranen um einen fluoreszenzmikroskopischen Aufbau erweitert und fluoreszenzmarkierte Lipide in die Membran eingebracht. Dieses System wurde neu etabliert und erste Messungen durchgeführt.

2. Biologische und biochemische Grundlagen von Lipidmembranen und Membranlipiden

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die grundlegenden biologischen und biochemischen Grundlagen erläutert, die für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Im Mittelpunkt steht dabei der Aufbau der Zellhülle sowie die Eigenschaften und die Struktur der für diese Arbeit wichtigen Membranlipide. Der Schwerpunkt liegt dabei auf dem LPS, das auf Grund seiner chemischen Struktur und biophysikalischen Eigenschaften eine wichtige spezifische Erkennungsstruktur für antimikrobielle Peptide darstellt. Auf Struktur und Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Proteine/Peptide – sowohl Membranproteine als auch Peptide der humanen Immunabwehr – wird in den entsprechenden Kapiteln (5 und 7) näher eingegangen.

2.1. Aufbau der Zellhülle

Die kleinste Organisationseinheit des Lebens, die zu Stoffwechsel und Selbstreproduktion fähig ist, ist die Zelle. Generell unterscheidet man zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen. Während die eukaryotische Zelle zum einen von einer Zytoplasmamembran umgeben und zum anderen im Inneren durch Membranen in unterschiedliche funktionale Einheiten kompartimentiert ist, ist die prokaryotische Zelle lediglich von mindestens einer Membran umgeben und im Inneren nicht weiter kompartimentiert. Periphere und integrale Membranproteine gewährleisten – neben den passiven Transportprozessen – den Transport von Nährstoffen in das Innere der Zelle bzw. des Zellkompartiments, sowie den Abtransport von Abfallprodukten. Des weiteren dienen membrangebundene Proteine zur Weiterleitung von Signalen in die Zelle und zur Kommunikation von Zellen untereinander.

Obwohl die eine Zelle umschließende Membran quasi ihre größte Organelle darstellt, blieb Aufbau der Membran lange Zeit ungeklärt. Ein erstes Modell lieferten Groter und Grendel im Jahre 1925, ausgehend davon, daß die Membran eine kontinuierliche Kohlenwasserstoffphase enthält, die von den apolaren, hydrophoben Fettsäureketten der Membranlipide gebildet wird. Die hydrophilen, polaren

Kopfgruppen der Lipide zeigen dabei nach außen. Vervollständigt wurde dieses Modell im Jahre 1935 von Danielli und Davson, indem diese zusätzlich zu den Lipiden die Membranproteine in ihr Modell mit einbezogen. Dabei gingen sie davon aus, daß diese von beiden Seiten an die Membran angelagert sind. Ein gängiges Modell der Zellmembran stammt von Nicolson und Singer aus dem Jahre 1972. Es ist das sogenannte Fluid-Mosaic-Modell, das eine freie laterale Diffusion transmembraner und membranassoziierter Proteine in der flüssig-kristallinen Lipiddoppelschicht erlaubt.

2.1.1. Die bakterielle Zellhülle

Die bakterielle Zellhülle besteht im wesentlichen aus der Zytoplasmamembran und einer vorgelagerten Peptidoglycanschicht (Murein-Sacculus). Bei Gram-negativen Bakterien, z. B. *Escherichia coli* (*E. coli*), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) oder *Salmonella enterica* serovar Minnesota (*S. minnesota*), ist die Dicke der Peptidoglycanschicht deutlich geringer als bei Gram-positiven Bakterien, dafür besitzen sie aber eine zweite, der Peptidoglycanschicht vorgelagerte Membran (Abb. 1), die sich durch eine starke Asymmetrie in der Lipidzusammensetzung auszeichnet (Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Da in dieser Arbeit die Gram-negativen Bakterien im Vordergrund stehen, wird im folgenden auf eine detaillierte Beschreibung der Gram-positiven Zellhülle verzichtet.

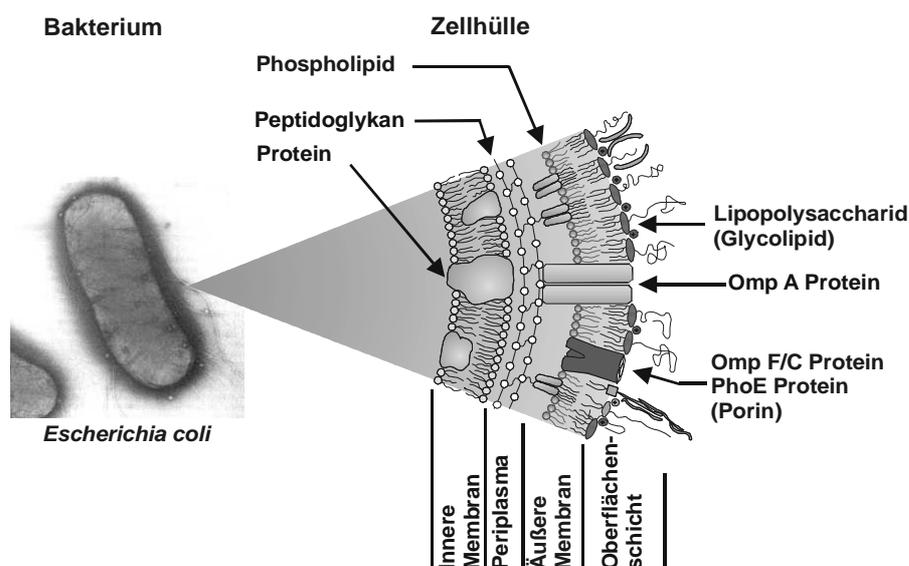


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Zellhülle Gram-negativer Bakterien.

2. Biologische und biochemische Grundlagen von Lipidmembranen und Membranlipiden

Die innere Membran Gram-negativer Bakterie besteht ebenso wie die Innenseite der äußeren Membran im wesentlichen aus den Phospholipiden (Kapitel 2.2.1) Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Diphosphatidylglycerol (DPG, auch Cardiolipin genannt). Im Fall der Gram-negativen Spezies *Salmonella enterica* serovar Typhimurium liegen diese Lipide in einem molaren Mischungsverhältnis von PE:PG:DPG = 81:17:2 vor (Osborn et al., 1972). Diese Phospholipidmischung (PL) wurde eingesetzt um die Lipidmatrix der Innenseite der äußeren Membran im planaren Rekonstitutionsmodell darzustellen (siehe auch Kapitel 4.1 und Wiese und Seydel, 2000).

Die Außenseite der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wird von Glycolipiden, in der Regel LPS (Nikaido und Vaara, 1985) (Kapitel 2.2.3) gebildet. In einigen Spezies, wie zum Beispiel im Falle von *Sphingomonas paucimobilis* kann es aber auch ein Glycosphingolipid (Kawahara et al., 1991) sein. Gelangen diese Bakterien durch Wunden oder durch Erkrankungen der inneren Organe in den Blutkreislauf, so kann das LPS beim Wachstum bzw. der Teilung oder durch den Einfluß der Immunabwehr des Wirtes bzw. den Einsatz von Antibiotika freigesetzt werden. Freigesetztes LPS stimuliert Zellen des Immunsystems – insbesondere mononukleäre Zellen wie Monozyten und Makrophagen – zur Produktion und Freisetzung von endogenen Mediatoren, die zum Krankheitsbild der bakteriellen Blutvergiftung (Sepsis) führen können. Trotz hoher hygienischer und medizinischer Standards ist auch in der heutigen Zeit in Europa und den USA die bakterielle Sepsis eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen. Etwa 40% aller an Sepsis erkrankten Patienten erleiden einen septischen Schock, der in etwa der Hälfte der Fälle zum Tode führt. Auf Grund dieser Eigenschaften wird LPS auch als Endotoxin bezeichnet. Die Minimalstruktur, die zum Krankheitsbild der Sepsis führt, ist das Lipid A. Daher wird dieses auch als „endotoxisches Prinzip“ des LPS bezeichnet. Bis dato sind viele Prozesse, die im Krankheitsbild der Sepsis eine Rolle spielen, noch unverstanden, aber auch die Wirkmechanismen von Substanzen, die als Therapeutika gegen die Sepsis wirken, sind nur in geringem Maße bekannt.

Eingelagert in diese äußere Membran sind unter anderem die sogenannten Porine (Kapitel 5.1). Sie haben die Aufgabe eines molekularen Siebes, das den Transport von Nährstoffen und Abfallprodukten durch die äußere Membran ermöglichen (Nikaido und Vaara, 1985).

2.1.2. Die Membran der eukaryotischen Zelle

Die Zellen höher entwickelter Lebewesen sind wesentlich stärker durch intrazelluläre Membransysteme kompartimentiert als Bakterienzellen. Membranen übernehmen somit auch innerhalb der Zelle eine Vielzahl wichtiger Funktionen. Die Zusammensetzung der Membran eukaryotischer Zellen spielt in dieser Arbeit lediglich für die Untersuchung zytotoxischer Effekte antimikrobieller Peptide eine Rolle. Es sollen daher hier nur einige wesentliche Grundlagen dargelegt werden.

Hauptbestandteil der Lipiddoppelschicht sind auch hier die Glycerophospholipide. Während das Vorkommen von PE und PG für die bakterielle Membran charakteristisch ist, sind in höheren Pflanzen und Tieren besonders PC und PE anzutreffen (Lehninger, 1983). Einen größeren Anteil am Gesamtlipidgehalt haben aber auch Sphingophospholipide (Kapitel 2.2.2), insbesondere das Sphingomyelin (SM). Der Anteil an Sphingomyelin beträgt je nach Zelltyp zwischen 2 und 15% des Gesamtlipidgehalts. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist das Cholesterol (Chol) (Kapitel 2.2.4), sein Anteil beträgt bis zu einem Viertel des Lipidgehalts.

Es muß erwähnt werden, daß auch die Membran eukaryotischer Zellen nicht symmetrisch aufgebaut ist. Für humane Erythrocyten konnte gezeigt werden, daß SM etwa 42% der Außenseite und nur 4% der Innenseite ausmacht. Ähnlich verhält es sich mit PC. Im Gegensatz dazu macht der Anteil an PE auf der Innenseite etwa 48% aus, während es auf der Außenseite nur zu 7% zu finden ist (Zachowski, 1993).

2.2. Chemische Struktur von Membranlipiden

2.2.1. Glycerophospholipide

Phospholipide sind – wie bereits erwähnt – die Grundbausteine der Lipidmatrix aller biologischen Membranen. Besonders häufig sind die Glycerophospholipide vertreten. Sie bestehen aus einem hydrophoben Fettsäureteil - in der Regel zwei an ein Glycerin veresterte Fettsäuren - und aus einer phosphathaltigen polaren Kopfgruppe (Darnell et al., 1986), die über eine Phosphodiesterbindung an den Glycerinrest gebunden ist (Abb. 2).

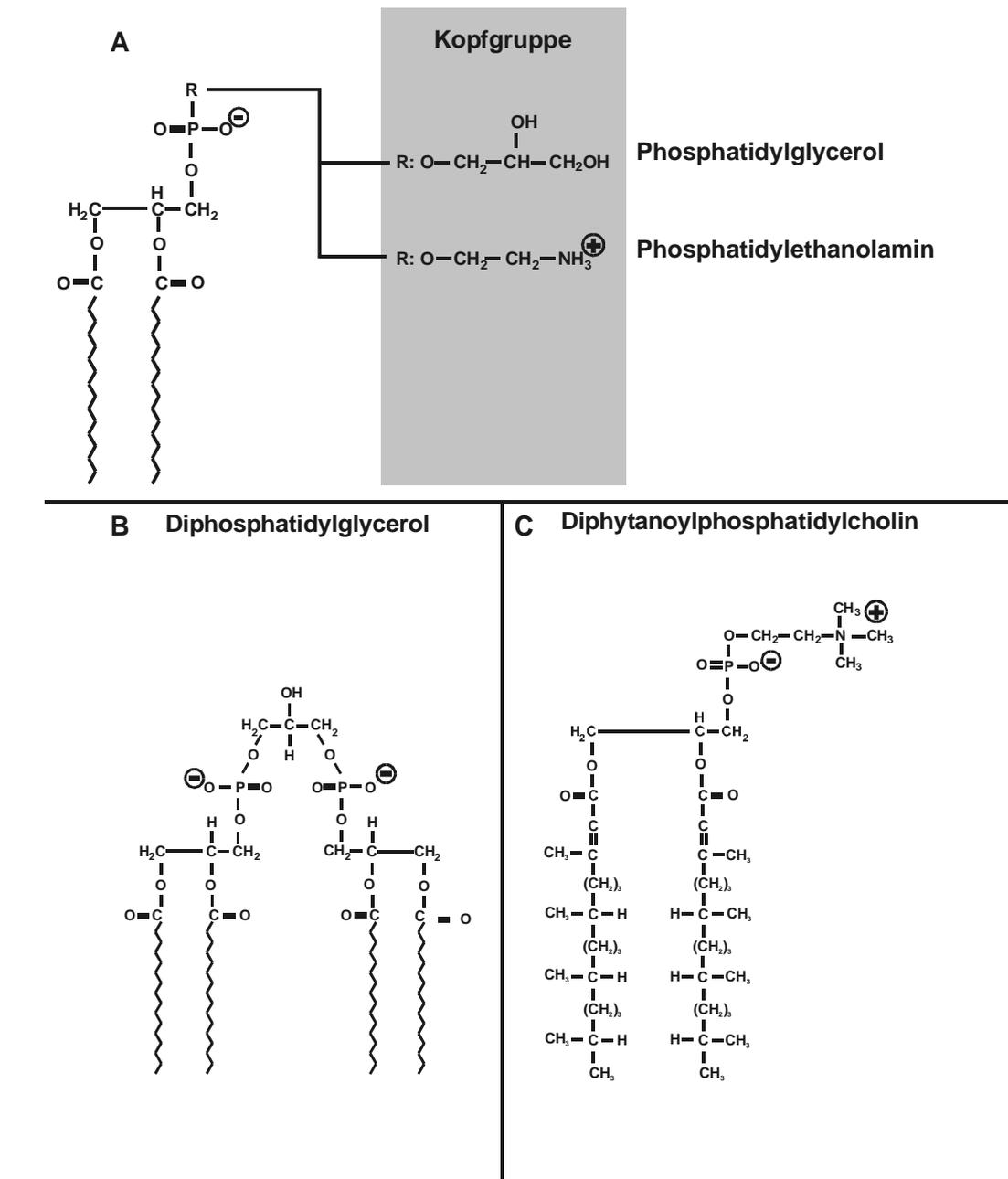


Abb. 2: Struktur in dieser Arbeit verwendeter Phospholipide.

Bei natürlichen Phospholipidextrakten liegt in der Regel eine Mischung vor, in der die Fettsäuren in Länge und Sättigungsgrad variieren. Die Länge der Fettsäureketten kann in einem Bereich von C:12 bis C:24 variieren, wobei der Anteil der ungesättigten Fettsäurereste meist kleiner als der der gesättigten ist (Benga, 1985). Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die Kohlenwasserstoffketten in der Regel im flüssigkristallinen Zustand (siehe Kapitel 3.3), d.h. die Fettsäureverteilung gewährleistet eine ausreichend hohe Membranfluidität (Kapitel 3.3 und Benga, 1985).

Eine Charakterisierung der Glycerophospholipide erfolgt über die Art der Kopfgruppe (Abb. 2) sowie der Länge und dem Sättigungsgrad der Fettsäuren. Bei neutralem pH sind einige Phospholipide wie Phosphatidylcholin (PC) und PE zwitterionisch, d.h. sie tragen neben der negativen Ladung am Phosphatrest in der Kopfgruppe eine positive Ladung, während z.B. Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylserin (PS) negativ geladen sind.

2.2.2. Sphingophospholipide

Diese komplexen Moleküle sind zusammengesetzt aus einem hydrophoben Anteil, dem Ceramid, und einer hydrophilen Komponente als Kopfgruppe. Als Ceramid wird die Verbindung von Sphingosin mit einer Fettsäure (Säureamidbindung) bezeichnet. Neutrale Sphingophospholipide stellen wesentliche Membrankomponenten dar, die vor allem auch am Aufbau intrazellulärer Organellen (Golgi-Apparat, Lysosomen) beteiligt sind. Bei Phosphosphingolipiden bildet die endständige Alkoholgruppe mit Phosphorsäure einen Ester. Bei Sphingomyelin ist die Phosphorsäure mit Cholin verknüpft. Für eukaryotische Zellen wurde ein Gehalt von 2 bis 15% Sphingomyelin (abhängig von der Art der Zelle) am Gesamtgehalt an Lipid nachgewiesen (Koval und Pagano, 1989; Koval und Pagano, 1991). Ist das Ceramid statt mit Cholin mit einem Kohlenhydratrest verbunden, erhält man die Cerebroside, Sulfatide oder Ganglioside.

2.2.3. Lipopolysaccharide

Die Außenseite der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wird von Glycolipiden gebildet. In der Regel handelt es sich dabei um Lipopolysaccharide, in einigen Fällen (wie z.B. *Sphingomonas paucimobilis*) auch um Glycosphingolipide. Prinzipiell sind Glycolipide aus einem Kohlenhydratanteil unterschiedlichster Struktur und einem Lipidanteil als Membrananker aufgebaut. Im Falle von LPS wird der Membrananker vom sogenannten Lipid A gebildet. Dabei handelt es sich um ein β -Glucosaminyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glucosamindisaccharid, das in den Positionen 1 und 4' phosphoryliert ist und bei Enterobakterien in der Regel sechs oder sieben Fettsäuren in Ester- und Amidbindung trägt (Rietschel et al., 1994). An diesen Lipidanker ist eine Zuckerkette variabler Länge gebunden. Bei den sogenannten Wildtyp-Stämmen besteht der

2. Biologische und biochemische Grundlagen von Lipidmembranen und Membranlipiden

Zuckerteil aus dem Kernoligosaccharid und der O-spezifischen Kette (auch O-Antigen genannt). Bei bestimmten Bakterienstämmen und Defektmutanten, den sogenannten Rauhmütanten, die ihren Namen ihrer Kolonienmorphologie verdanken, fehlt die O-spezifische Kette komplett, lediglich das Kernoligosaccharid ist in unterschiedlicher Länge ausgeprägt. Dieses wird im Falle von Rauhmütanten oder R-form LPS von *S. minnesota* entsprechend der Länge des Kernoligosaccharids in die Chemotypen Ra (komplettes Kernoligosaccharid) bis Re eingeteilt (Abb. 3). LPS des Chemotyps Re (Re-LPS) (Abb. 4) stellt die Minimalstruktur des LPS für die Lebensfähigkeit Gram-negativer Bakterien dar. Sie besteht nur noch aus Lipid A und zwei 2-Keto-3-deoxyoktonat (Kdo) Monosacchariden (Holst, 1999).

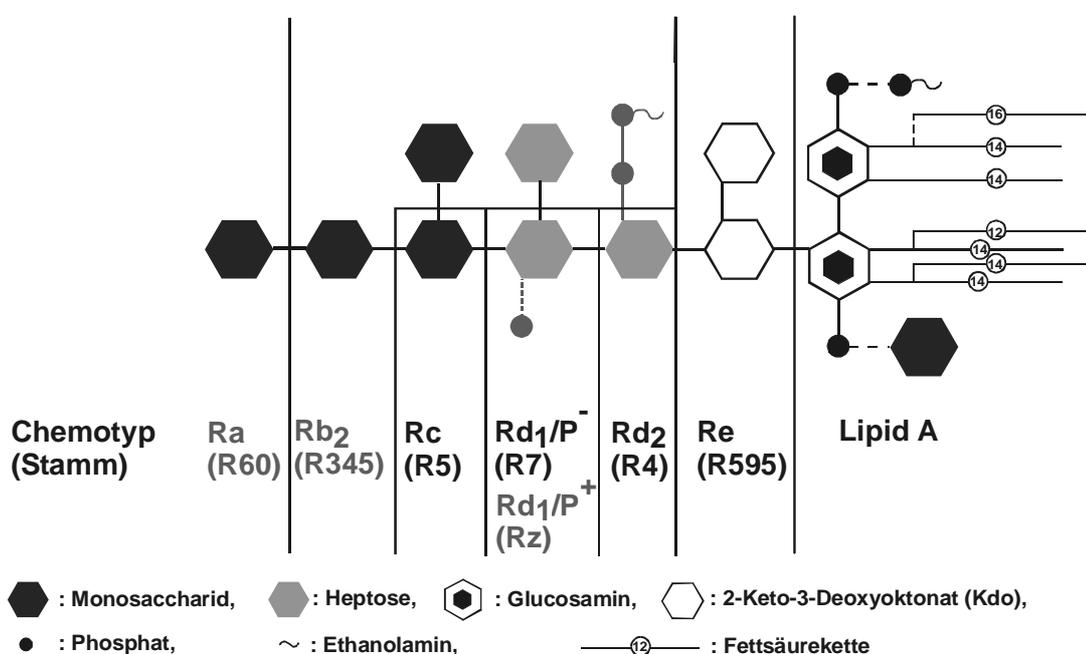


Abb. 3: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten LPS von *S. minnesota*. Die beiden zusätzlichen Phosphate und das Phosphoethanolamin an den Heptosen sind lediglich in den Chemotypen Ra, Rb₂ und Rd₁/P⁺ ausgebildet.

Re-LPS unterschiedlicher Spezies unterscheiden sich im wesentlichen durch die Anzahl und Verteilung von nichtstöchiometrischen Substituenten, wie 4-Amino-4-deoxy-L-arabino-pentopyranose (L-Arap4N), Phosphoethanolamin oder Fettsäuren (Abb. 4). Der Anteil nichtstöchiometrischer Substitutionen wurde für die in dieser Arbeit verwendeten LPS massenspektrometrisch ermittelt. Für LPS R595 von *S. minnesota* ergab sich, daß

2. Biologische und biochemische Grundlagen von Lipidmembranen und Membranlipiden

die an die amidgebundene 3-OH-14:0 Fettsäure in Position 2 des reduzierenden Glucosamins gebundene 16:0 Fettsäure zu etwa 30% und die an das 4'-Phosphat gebundene L-Arap4N zu etwa 65% vorhanden ist. Im Falle des LPS R45 von *P. mirabilis* sind die beiden L-Arap4N, die an das 4'-Phosphat des Lipid A und an das erste Kdo gebunden sind, zu jeweils 50% vorhanden. Aus diesen Substitutionen ergibt sich eine Nettoladung von -3 für LPS R45, $-3,4$ für LPS R595 und -4 für LPS F515.

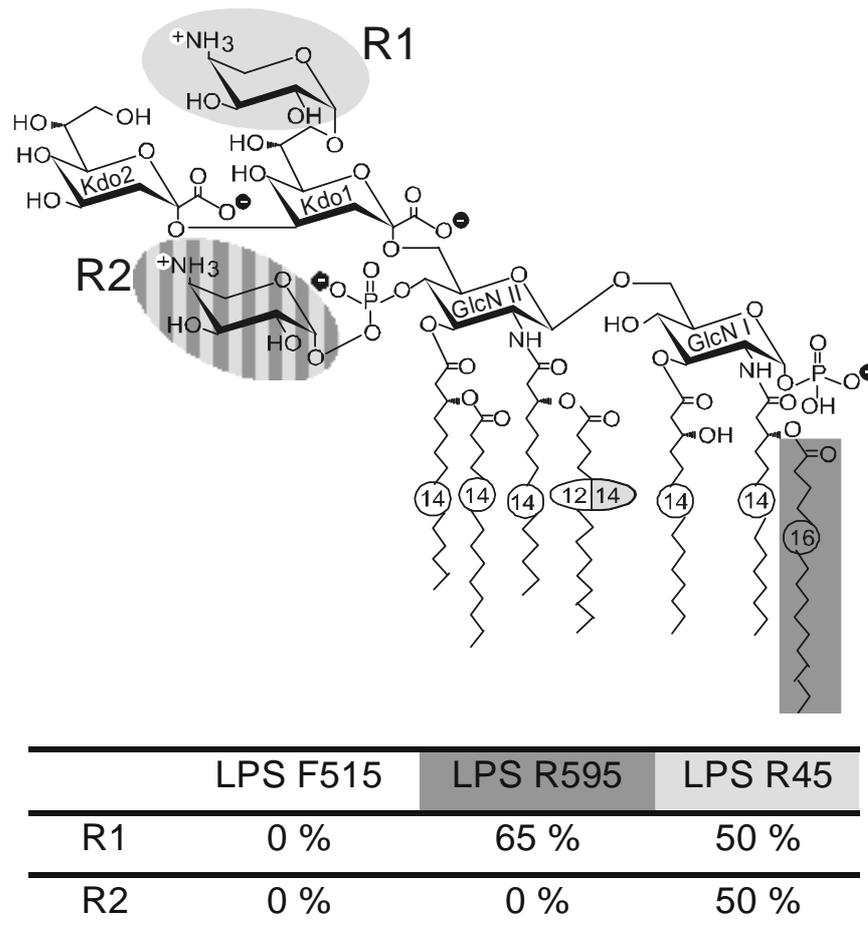


Abb. 4: Chemische Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Re-LPS von *E. coli* Stamm F515, *S. minnesota* Stamm R595 und *P. mirabilis* Stamm R45.

2.2.4. Cholesterol

Ein weiterer wichtiger Membranbestandteil eukaryotischer Zellen ist das Chol. Chol ist eine konjugierte Ringstruktur mit einer einzigen polaren Hydroxylgruppe, die mit

2. Biologische und biochemische Grundlagen von Lipidmembranen und Membranlipiden

Gruppen auf oder in der Nähe der Membranoberfläche interagieren kann. Chol hat unterschiedliche Effekte auf die Membranfluidität (Kapitel 3.3). In der fluiden Phase neigt Chol dazu, die Bewegungsfreiheit von benachbarten Kohlenwasserstoffketten einzuschränken, was zu einer Absenkung der Fluidität oder Versteifung der Membran führt. Im Gelzustand agiert Chol als Fremdkörper, der den Ordnungszustand der dicht gepackten Fettsäureketten stört. Chol wird in Konzentrationen bis zu 50% in unterschiedlichen Zellen gefunden, bei humanen Zellen beträgt sein Anteil etwa $\frac{1}{4}$ des Gesamtlipidgehalts.

3. Elektrische und physikochemische Eigenschaften von Membranen

Die Membran läßt sich als elektrischer Schaltkreis betrachten, dessen Eigenschaften mit Hilfe biophysikalischer Methoden charakterisiert werden können. In Kapitel 3.1 soll kurz auf die elektrischen Eigenschaften von Membranen eingegangen werden. Anschließend (Kapitel 3.2) sollen die wesentlichen Grundlagen für das Verständnis von Auftreten und Zusammensetzung von Membranpotentialen dargelegt werden. Schließlich wird in Kapitel 3.3 auf eine weitere Eigenschaft, die Fluidität, von Lipidmatrizes eingegangen.

Dem Leser mag auffallen, daß eine große Anzahl von Zitaten in diesem Kapitel aus den 70er Jahren stammt. Einer der Hauptgründe dafür ist in der Tatsache zu suchen, daß eine nähere Untersuchung der schon damals beschriebenen Effekte erst mit heutiger Technik möglich ist. Zudem existiert derzeit nur geringe Anzahl von Arbeitsgruppen, die an der Weiterentwicklung der Methode der planaren Lipiddoppelschichten arbeitet.

3.1. Elektrisches Ersatzschaltbild der Membran

Für elektrische Messungen an Lipiddoppelschichten ist es sinnvoll, die Membran als elektrischen Schaltkreis zu betrachten. Die reine Lipidmatrix ist für Ionen aller Art so gut wie undurchlässig, stellt somit einen nahezu perfekten Isolator dar. In der Literatur werden für den auf die Einheitsfläche bezogenen spezifischen Membranwiderstand Werte von 1 bis $10^4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für natürliche Membranen und etwa $10^8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für künstliche Lipiddoppelschichten beschrieben (Adam et al., 1977). In der wäßrigen Umgebung können sich Ionen dagegen frei bewegen, sie ist somit ein Leiter. Ein System, in dem zwei elektrisch leitende Phasen von einer elektrisch nicht leitenden Phase getrennt werden, ist ein Kondensator. Als Ersatzschaltbild für die Membran dient also eine Parallelschaltung aus einem Kondensator und einem nahezu unendlich großen Widerstand. Für planare Lipiddoppelschichten ergibt sich die Membrankapazität aus

$$(1) \quad C = \epsilon_0 \epsilon \frac{A}{d}$$

mit $\epsilon_0 = 8,55 \cdot 10^{-12} \text{ A}\cdot\text{s}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ elektrische Feldkonstante.

Dabei ist A die Fläche der Membran, d deren Dicke und ϵ die relative Dielektrizitätskonstante im Inneren der Membran. Für die auf die Einheitsfläche bezogene spezifische Kapazität werden Werte von $0,44 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ angegeben, diesem Wert liegt eine Membrandicke von 4 nm und eine Dielektrizitätskonstante für die Membran von 2 zugrunde (Adam et al., 1977).

Es soll allerdings erwähnt werden, daß die Membrankapazität keine Konstante ist, sondern vielmehr abhängig ist von der transmembran angelegten Spannung U und der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$, auf die in Kapitel 3.2.4 näher eingegangen wird. Die Kapazität der Membran ergibt sich somit zu

$$(2) \quad C = C_0 \left(1 + \alpha (U + \Delta\Psi)^2 \right).$$

Dabei bezeichnet C_0 die Grundkapazität der Membran für $U = -\Delta\Psi$ und α einen Proportionalitätsfaktor. Für planare Lipiddoppelschichten werden für α Werte von etwa $0,02 \text{ V}^{-2}$ angegeben (Alvarez und Latorre, 1978). Als Grund für diesen Effekt werden Änderungen der geometrischen Eigenschaften der Membran diskutiert. Zum einen wird eine Abnahme der Membrandicke auf Grund von Elektrokompensation (White, 1970a; Crowley, 1973; Requena et al., 1975; Alvarez und Latorre, 1978), zum anderen eine Zunahme der Membranfläche angegeben (Wobschall, 1972; White, 1972; White und Thompson, 1973; Requena et al., 1975). Möglich ist auch eine Überlagerung beider Effekte. Dabei wird angenommen, daß das Membranvolumen konstant bleibt, die Membran also elastisch aber im Volumen inkompressibel ist (White, 1974).

3.2. Membranpotentiale

Bei Membranpotentialen muß man prinzipiell zwischen zwei Größen unterscheiden, dem transmembranen und dem intrinsischen Membranpotential. Das transmembrane Potential ist eine Größe, die der Membran von außen aufgeprägt ist, sei es *in vivo* durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen im Innen- und im Außenmedium z.B. einer Zelle oder im Modellsystem einer rekonstituierten Membran durch extern angelegte Spannungen. Das intrinsische Membranpotential hingegen ist ein Größe, die aus den

physikochemischen Eigenschaften der die Membran aufspannenden Lipide resultiert und setzt sich aus dem Gouy-Chapman-, den Dipol- und dem Born-Potential zusammen. Diese 3 Komponenten werden nach dem Trapezkurvenmodell zusammengeführt.

3.2.1. Gouy-Chapman-Potential

Auf einer Oberfläche fixierte Ladungen ziehen Gegenionen aus einer benachbarten Phase an. Zusammen bilden die fixierten Ladungen und die Gegenionen eine sehr dünne elektrische Doppelschicht, die nach ihrem Entdecker benannte Helmholtz'sche Doppelschicht.

Unabhängig voneinander benutzten Gouy und Chapman die Poisson-Gleichung zur Beschreibung der elektrostatischen Anziehung der Gegenionen durch die Oberflächenladungen und die Boltzmann-Gleichung, um die Tendenz der Gegenionen, von einer Region hoher Konzentration wegzudiffundieren, zu berücksichtigen. Bei ihren Betrachtungen trafen sie die folgenden idealisierten Annahmen:

- es liegen keine distinkten Ladungen vor, sondern die Ladungen sind diffus über die Oberfläche verschmiert,
- die wäßrige Umgebung ist homogen und
- die Ionen lassen sich als Punktladungen darstellen.

Vom Oberflächenpotential muß die Bedingung

$$(3) \quad \lim_{x \rightarrow \infty} \Phi(x) = 0$$

erfüllt werden, wobei x der Abstand von der Oberfläche ist. Zudem muß $\Phi(x)$ für $x = 0$, also direkt an der Oberfläche, einen endlichen Wert Φ_0 besitzen. Diesen Wert bezeichnet man als Oberflächenpotential. Der Verlauf von $\Phi(x)$ läßt sich nach der Gouy-Chapman-Theorie berechnen (McLaughlin, 1989), die Ergebnisse sind hier kurz wiedergegeben:

Für kleine Werte von $|\Phi_0|$, mit

$$(4) \quad |\Phi_0| \ll \frac{RT}{F} \approx 25 \text{ mV (bei Zimmertemperatur, } T = 293 \text{ K),}$$

wobei T die Temperatur und

$$R = 8,3166 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1} \quad \text{Gaskonstante}$$

$$F = 9,6487 \cdot 10^4 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1} \quad \text{Faraday-Konstante}$$

sind, ergibt die Gouy-Chapman-Theorie für den Potentialverlauf

$$(5) \quad \Phi(x) = \Phi_0 \cdot \exp(-x/l_d).$$

l_d bezeichnet man als Debye-Hückel-Länge, sie ist der Abstand, in dem Φ auf den e-ten Teil von Φ_0 abgefallen ist. Die Debye-Hückel-Länge wird bestimmt durch die Konzentration c des Elektrolyten und durch die Dielektrizitätskonstante der Lösung

$$(6) \quad l_d = \frac{1}{F} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon R T}{2c}}$$

Die Debye-Hückel-Länge ist also umgekehrt proportional zur Konzentration des Elektrolyten. Im Bereich physiologischer Elektrolytkonzentrationen ($c \approx 0,1 \text{ M}$) ergibt sich für l_d ein Wert von etwa 1 nm.

Die exakte Beziehung für das Oberflächenpotential nach Gouy-Chapman lautet

$$(7) \quad \Phi(x) = \frac{2kT}{e_0} \ln \left(\frac{1 + \alpha \exp\left(-\frac{x}{l_d}\right)}{1 - \alpha \exp\left(-\frac{x}{l_d}\right)} \right)$$

mit $k = 1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$

Boltzmann-Konstante

$e_0 = 1,6021 \cdot 10^{-19} \text{ C}$

Elektrische Elementarladung

und α berechnet sich zu

$$(8) \quad \alpha = \frac{\exp\left(\frac{e_0 \Phi_0}{2kT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{e_0 \Phi_0}{2kT}\right) + 1}.$$

Ein geschlossener Ausdruck für des Gouy-Chapman-Potential von Membranen läßt sich unter folgenden speziellen Annahmen angeben:

- die Ladungen in den Kopfgruppen der Lipide sind als diffus verschmierte Ladungen zu betrachten,
- die relative Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten ist im gesamten Volumen konstant,
- die Ion-Ion-Wechselwirkung ist zu vernachlässigen und
- eventuell auftretende Bildladungskräfte können vernachlässigt werden.

Sind diese Annahmen erfüllt, so ergibt sich für das Gouy-Chapman-Potential der Ausdruck

$$(9) \quad \Phi_{GC} = \frac{2kT}{ze_0} \operatorname{ar sinh} \left(\frac{\sigma}{\sqrt{8\epsilon_0 \epsilon k T N_A c}} \right),$$

dabei ist σ die Oberflächenladungsdichte, z die Wertigkeit der Gegenionen und

$$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \quad \text{die Avogadro-Konstante.}$$

Sind mehrere Salze in dem wäßrigen Medium gelöst, so wird das Gouy-Chapman-Potential nach der Grahame-Gleichung berechnet, die allerdings nur numerisch lösbar ist. Statt dessen ist es jedoch möglich, die Ionenstärke J anstelle der Konzentration in Gleichung (9) zu verwenden. Diese ergibt sich durch

$$(10) \quad J = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n z_i^2 c_i,$$

dabei ist z_i die Wertigkeit und c_i die Konzentration der Ionensorte i und n die Anzahl der Ionensorten. Die Ionenstärke ist also die mittlere Ionenkonzentration, bei der die Ionen entsprechend dem Quadrat ihrer Wertigkeit gemittelt werden.

3.2.2. Dipol-Potential

Das Dipol-Potential resultiert aus der Ladungsverteilung an der Membran/Wasser-Grenzfläche. Es wird verursacht durch:

- die Polarisation der in den Lipiden vorkommenden funktionalen Gruppen,
- die Orientierung der an die Membran angelagerten Dipole und
- die unterschiedlichen Elektronegativitäten der Atome in den Kopfgruppen der Lipide.

An der Grenzfläche zwischen Membran und wäßriger Umgebung kommt es deshalb zu einem Potentialsprung.

Aus theoretischen Berechnungen (Flewelling und Hubbel, 1986) und kinetischen Messungen der Transportrate von hydrophoben Ionen durch eine planare Lipiddoppelschicht (Gawrisch et al., 1992) und durch Lipidvesikel (Franklin und Cafiso, 1993) ergibt sich, daß das Dipol-Potential beispielsweise von Phosphatidylcholin einen Wert von 220 bis 280 mV besitzt und im Inneren der Membran positiv ist.

3.2.3. Born-Potential

Bei der Bewegung eines Ions von einem Bereich mit einer hohen Dielektrizitätskonstante ($\epsilon_{\text{Wasser}} \sim 80$) in einen Bereich mit niedriger Dielektrizitätskonstante ($\epsilon_{\text{Membran}} \sim 2$) muß Energie aufgewendet werden. Diese Energie wird für das Abstreifen der Hydrathülle des Ions benötigt und wird als Born-Energie bezeichnet.

Mathematisch kann dieser Sachverhalt durch sogenannte Bildladungskräfte beschrieben werden. Diese Kräfte werden durch die unterschiedliche Polarisierbarkeit der Medien, in diesem Fall der Membran und der umgebenden Lösung, verursacht und treiben Ionen in der Membran, die sich in der Nähe der Membran/Wasser-Grenzfläche befinden, von dieser Grenzfläche fort in die wäßrige Phase hinein. Die potentielle Energie eines dieser Ionen berechnet sich so, als wäre anstelle der wäßrigen Phase ein zweites Ion mit entgegengesetzter Ladung, eine sogenannte Bildladung. Die Kraft zwischen Bildladung und Ion führt zu einer Energiebarriere für Ionen innerhalb der Membran, deren obere Grenze innerhalb der Membran liegt.

Für monovalente Ionen ergibt sich für die Born-Energie W_B der Ausdruck

$$(11) \quad W_B = \frac{z^2 e_0^2}{8\pi\epsilon_0 r} \left(\frac{1}{\epsilon_{\text{Membran}}} - \frac{1}{\epsilon_{\text{Wasser}}} \right),$$

dabei ist z die Wertigkeit des Ions, r dessen Radius, $\epsilon_{\text{Membran}}$ und ϵ_{Wasser} die Dielektrizitätskonstanten der Membran bzw. der wäßrigen Phase. Dabei wird angenommen, daß außerhalb der Membran $W_B = 0$ eV gilt (Neumecke und Läger, 1969). Die Born-Energie und damit das Born-Potential sind sowohl von der Dielektrizitätskonstante der Medien als auch von den Radien der Ionen abhängig. Für Kalium-Ionen, die einen Radius von 0,133 nm haben, ergibt sich eine Born-Energie von 2,6 eV.

3.2.4. Das Trapezkurvenmodell nach Schoch

Die Überlagerung der Einzelkomponenten des intrinsischen Membranpotentials ist in Abb. 5 wiedergegeben. Dabei wird der Potentialverlauf innerhalb der Membran als linear angenommen (Schoch et al., 1979).

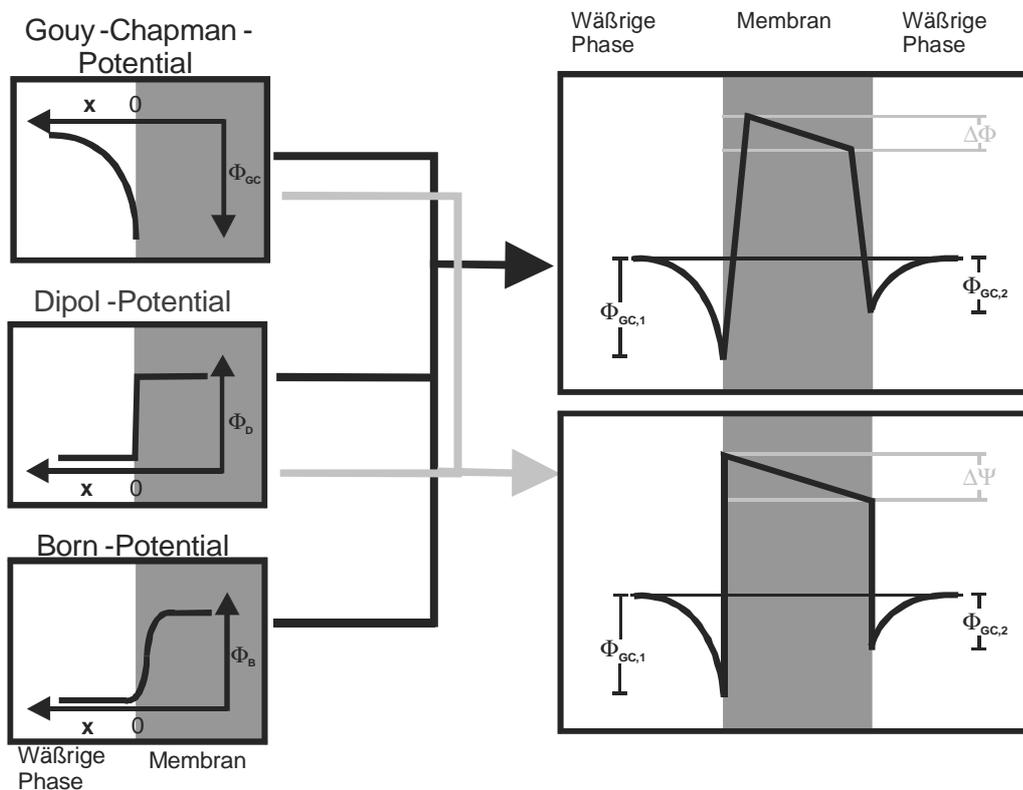


Abb. 5: Komponenten und Zusammensetzung des intrinsischen Membranpotentials nach Schoch (1979). Die intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ ergeben sich aus den Unterschieden der Überlagerung der einzelnen Potentialkomponenten der beiden Membranseiten. Der Übergang zwischen den beiden Seiten des Membranprofils wird dabei in erster Näherung als linear angenommen.

Dabei ergeben sich zwei unterschiedliche Verläufe:

1. Das Potential, das geladene Teilchen, die durch die Membran durchtreten, sehen, setzt sich zusammen aus Gouy-Chapman, Dipol- und Born-Potential. Die Differenz zwischen den beiden Seiten des Potentials wird als intrinsische Membranpotentialdifferenz $\Delta\Phi$ bezeichnet, auch hier wird der Verlauf des Potentials innerhalb der Membran als linear angenommen.
2. Die Überlagerung aus Dipol-Potential und Gouy-Chapman-Potential ergibt das Potential, das den Effekt der Kapazitätsminimierung (Kapitel 3.1) bestimmt. Die Differenz zwischen den Potentialen der beiden Seiten der Membran bezeichnet man als intrinsische Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$, auch Kapazitätsminimierungspotential genannt, welches im Falle einer asymmetrischen Membran verschieden von 0 ist. Der Verlauf des Potentials innerhalb der Membran wird dabei als linear angenommen.

3.2.5. Transmembranpotentiale

Im Gegensatz zum intrinsischen Membranpotential und dessen Komponenten ist das Transmembranpotential nicht von den physikochemischen Eigenschaften der Membran bestimmt. Im wesentlichen wird das Transmembranpotential bestimmt durch die unterschiedliche Verteilung von Ionen im Außen- und im Innenmedium einer Zelle. Dieses Potential läßt sich nach der Goldman-Gleichung für K^+ , Na^+ und Cl^- berechnen

$$(12) \quad U_{\text{Goldmann}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_a + P_{Na} [Na^+]_a + P_{Cl} [Cl^-]_a}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_i},$$

dabei ist P_x die Aktivität der Ionensorte x , $[x]_a$ die Konzentration der Ionensorte x im Außenmedium und $[x]_i$ deren Konzentration im Innenmedium. Körpereigene Zellen besitzen im allgemeinen ein Transmembranpotential von etwa -60 mV (innen negativ). Zum Transmembranpotential über der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien tragen im wesentlichen die sogenannten „Membrane-derived Oligosaccharides“ (MDO) bei. Experimentell wurde für *E. coli* ein Wert von -26 mV (innen negativ) (Sen et al., 1988) gefunden. Für die innere Membran werden im Gegensatz dazu Werte im Bereich von -100 bis -150 mV (innen negativ) (Bakker und Mangerich, 1981) diskutiert. Es konnte gezeigt werden, daß das Transmembranpotential eine wesentliche Rolle für die Peptid-induzierte Läsionsbildung spielt (Gutsmann et al., 2001). Im Modellsystem der

planaren Lipiddoppelschicht wird das Transmembranpotential im wesentlichen durch extern angelegte Spannungen erzeugt.

3.3. Fluidität der Lipidmatrix

Der Zustand, in dem sich die Kohlenwasserstoffketten der Lipide befinden und der die Fluidität der Membran bestimmt, ist ein wesentlicher Parameter für die Funktion biologischer Membranen. Die Interaktion von extern applizierten Substanzen mit der Lipidmatrix führt häufig zu einer Änderung der Fluidität. Im wesentlichen lassen sich zwei Phasenzustände unterscheiden, die β - bzw. Gelphase und die α - bzw. flüssigkristalline Phase. Bei der für eine Lipidsorte spezifischen Phasenübergangstemperatur T_C findet ein reversibler Phasenübergang 1. Ordnung statt. T_C hängt dabei von der Fettsäurezusammensetzung (Länge und Sättigungsgrad) und der Kopfgruppenstruktur der Lipide sowie von Umgebungsvariablen, wie dem pH-Wert und der Ionenkonzentration im umgebenden Medium, ab.

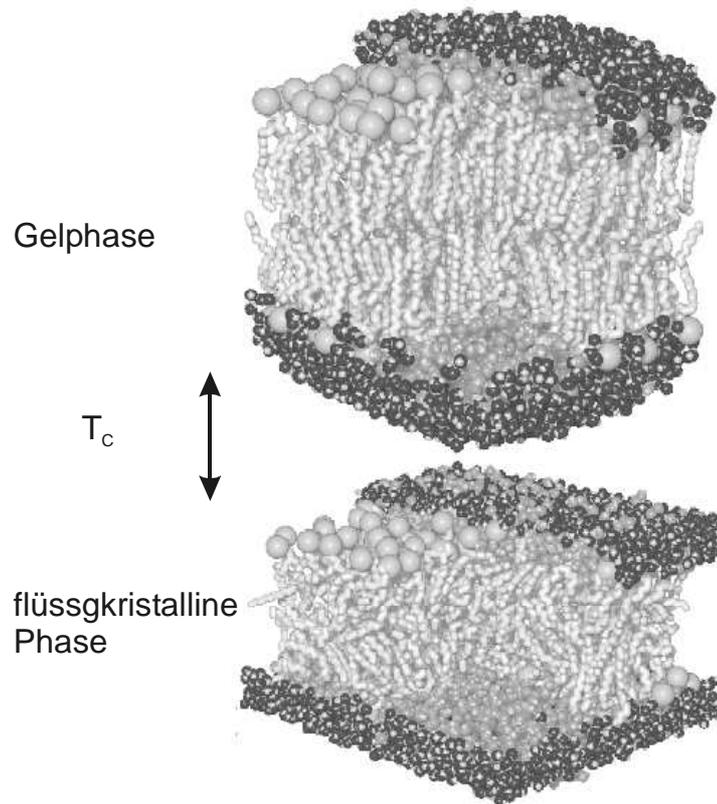


Abb. 6: Molecular Dynamics Simulation einer Phosphocholine-Doppelschicht in der Gelphase und der flüssigkristallinen Phase (Heller et al., 1993)

Bei gleicher Kopfgruppe führt eine Erhöhung der Kettenlänge zu einem Anstieg von T_c , während eine C=C Doppelbindung zu einer drastischen Abnahme von T_c führen. Wird zum Beispiel durch den Einbau eines Peptides oder Proteins in die Lipidmatrix der Platz, der den Fettsäureketten zur Verfügung steht, verringert, so nimmt deren Beweglichkeit ab, bzw. der Phasenübergang von der Gelphase in die flüssigkristalline Phase erfolgt bei einer höheren Temperatur.

Experimentell wird die Fluidität beispielsweise mit Hilfe der Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie bestimmt. Als Indikator für die Fluidität dient dabei die Position der Absorptionsbande der symmetrischen Streckschwingung der CH_2 -Gruppen der Fettsäureketten, die im Gelzustand bei ca. 2850 cm^{-1} liegt und sich oberhalb des Phasenübergangs in die flüssigkristalline Phase auf Werte zwischen $2852,0 \text{ cm}^{-1}$ und $2852,5 \text{ cm}^{-1}$ verschiebt. Die Messungen werden dabei an Lipidaggregaten bzw. -liposomen durchgeführt. Der Einfluß von Peptiden/Proteinen auf das Phasenverhalten

3. Elektrische und physikochemische Eigenschaften von Membranen

der Lipide wird durch Zumischung der entsprechenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen bestimmt.

4. Methoden

4.1. *Präparation planarer Lipiddoppelschichten*

Für die Präparation planarer Lipiddoppelschichten können grundsätzlich unterschiedliche Methoden verwendet werden. Ein wichtiger Aspekt bei diesen künstlichen Membranen ist deren weitgehende Lösungsmittelfreiheit. Weit verbreitet ist die

Mueller-Rudin Methode (1962). Die nach dieser Methode hergestellten Membranen werden auch „black lipid membranes“ oder „painted membranes“ genannt: Die Lipide werden in Dekan oder Dodekan gelöst und dann mittels eines Pinsels oder einer Drahtöse direkt über einer Apertur ($\varnothing \sim 1 \text{ mm}$) aufgetragen. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist, daß das Lösungsmittel in der Membran verbleibt und keine asymmetrischen Membranen hergestellt werden können. Eine Erweiterung dieser Methode wurde 1972 von Montal und Mueller vorgestellt: Lipiddoppelschichten werden über einer Apertur ($\varnothing \sim 120 \text{ bis } 150 \mu\text{m}$) aus zwei Lipidmonoschichten präpariert, wobei die Lipidmonoschichten aus chloroformischen Lipidlösungen hergestellt werden. Da das Chloroform vor der Präparation der Doppelschicht aus den Monoschichten abdampft, sind die Membranen weitgehend lösungsmittelfrei. Eine Abwandlung dieses Verfahrens stellt die Schindler-Methode dar, bei der die Lipidmonoschichten aus Liposomen hergestellt werden (Schindler, 1980). Im Folgenden werden die Technik und der Aufbau zur Präparation von planaren Lipiddoppelschichten nach der Methode von Montal und Mueller näher beschrieben, da dies für die vorliegenden Untersuchungen die Methode der Wahl war.

4.1.1. **Membranpräparation nach der Methode von Montal und Mueller**

Planare Lipiddoppelschichten wurden nach der Methode von Montal und Mueller (1972) präpariert (siehe Abb. 7). Dabei wird in zwei Meßkammern, die durch eine dünne mit einem kleinen Loch ($\varnothing = 100 - 150 \mu\text{m}$) versehene Teflonfolie, dem Septum, auf einer wäßrigen Lösung zunächst je eine Lipidmonoschicht aus einer

chloroformischen Lipidlösung präpariert (Schritt A). Durch Nachfüllen von wässriger Lösung in zunächst eine der Meßkammern wird die Lipidmonoschicht (Schritt B). Durch nachfüllen von Flüssigkeit in die zweite Meßkammer wird eine zweite Monoschicht über das Loch gefaltet, es bildet sich eine Lipiddoppelschicht aus (Schritt C).

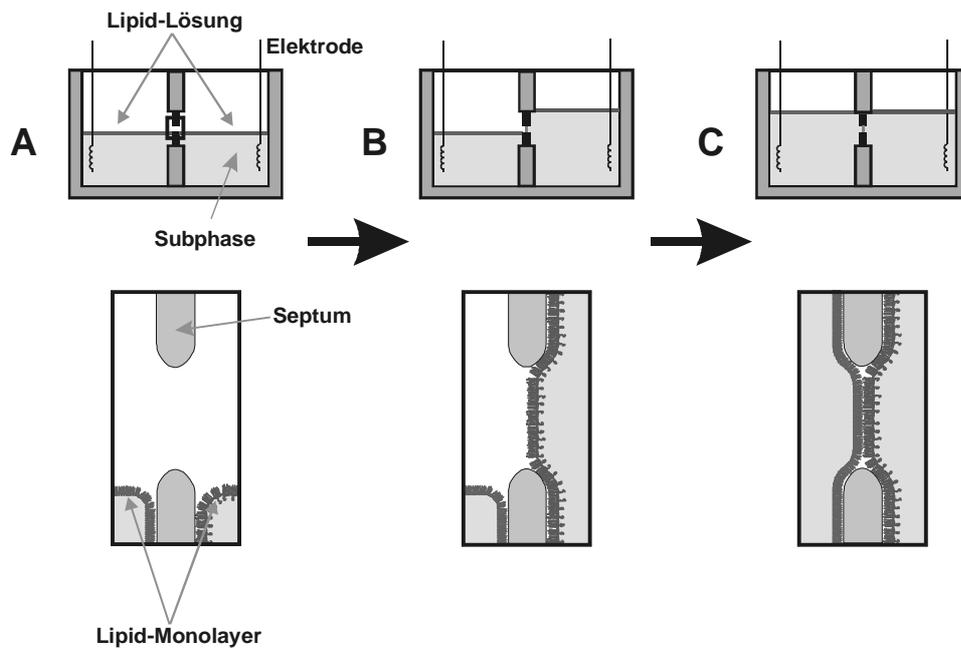


Abb. 7: Präparation planarer Lipiddoppelschichten aus zwei Lipidmonoschichten (oben: Übersicht, unten: Detailansicht) nach der Methode von Montal und Mueller (1972).

Durch Aufbringen unterschiedlicher Lipidlösungen auf den beiden Seiten des Septums lassen sich somit auch asymmetrische Lipiddoppelschichten präparieren. Obwohl diese Methode die am besten definierten, nahezu lösungsmittelfreien Membranen liefert, ist sie auf Grund der geringen Membranstabilität – damit einhergehend einer hohen Anzahl von Fehlversuchen und dementsprechend einem hohen zeitlichen Aufwand für die Durchführung größerer Meßreihen – nicht so weit verbreitet wie die Mueller-Rudin Methode, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden soll. Es sei nur angemerkt, daß letztgenannte Methode aus technischen Gründen nicht dazu geeignet ist, Wechselwirkungen zwischen Peptiden/Proteinen und asymmetrischen Lipiddoppelschichten zu untersuchen.

4.1.2. Mechanischer Aufbau

Der mechanische Aufbau der Apparatur zur Präparation symmetrischer und asymmetrischer planarer Membranen nach der Methode von Montal und Mueller ist in Abb. 8 dargestellt. Der Aufbau besteht aus einem zweiteiligen geschlossenen Metallzylinder, der als Faraday-Abschirmung dient. Im unteren Teil befindet sich die Meßkammer, im oberen der Meßkopf. Diese Anordnung steht auf einer elektronisch geregelten Heizplatte, mit deren Hilfe sich die Temperatur in der Meßkammer auf etwa 1°C genau einstellen läßt. Zusätzlich befindet sich unter der Heizplatte ein Magnetrührer (Varimag Compact, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim). Um Störungen durch mechanische Erschütterungen zu vermeiden, steht der gesamte Aufbau auf einer auf Luftfeder-elementen gelagerten Steinplatte.

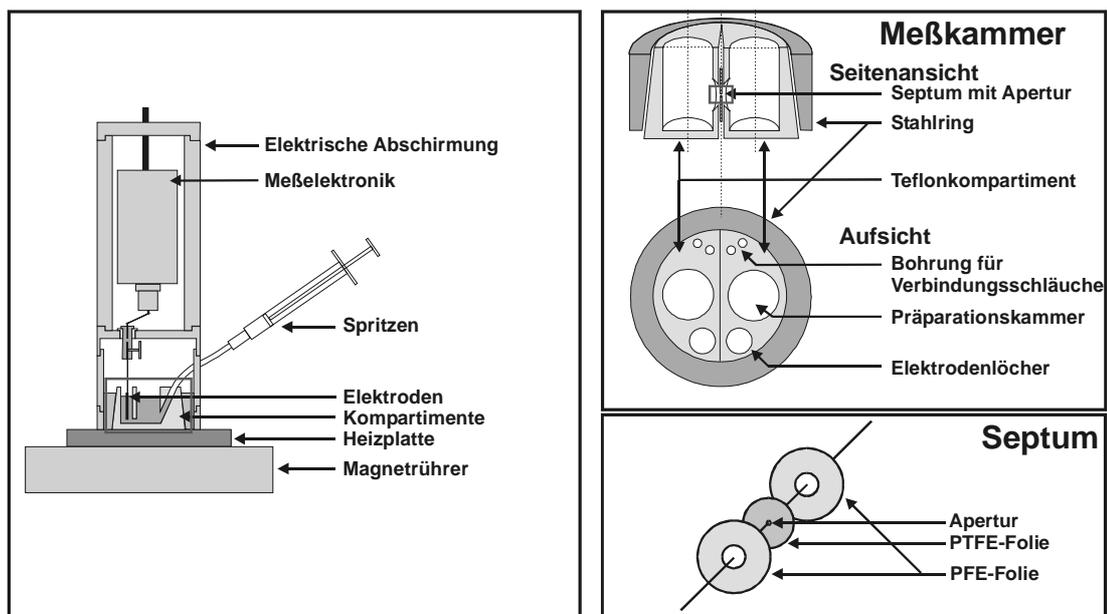


Abb. 8: Mechanischer Aufbau der Apparatur zur Präparation planarer Lipiddoppelschichten nach der Methode von Montal und Mueller

Die Meßkammer besteht aus zwei konischen halbreisförmigen Teflonkompartimenten, die mit verschiedenen Bohrungen versehen sind. Die größte Bohrung stellt die eigentliche Präparationskammer dar, sie hat eine weitere runde Öffnung zur planen Seite des Kompartiments und ist über eine horizontale Verbindungsbohrung mit einer weiteren senkrechten Bohrung verbunden, in der sich die Meßelektroden befinden. Über

weitere kleinere Bohrungen kann die Präparationskammer über einen Teflonschlauch mit einer Spritze verbunden werden, über die die Flüssigkeitsmenge in der Präparationskammer reguliert werden kann.

Zwischen die beiden Kompartimente wird das sogenannte Septum plaziert. Insgesamt drei Folien, zwei Stabilisierungsringe aus PFE-Folie (Breitenborn GmbH, Wuppertal) als Stütze und eine innere Folie – das eigentliche Septum – aus einer 12-13 μm dicken PTFE-Folie (Breitenborn GmbH, Wuppertal), werden bei 600°C zwischen zwei plangeschliffenen Metallplatten für etwa 2 min miteinander versintert. In der Mitte des Septums wird dann mittels mehrerer Funkenentladungen ein etwa 120 bis 150 μm großes Loch, die sogenannte Apertur, erzeugt.

In der Metallabschirmung befinden sich zwei Öffnungen, durch die vordere kann die Präparation der Membran mittels einer Stereolupe (h33, Hund, Wetzlar) beobachtet werden, die Beleuchtung erfolgt mit Hilfe einer Kaltlichtquelle (FLQ-150, Hund, Wetzlar) über eine Lichtleiteroptik durch die hintere Öffnung.

4.1.3. Durchführung der Membranpräparation

Zunächst wird die Hydrophobizität des Septums durch waschen in einer Mischung aus Hexan und Hexadekan (20:1 v:v) erhöht. Anschließend wird die Meßkammer zusammengesetzt, in den unteren Teil des Aufbaus plaziert und anschließend die Spritzen eingesetzt. Die Meßkammer wird mit 1,5 ml elektrolytischer Lösung (Subphase) befüllt und auf die voreingestellte Temperatur, in der Regel 37°C, aufgeheizt. Nach Erreichen dieser Temperatur wird Lipid in chloroformischer (Phospholipide) oder chloroform/methanolischer (LPS) Lösung aufgetropft. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft ist, werden nacheinander die Subphasenspiegel und damit die sich darauf befindlichen Lipidmonoschichten über die Apertur in dem Septum angehoben. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Lipiddoppelschicht (siehe Abb. 7).

Für die gezeigten Untersuchungen wurden nur solche Membranen verwendet, die (bei einem Aperturdurchmesser von 150 μm) eine Kapazität von mindestens 100 pF zeigten. Nach den Werten in Kapitel 3.1 ergibt sich ein Wert von 75 pF, in der Praxis ergeben sich jedoch Werte zwischen 100 und 110 pF. Beim Anlegen einer Spannung von 100 mV über der Membran durfte der maximale Strom 3 pA nicht überschreiten,

um sicher zu stellen, das die beobachteten Ströme nicht aus Kriechströmen zwischen den beiden Kompartimenten resultieren.

Die Zugabe der Proteine/Peptide erfolgte jeweils auf der vorderen Seite der Membran. Im Folgenden wird diese als erste genannt, z.B. LPS/PL, wenn die Zugabe auf der LPS-Seite erfolgte, bzw. PL/LPS, wenn die Zugabe auf der PL-Seite erfolgte.

4.2. Elektronischer Aufbau

Der elektronische Aufbau zur Bestimmung des Membranstromes, der Membrankapazität und der intrinsichen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Phi$ nach der Carrier-Transport-Methode (siehe Kapitel 4.4.1) ist in Abb. 9 gezeigt. Der Vorverstärker ist mit der Controllereinheit eines L/M-PCA Verstärkers (List-Medical, Darmstadt) verbunden. Der Controller umfaßt eine Spannungsquelle sowie die Signalerfassungs- und Steuerelektronik. Es kann zwischen unterschiedlichen Verstärkungsfaktoren (von 0,5 bis 1000 mV/pA) gewählt werden, und mit Hilfe eines integrierten 6-Pol Bessel Tiefpaßfilters wird das Ausgangssignal mit 10 kHz gefiltert. Die über die Elektroden angelegte Spannung kann entweder über die interne Spannungsquelle oder über den Stimuluseingang von einer Analog-Output Karte (PCI-20428, Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Lechterdingen) eines Computers, die mit dem Controller verbunden ist, bereit gestellt werden. Die Datenspeicherung erfolgt auf einem DAT oder CD-Recorder (Biologic, Claix, France).

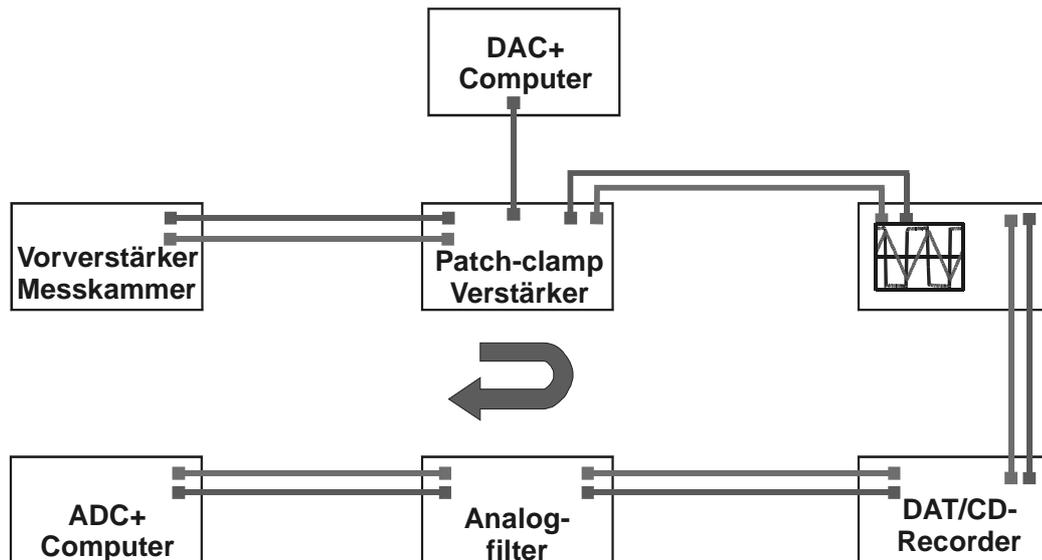


Abb. 9: Elektronischer Aufbau zur Bestimmung des Membranstroms, der Kapazität und der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Phi$ nach der Carrier-Transport-Methode

Zur Auswertung werden die Meßdaten mittels eines elektronischen Filters (Ithaco Scientific Instruments, Ithaca, NY, USA) mit einer Frequenz von 1 kHz Tiefpaßgefiltert. Über eine Analog-Input Karte (PCI-20428, Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Lechterdingen) werden die Daten in einen PC eingelesen. Als Steuerungssoftware wurde Visual Designer 4.0 (Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Lechterdingen) verwendet, für die grafische Aufbereitung und Auswertung der Meßdaten Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northhampton, MA, USA).

Der Aufbau für die Bestimmung der Membrankapazität und der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$ nach der IFC-Methode ist in Abb. 10 gezeigt. Der Meßkopf ist mit dem Eingang eines 7265 DSP-Lock-In Verstärker (EG&G, Berks, U.K.) verbunden. Der Verstärker umfaßt eine Quelle für Sinusspannungen sowie die Signalerfassungs- und Analyseelektronik. Die Gleichspannungskomponente wird von einer Analog-Output Karte (PCI-20428, Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Lechterdingen) eines Computers zur Verfügung gestellt. Zur Auswertung werden die Signale über eine Analog-Input Karte (PCI-20428, Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Lechterdingen) in einen Computer eingelesen. Als Steuerungssoftware wurde Visual Designer 4.0 (Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Lechterdingen)

eingesetzt, die Auswertung und Aufbereitung der Daten erfolgte mittels Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northhampton, MA, USA).

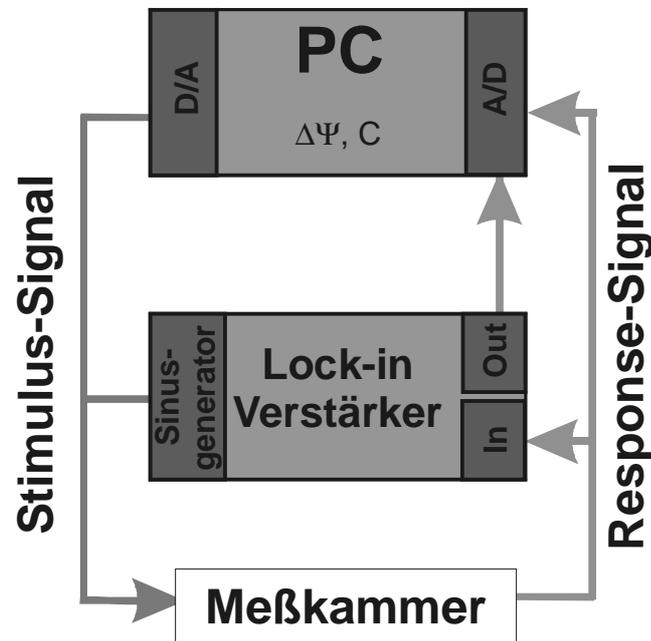


Abb. 10: Elektronischer Aufbau zur Bestimmung der Membrankapazität und der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$ nach der IFC-Methode

4.3. Messung der Membrankapazität

Wie eingangs beschrieben, dient als elektrisches Modell einer Membran – als Nichtleiter zwischen zwei leitenden Phasen – ein Plattenkondensator (Kapitel 3.1). Die Membrankapazität läßt sich meßtechnisch über den durch eine Spannungsdifferenz induzierten kapazitiven Strom bestimmen. Dabei wurde zum einen die Spannungssprungmethode verwendet und zum anderen die Kapazität aus der Stromantwort der Membran auf eine sinusförmige Wechselspannungsanregung bestimmt.

4.3.1. Bestimmung der Membrankapazität nach der Spannungssprungmethode

Prinzipiell erfolgte die Kapazitätsmessung nach der Spannungssprung-Methode (Alvarez und Latorre, 1978). Wird an die Membran ein Spannungssprung angelegt, so kann aus dem Strom I , durch den der Kondensator C (Gleichung 1) ge- bzw. entladen wird, die Membrankapazität ermittelt werden, da die Amplitude des auf den Ein- und Ausschaltvorgang folgenden Relaxationsstroms proportional zur Kapazität der Lipiddoppelschicht ist.

In unserem Fall wurde die bit-weise Spannungsänderung der Analog-Output Karte ausgenutzt, um an der Membran schnelle Spannungspulse mit einer sehr kleinen Amplitude ($4,9 \mu\text{V}$) zu erhalten. Dazu wurde eine Dreiecksspannung ($f = 50 \text{ Hz}$) mit einer Amplitude von 1 mV , deren Spannungsrampen aus 409 einzelnen Stufen bestehen, an die Membran angelegt. Zur Bestimmung der Kapazität wurde die aus den einzelnen Strompulsen bestehende Stromantwort mit einer Frequenz von 1 kHz tiefpaßgefiltert und das Ausgangssignal zur Kapazitätsbestimmung herangezogen (Abb. 11).

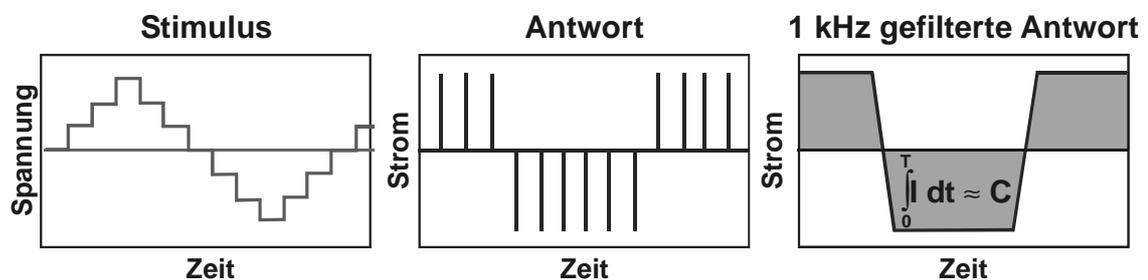


Abb. 11: Prinzip der Spannungssprungmethode.

Die Apparatur wurde mit Hilfe von Kapazitäten bekannter Größe kalibriert. Dieser Aufbau ermöglicht es, die Membrankapazität zeitaufgelöst mit einer Erfassungsrate von 1 Hz zu bestimmen (Gutsmann et al., 1999).

4.3.2. Bestimmung der Membrankapazität aus der Stromantwort auf eine sinusförmige Wechselspannung

Nach Carius (1976) läßt sich die Kapazität einer Membran aus der ersten 1. Harmonischen der Stromantwort der Membran auf eine sinusförmige Wechselspannung bestimmen. Dabei gilt:

$$(13) \quad I_1 = C_0 \left[1 + 3\alpha \left(U_0^2 + \frac{1}{4} U_1^2 \right) \right] \cdot U_1 \omega \cos(\omega t),$$

α ist ein Proportionalitätsfaktor, C_0 die minimale Membrankapazität, U_0 die Gleichspannungskomponente, U_1 die Amplitude und ω die Frequenz der Sinuskomponente der Anregungsspannung.

Zur Bestimmung der Membrankapazität wurde die Amplitude des kapazitiven Stroms mit Hilfe von Präzisionskondensatoren auf die Kapazität kalibriert.

4.4. Messung der intrinsischen Membranpotentialdifferenz

Generell muß zwischen zwei Methoden der Membranpotentialmessung unterschieden werden. Zunächst soll auf die Carrier-Transport-Methode, mit der sich die intrinsische Membranpotentialdifferenz $\Delta\Phi$ bestimmen läßt, eingegangen werden. Anschließend wird die IFC-Methode zur Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$ näher beschrieben.

4.4.1. Die Carrier-Transport-Methode

Zur Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Phi$ wird der Membran ein sogenannter Ionen-Carrier hinzugesetzt. Dabei handelt es sich um ein Transportmolekül, das spezifisch Ionen entlang eines Konzentrationsgradienten transportiert. In der Regel werden für solche Untersuchungen K^+ -Carrier wie zum Beispiel Valinomycin und Nonactin eingesetzt. $\Delta\Phi$ ergibt sich aus der I/U-Charakteristik des K^+ -Transports gemäß der Schoch-Gleichung (Schoch et al., 1979)

$$(14) \quad I = K \frac{\Delta\Phi + (n_2 - n_1)U}{n_2 - n_1} \frac{\exp(aU) - 1}{\exp(a(\Delta\Phi + n_2 U)) - \exp(an_1 U)},$$

mit $a = zF / RT$ und $K = \frac{azFAD}{d} c_i c_s \gamma_s K_a \exp(-a\Phi_1(0))$,

wobei $n_{1,2}$ die relativen Positionen der Ecken des Trapezes im Potentialprofil, $\Phi_1(0)$ die Höhe der Ecke des Trapezes auf der Vorderseite, D die Diffusionskonstante, c_i die Konzentration des transportierten Carriers in der Subphase, c_s die Subphasenkonzentration des unkomplexierten Carriers, γ_s der Partitionskoeffizient des unkomplexierten Carriers und K_a die Assoziationskonstante zwischen Ion und Carrier in der Subphase sind.

Da $\Delta\Phi$ sich nicht rechnerisch bestimmen lässt, wird es aus Gleichung (14) durch Kurvenanpassung der I/U -Charakteristik des Carrier-induzierten Membranstromes numerisch bestimmt (Abb. 12).

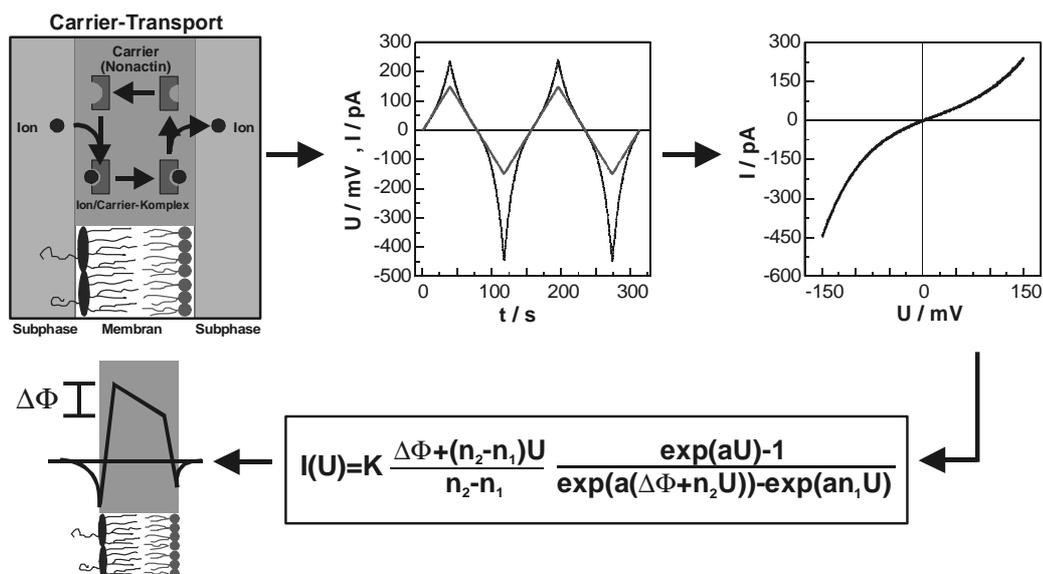


Abb. 12: Prinzip der Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Phi$ über den durch den Carrier-induzierten Ionentransport verursachten Membranstrom.

4.4.2. Die Inner Field-Compensation Methode

Grundlage der Inner Field-Compensation (IFC) Methode ist die Tatsache, daß sich die Kapazität einer Membran quadratisch mit der Summe aus innerer Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$ und einer extern angelegten Spannung U ändert (Gleichung 2) (Babakov et al., 1966; White, 1970a/b).

Wird die Membran mit einer Wechselspannung der Form

$$(15) \quad U = U_0 + U_1 \sin(\omega t)$$

angeregt, so ergibt sich aus

$$(16) \quad I = \frac{d}{dt} Q = \frac{d}{dt} C(U) \cdot U$$

eine zweite Harmonische, die verschwindet, wenn $U_0 = -\Delta\Psi$ (Sokolov und Kuz'min, 1980; Pohl et al., 2000).

Bei der IFC-Methode wird nun die Transmembranspannung U_0 über einen Regelkreis so variiert, das die 2. Harmonische stets Null ist. Als Kontrollparameter für den Regelkreis dient dabei die Phase der 2. Harmonischen, die bei $I_2 = 0$ einen Sprung von 90° auf 270° bzw. 90° macht. Auf Grund von Rauschen wird dieser Sprung zu einem kontinuierlichen Übergang verschmiert, so daß die Phase an diesem Punkt einen Wendepunkt hat. Das Grundprinzip der IFC-Methode ist in Abb. 12 dargestellt.

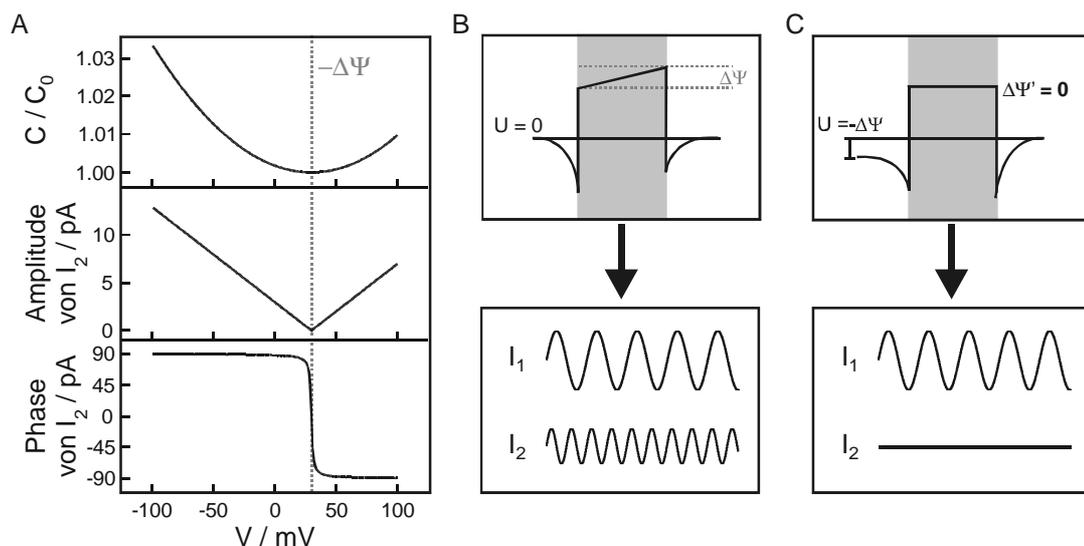


Abb. 13: Prinzip der Inner Field- Compensation Methode

4.5. Aufbau für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten

Bei vielen Methoden in der modernen Biowissenschaft macht man sich den Effekt der Fluoreszenz zu Nutze. Viele Prozesse finden auf molekularer Ebene statt und sind einer direkten Beobachtung im Lichtmikroskop oder anderen optischen Verfahren aus diesem Grunde nicht zugänglich. Durch gezielte Markierung von Molekülen wie Antikörpern, Membranproteinen, antimikrobiellen Peptiden oder auch Lipiden mit Fluoreszenzfarbstoffen können diese Prozesse jedoch detektiert werden. Zu den gängigen Fluoreszenzmethoden gehören die z.B. Epifluoreszenzmikroskopie, konfokale Lasermikroskopie, die Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) Spektroskopie und die Durchflußzytometrie. Die physikalischen Grundlagen der Fluoreszenz werden hier als bekannt vorausgesetzt.

Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der Erweiterung des elektrischen Aufbaus zur Untersuchung von planaren Membranen um einen fluoreszenzmikroskopischen Aufbau, der es erlauben sollte, zusätzlich zu den elektrischen Parametern Informationen über die Membranmorphologie – insbesondere die Bildung von Domänen (siehe Kapitel 8.1) – an diesem System zu erfassen. Bei der Realisierung dieses Aufbaus galt es verschiedene Anforderungen an das Mikroskop und an die Meßkammer zur Präparation von planaren Membranen nach der Methode von Montal und Mueller zu beachten. Zum einen ist man in der Fluoreszenzmikroskopie bemüht, eine möglichst optimale Auflösung bei höchstmöglicher Quantenausbeute zu erreichen, andererseits ist man bei elektrischen Messungen an planaren Membranen bemüht, das System möglichst frei von elektrischen und mechanischen Störungen zu halten. Hinzu kommen technische Gegebenheiten, die aus der Präparationsmethode selbst resultieren.

Zunächst wurde eine Meßkammer konstruiert, die einen kleinstmöglichen Abstand zwischen Objektiv und Membran zuläßt, gleichzeitig wurde das Objektiv so gewählt, das es einen größtmöglichen Abstand zur Membran zuläßt, so daß die für die Präparation von planaren Membranen notwendigen Bestandteile, insbesondere das Spritzen- und das Heizsystem, sowie die für die elektrischen Messungen notwendigen Bestandteile des Aufbaus, wie die Faraday-Abschirmung und das Elektrodensystem, Platz finden. Ein schematischer Aufbau der Meßkammer ist in Abb. 14 gezeigt. Um

eine möglichst geringe Dicke der Meßkammer zu erreichen, wurde auf einige der in Abb. 8 gezeigten Bohrungen verzichtet und eine eckige Geometrie der Meßkammer einer runden vorgezogen. Der Abschluß der Meßkammer wird von einem sogenannten Haemacytometer Deckglas (Marienfeld, Lauda-Königshofen) gebildet, dieses hat den Vorteil, das es optisch plan ist und zudem in den benutzten Wellenlängenbereichen keine Absorption zeigt. Zusammengehalten werden die beiden Halbelemente von zwei Stahlplatten, die nach dem Zusammensetzen der Meßkammer miteinander verschraubt werden. Über jeweils eine Bohrung in den beiden Metallplatten erfolgt zum einen die Einkopplung des Mikroskopstrahlengangs in die Meßkammer, zum anderen die Beleuchtung der Membran über eine Kaltlichtquelle (FLQ 150, Hund, Wetzlar) zur optischen Beobachtung der Membranpräparation. Sämtliche mechanischen Teile und Gehäuse wurden von Eastern Scientific (Rockville, MD, USA) hergestellt.

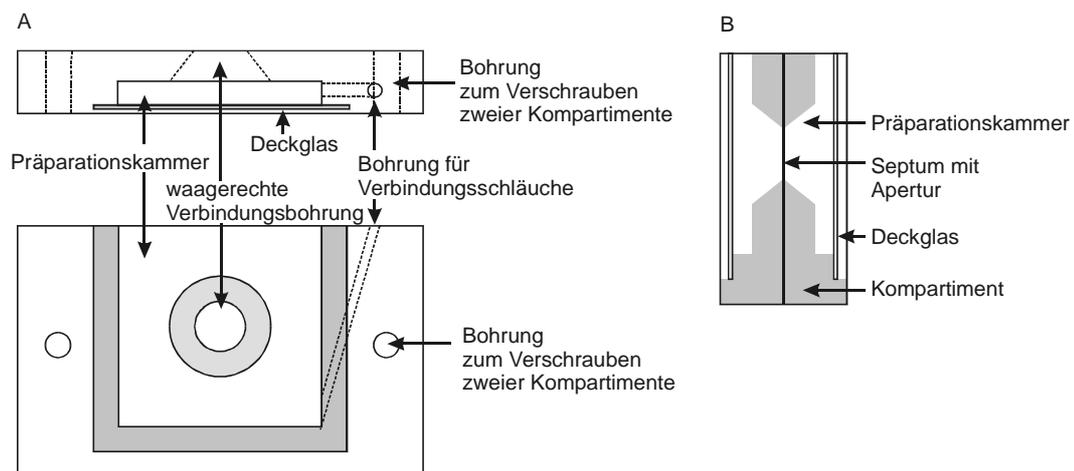


Abb. 14: (A) Frontansicht und Aufsicht eines Kompartiments für den Aufbau zur Fluoreszenzmikroskopie an planaren Lipiddoppelschichten, (B) Schnitt durch die Meßkammer.

In Abb. 15 ist der schematische Aufbau des fluoreszenzmikroskopischen Systems gezeigt. Im Folgenden wird dieses System am Beispiel seiner Auslegung zur Beobachtung der Fluoreszenz des Farbstoffes 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD) näher beschrieben. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberkurzbogenlampe (HBO 103 W/2, Osram, München). Über ein optisches Filter mit einer Wellenlänge von 455 nm (455DF70, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) wird die Anregungswellenlänge für

NBD herausgefiltert und über einen dichroitischen Spiegel (515DRLP, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) in den Strahlengang eingekoppelt. Über ein Apochromatobjektiv (M Plan APO 50x, Mitutoyo America Corporation, Aurora, IL, USA), welches einen Arbeitsabstand (Abstand zwischen Objektiv und Deckglasoberseite) von 13 mm in Luft besitzt, wird die Membran beleuchtet. Apochromatobjektive eignen sich besonders zur Aufnahme von Farbbildern, da sie für 4 Farben chromatisch und 2 bis 3 Farben sphärisch korrigiert sind. Des Weiteren ist bei diesem Objektiv die Krümmung der Bildebene korrigiert.

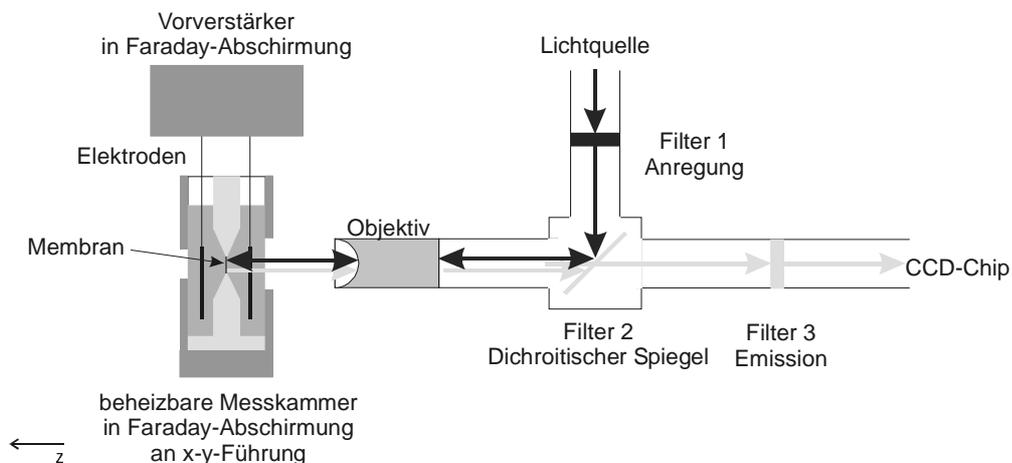


Abb. 15: Schema des Aufbaus zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung an planaren Lipiddoppelschichten.

Das von der Membran in Reflektionsrichtung emittierte Licht wird über das oben beschriebene Objektiv und den dichroitischen Spiegel, der im Bereich der Emission von NBD durchlässig ist, sowie ein weiteres Filter (515ALP, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) mit einer Grenzwellenlänge von 515 nm, welches den Durchtritt von Resten des Anregungslichts verhindert, zum Detektor gelenkt. Zur Erfassung der Fluoreszenzbilder dient eine CCD-Kamera (C 8484-02, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herschingen), die über die IEEE 1394 Schnittstelle mit einem EDV-System verbunden ist, welches eine weitere Verarbeitung der Daten ermöglicht. Das Kamerasystem ermöglicht eine Auflösung von etwa $0,15 \mu\text{m}$ pro Bildpunkt, was im sichtbaren Bereich ausreichend ist, um die physikalische Auflösung des Mikroskops voll auszunutzen. Die optische Auflösung dieses Mikroskops beträgt mit Luft als

Medium etwa 0,47 μm . Der Strahlteiler wurde von Eastern Scientific (Rockville, MD, USA) gefertigt.

Für die weitere Verarbeitung der Daten diente die Software WASABI (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herschingen).

5. Einfluß der Glycostruktur von Lipopolysacchariden auf die Porenbildung durch Porine

Porine ermöglichen den Stofftransport durch die ansonsten undurchlässige äußere Membran Gram-negativer Bakterien. Die Kenntnis von der Funktionsweise der Porine und ihrer Biogenese ist daher entscheidend für das Verständnis der Überlebensstrategien Gram-negativer Bakterien. Ein bereits sehr gut untersuchtes Porin ist das Phosphoporin PhoE von *E. coli*. Es wurde bereits in unterschiedlichen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen gezeigt, daß LPS bei der Biogenese dieses Porins eine wichtige Rolle spielt.

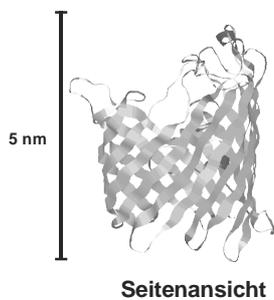
Porine werden als sogenanntes Vorläuferprotein im Zytoplasma synthetisiert. Nach der Translokation durch die innere Membran (Bernstein, 2000) gelangen sie in die periplasmatischen Raum, dort kommt es zur Abspaltung der Signalsequenz (Schatz und Beckwith, 1990), zur Faltung und Trimerisierung. Schließlich kommt es zum Einbau der Porine in die äußere Membran. Es konnte gezeigt werden, daß LPS, das ebenfalls in einer Vorstufe im Zytoplasma synthetisiert und durch die innere Membran transloziert wird, einen wichtigen Einfluß auf die Faltung (Sen und Nikaido, 1991a/b; De Cock et al., 1999) und die Trimerisierung (De Cock et al., 1990; Sen und Nikaido, 1991b) von Porinen im Periplasma hat. Zudem wurde gezeigt, daß die Anzahl von Porinen und anderen Proteinen der äußeren Membran von der Struktur des LPS des untersuchten Gram-negativen Stammes abhängig ist (Ames et al., 1974; Tommassen und Lugtenberg, 1981; De Cock et al., 1996).

Die hier gezeigten Untersuchungen fokussieren sich auf den Einfluß der Lipidmatrix, insbesondere der Glycostruktur der LPS-Seite der asymmetrischen planaren PL/LPS-Membran als Modell für die äußere Membran Gram-negativer Bakterien, auf den Einbau und das Schaltverhalten von PhoE. Dabei wurde das Porin entsprechend der *in vivo*-Situation auf der PL-Seite asymmetrischer planaren Membranen zugegeben.

5.1. Struktur und Eigenschaften von Porinen

Porine sind integraler Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Nikaido und Vaara, 1985). Strukturell gehören die Porine zu den sogenannten „ β -barrel“ Proteinen, faßförmigen Proteinen aus 16 bis 18 antiparallelen β -Faltblatt Strukturen, die auf der Innen- und der Außenseite der Membran durch Schleifen („loops“ und „turns“) miteinander verbunden sind (Abb. 16). In der Regel bilden diese Proteine Homotrimere. Durch die faßartige Struktur ermöglichen sie Molekülen bis etwa 600 Da einen Durchtritt durch die ansonsten nahezu undurchlässige äußere Membran. Man unterscheidet bei den Porinen zwischen klassischen Porinen („general diffusion pores“), die wenig oder keine Selektivität für bestimmte Moleküle aufweist, und Porinen, die wie das Maltose-spezifische Maltoporin LamB und das Phosphat-spezifische Phosphoporin PhoE von *E. coli* spezifisch für bestimmte Substanzen sind. Wachsen Bakterien unter Mangel bestimmter Stoffe, so wird die Expression dieser spezifischen Porine gesteigert, um dem herrschenden Mangel entgegenzuwirken (Benz und Bauer, 1988).

(A) PhoE-Monomer



(B) OmpF-Trimer

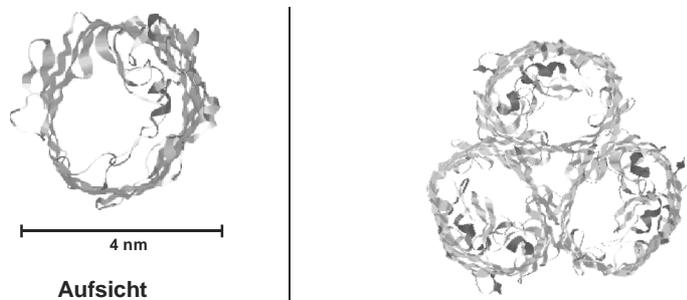


Abb. 16: 3-dimensionale Struktur des Phosphoporins PhoE von *E. coli* aus röntgenkristallografischen Untersuchungen (Cowan et al., 1992) (A) und eines OmpF-Trimers (B).

In den letzten Jahren wurde zuweilen kontrovers diskutiert, welche Aufgaben einzelne funktionale Gruppen der Porinmoleküle haben. Aus röntgenkristallografischen Untersuchungen ist bekannt, daß sich einer der extrazellulären Loops (L3) in das Innere der Pore zurückfaltet. Lange Zeit wurde vermutet, daß dieser Loop verantwortlich dafür

ist, daß die Porine im Falle hoher transmembraner Spannungen oder ungünstiger pH-Werte schließen. Neuere rasterkraftmikroskopische Untersuchungen lassen jedoch vermuten, daß dies nicht der Fall ist (Müller und Engel, 1999).

Weiterhin wird diskutiert, welche Rolle LPS und insbesondere dessen Glycostruktur und physikochemischen Eigenschaften bei der Biogenese der Porine spielt. Es konnte gezeigt werden, daß im Falle des Phosphoporins PhoE von *E. coli* die Anzahl der Porine in der äußeren Membran in einer Mutante, die den LPS-Chemotyp Ra exprimiert, im Vergleich zu Tiefrauhmutanten um etwa 95% höher ist (Abb. 17 A) (De Cock et al., 1996). Ein ähnlicher Effekt wurde bereits vorher für andere Proteine der äußeren Membran gezeigt (Ames et al., 1974).

Weiterhin wurde gezeigt, daß die Faltungseffizienz von rekombinant exprimiertem und noch nicht gefaltetem PhoE in die trimerisierungsfähige, gefaltete monomere Form stark abhängig ist von der chemischen Struktur des LPS und den daraus resultierenden biophysikalischen Eigenschaften. Dabei steigt die Effizienz des Faltens mit steigender Länge des Zuckerteils (Abb. 17 B) (De Cock et al., 1999). Bereits einige Jahre vorher konnte ein Einfluß von LPS auf Faltung und Trimerisierung von OmpF-Porinen gezeigt werden (Sen und Nikaido, 1991a).

5.2. Verwendete Materialien

Unterschiedliche LPS-Chemotypen von *S. minnesota* Rauhmütanten und Re-LPS unterschiedlicher Gram-negativer Spezies, wie z.B. von *E. coli* und *P. mirabilis*, wurden

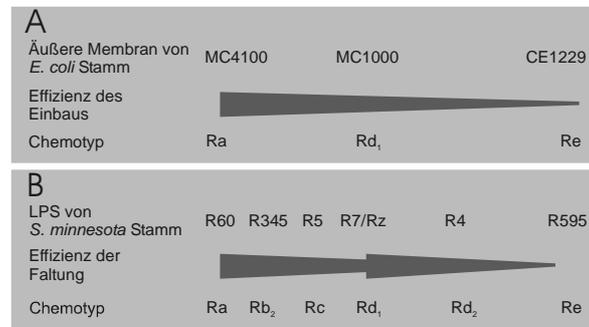


Abb. 17: Vergleich der Anzahl von PhoE-Molekülen in der äußeren Membran verschiedener Rauhmütanten-Stämme von *E. coli* (De Cock et al., 1996) (A) und Einfluß unterschiedlicher LPS-Chemotypen von *S. minnesota* auf das Faltungsverhalten von PhoE *in vitro* (De Cock et al., 1999) (B).

5. Einfluß der Glycostruktur von Lipopolysacchariden auf die Porenbildung durch Porine

für die Präparation der LPS-Seite asymmetrischer planarer LPS/PL-Doppelschichten verwendet. LPS wurde nach der Phenol/Chloroform/Petroleumether Methode (Galanos et al., 1969) hergestellt, aufgereinigt, lyophilisiert und in die Triethylamin-Salzform überführt. LPS wurde in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in Chloroform/Methanol (V:V = 10:1) aufgenommen und für 2 min auf 96°C erhitzt. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

PE von *E. coli*, PG aus Eigelb und synthetisches DPG (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Lipide wurden in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in Chloroform gelöst und bei 4°C gelagert.

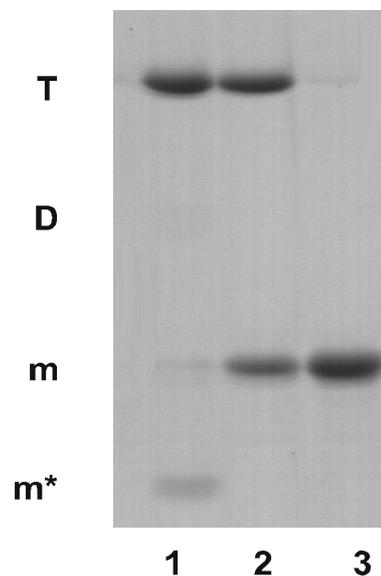


Abb. 18: SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese von *in vitro* gefaltetem und aufgereinigtem PhoE. Nach *in vitro* Faltung, Trypsinbehandlung und anschließender Aufreinigung durch Anionen-Austausch-Chromatographie wurde PhoE für 10 min bei Raumtemperatur (1), 56°C (2) bzw. 100°C (3) inkubiert und anschließend angefärbt. Die Positionen der Trimere (T), Dimere (D), Hitze-denaturierten Monomere (m) und der gefalteten Monomere (m*) sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Hans de Cock vom Institute for Biomembranes der Universität Utrecht, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

Das in dieser Arbeit verwendete LPS-freie PhoE wurde von Hans de Cock vom Institute for Biomembranes der Universität Utrecht, Niederlande, aufgereinigt (Jansen et al., 2000) und zur Verfügung gestellt. Abb. 18 zeigt das Ergebnis einer SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese Analyse der Porine, die ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Hans de Cock durchgeführt wurde. PhoE wurde in 0.15 mg/ml Triton X-100 gelöst und vor der Verwendung für mindestens 3 Tage bei 4°C gelagert.

5.3. Ergebnisse

5.3.1. Porenbildung von Phosphoporin PhoE von *Escherichia coli*

Die Porenbildung durch PhoE ist in Abb. 19 am Beispiel einer PL/LPS R60-Membran gezeigt. PhoE (13 ng/ml) wurde entsprechend den Gegebenheiten im biologischen System (Biogenese) auf die PL-Seite zugegeben. Etwa 60 bis 90 s nach der Zugabe steigt der Strom in äquidistanten Stufen an, dabei entspricht jede Stufe dem Einbau eines einzelnen Porin-Trimers, nur vereinzelt kann der gleichzeitige Einbau mehrerer Trimere beobachtet werden (entsprechend einer höheren Stufe). Ab etwa 20 min sinkt die Porenbildungsrate, bis sich schließlich ein stationärer Zustand einstellt, ab dem kein nennenswerter Einbau mehr stattfindet. Die Anzahl der Poren wurde aus Strömen durch die einzelnen Porin-Trimere (Kapitel 5.3.2) berechnet. Qualitativ ähnliche Ergebnisse ergaben sich für alle verwendeten LPS. Die Präparation planarer PL/LPS-Membranen unter Verwendung von LPS mit längerem Zuckerteil als der von LPS vom Chemotyp Ra – sogenanntes S-Form LPS – scheiterte auf Grund der vergleichsweise hohen Wasserlöslichkeit dieser Lipide. Wurde PhoE auf die LPS-Seite einer LPS/PL-Membran zugegeben, konnte bis zu einer PhoE-Konzentration von 1,3 µg/ml kein Stromfluß festgestellt werden. Da die Porine in dem Detergens Triton X-100 gelöst sind, wurde dessen Einfluß auf die Membran getestet. Die Zugabe von Triton X-100 führte bis zu einer Konzentration von 3 µg/ml zu keinem nennenswerten Stromfluß.

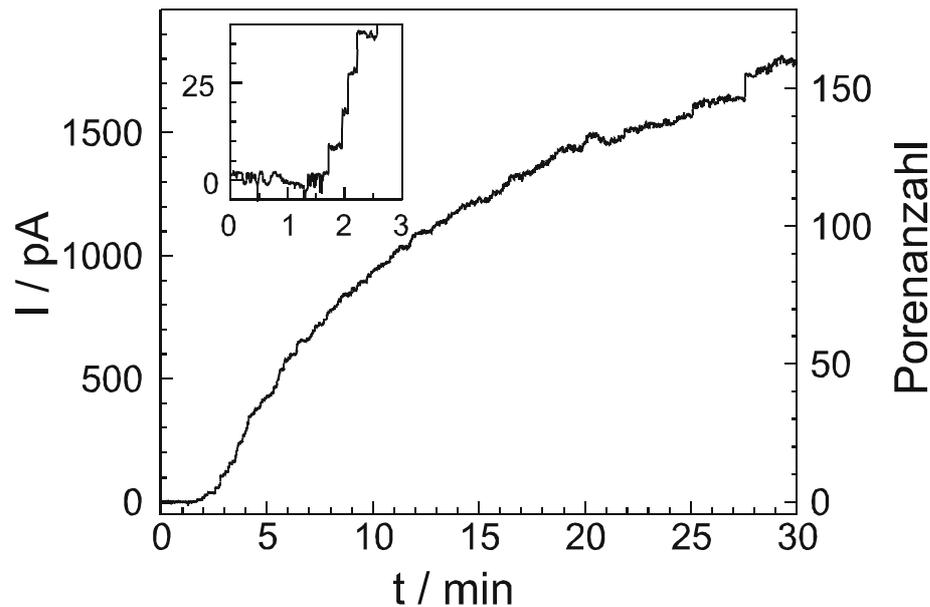


Abb. 19: Porenbildung durch PhoE in PL/LPS R60-Membranen in Abhängigkeit von der Zeit. Eine typische Kurve für den Einbau von PhoE bei einer Spannung von 20 mV ist hier am Beispiel der PL/LPS R60-Membran gezeigt. Etwa 1 bis 2 min nach der Zugabe von 13 ng/ml PhoE zur PL-Seite der Membran kommt es zu einem stufenweisen Anstieg des Membranstromes. Nach etwa 10 min verlangsamt sich die Porenbildung und kommt letztlich vollends zum Stillstand. Die PL-Seite besteht aus 81 Mol% PE, 17 Mol% PG und 2 Mol% DPG (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C).

5.3.2. Einfluß der Lipidmatrix auf die Porengröße

Abb. 20 zeigt ein typisches Amplitudenhistogramm einzelner PhoE-induzierter Stromsprünge am Beispiel der PL/LPS R60-Membranen. Der Einzelstrom wurde aus dem Histogramm durch Approximation mit einer Gauß-Funktion gewonnen.

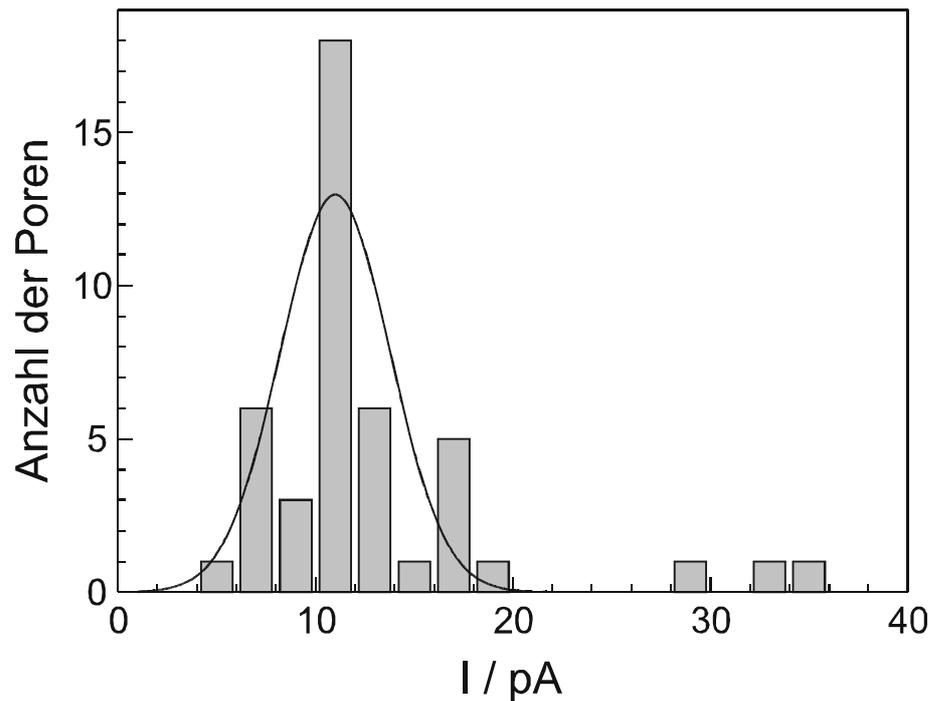


Abb. 20: Amplitudenhistogramm zur Bestimmung des Einzelkanalstromes. Der Stromfluß durch einzelne PhoE-Trimere bei 20 mV in unterschiedlichen Lipidmatrizes wurde aus den Stromspuren gewonnen. Ein typisches Histogramm ist für PL/LPS R60-Membranen gezeigt (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C).

Tab. 1: Die Einzelkanalströme I von PhoE bei 20 mV und die daraus resultierende Einzelkanalleitfähigkeit Λ in unterschiedlichen Lipidmatrizes wurde aus den Stromspuren gewonnen (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C).

Lipid	LPS F515	LPS R45	LPS R595	LPS R7	LPS R5	LPS R345	LPS R60	PG
I / pA	10,8 ± 5,0	11,2 ± 3,2	10,6 ± 5,3	10,0 ± 1,4	9,0 ± 5,0	10,4 ± 7,8	11,2 ± 2,4	7,6 ± 5,2
Λ / nS	0,54 ± 0,25	0,56 ± 0,16	0,53 ± 0,27	0,50 ± 0,07	0,45 ± 0,25	0,52 ± 0,39	0,56 ± 0,12	0,38 ± 0,26

In Tab. 1 sind die Ströme durch einzelne PhoE-Trimere und die Einzelkanalleitfähigkeit Λ für unterschiedliche Lipidmatrizes zusammengefaßt, dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Lipidzusammensetzungen beobachtet werden, lediglich für PL/PG-Membranen konnte ein geringer, jedoch nicht signifikanter Unterschied festgestellt werden.

5.3.3. Einfluß der Glycostruktur von Lipopolysacchariden auf den Einbau von Porinen in die äußere Membran Gram-negativer Bakterien

Zunächst wurde der Einfluß der Glycostruktur von LPS auf den Einbau von PhoE in LPS/PL-Membranen an Tiefrauhmutanten LPS unterschiedlicher Spezies, wie *E. coli* Stamm F515, *S. minnesota* Stamm R595 und *P. mirabilis* Stamm R45, die sich im wesentlichen in der Anzahl der nicht-stöchiometrischen Substituenten in der Kopfgruppe und der Nettoladung unterscheiden (siehe Abb. 4), untersucht. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, wie sich PhoE in PL/PG- und PL/PL-Membranen einbaut.

In Abb. 21 sind die gemittelten Werte für die Anzahl von Poren 5, 10, 15 und 20 min nach der Zugabe von 13 ng/ml PhoE zur PL-Seite von PL/LPS F515-, PL/LPS R595-, PL/LPS R45- und PL/PG-Membranen bei einer Klemmspannung von 20 mV wiedergegeben. Dabei nimmt die Porenbildung von PL/LPS F515- über PL/LPS R595- und PL/LPS R45- zur PL/PG-Membran ab. Jeder Wert entspricht dabei dem Mittel aus 3 bis 5 erfolgreichen Versuchen. Die breite Verteilung der Anzahl der Poren, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Membran eingebaut sind, läßt sich durch die eingeschränkte Reproduzierbarkeit in der Zeit erklären, die die Porine benötigen, um vom Ort der Zugabe in die Subphase zur Membran zu diffundieren. Die Werte für die symmetrische PL/PL-Membran entsprechen im wesentlichen denen für die PL/PG-Membran.

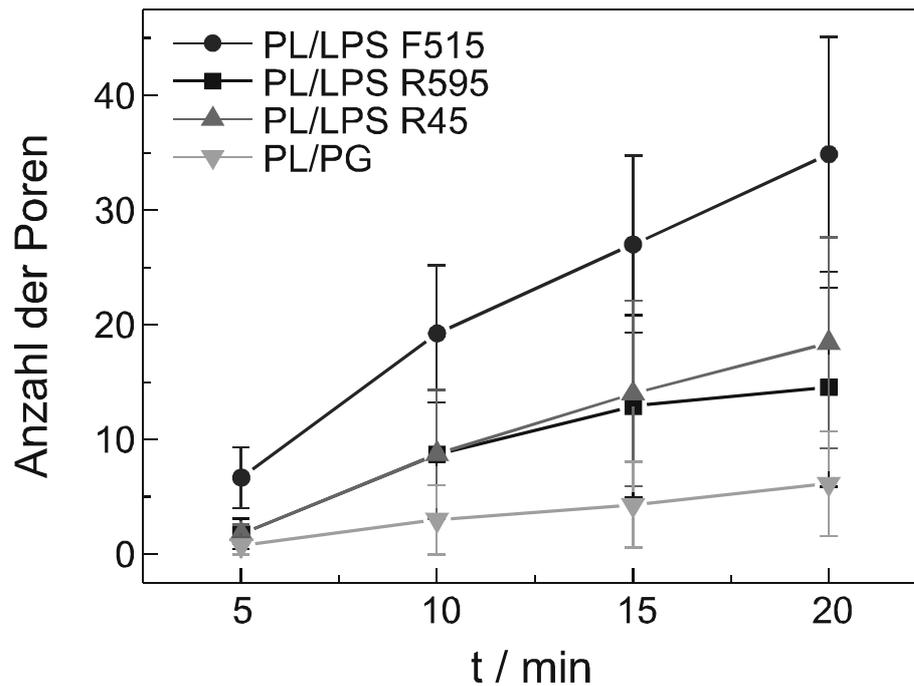


Abb. 21: Gemittelte Anzahl von Porinporen nach 5, 10, 15 und 20 min nach Zugabe von 13 ng/ml PhoE zur PL-Seite von asymmetrischen planaren PL/LPS-Membranen bei einer Klemmspannung von 20 mV. Die Seite gegenüber der Porinzugabe wurde von Re-LPS von *E. coli* Stamm F515, *S. minnesota* Stamm R595 und *P. mirabilis* Stamm R45 oder von PG als geladenem Phospholipid gebildet (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

In Abb. 22 sind die gemittelten Werte der Anzahl von Poren 5, 10, 15 und 20 min nach der Zugabe von 13 ng/ml PhoE auf die PL-Seite von PL/LPS R595-, PL/LPS R7-, PL/LPS R5-, PL/LPS R345- und PL/LPS R60-Membranen bei einer Klemmspannung von 20 mV wiedergegeben. Dabei nimmt die Porenbildung von PL/LPS R60- über PL/LPS R345-, PL/LPS R7-, PL/LPS R5- zur PL/LPS R595-Membran hin ab.

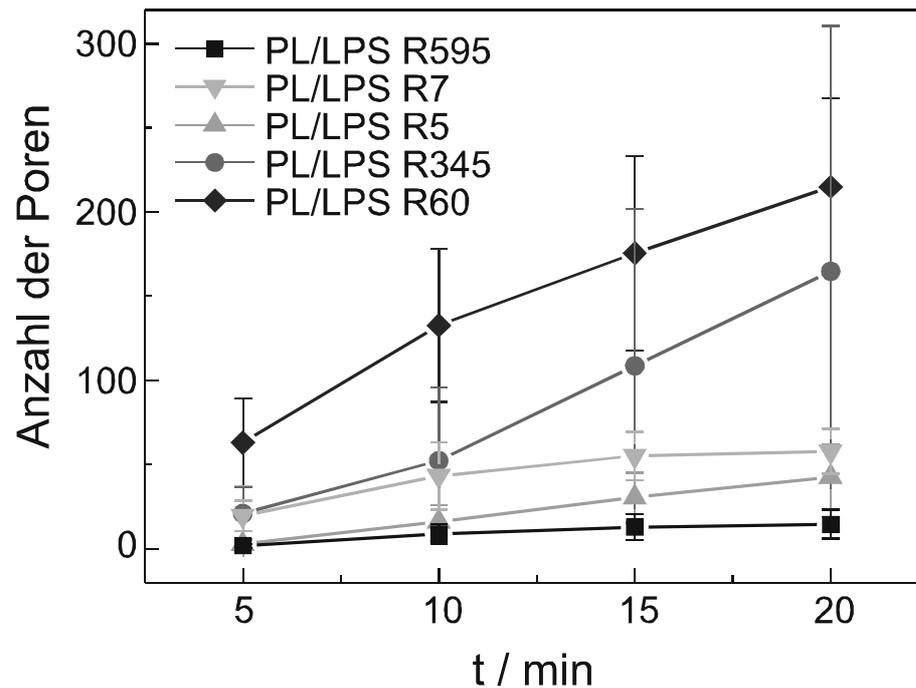


Abb. 22: Gemittelte Anzahl von Porinporen nach 5, 10, 15 und 20 min nach Zugabe von 13 ng/ml PhoE zur PL-Seite von asymmetrischen planaren PL/LPS-Membranen bei einer Klemmspannung von 20 mV. Die Seite gegenüber der Porinzugabe wurde von Rauhmутanten-LPS der *S. minnesota* Stämme R595, R7, R5, R345 bzw. R60 gebildet (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen PL/LPS Versuchen.

In Tab. 2 ist die relative Anzahl von Poren (bezogen auf PL/LPS R60-Membranen) 20 min nach Zugabe von 13 ng/ml PhoE auf die PL-Seite von PL/LPS R595-, PL/LPS R7-, PL/LPS R5-, PL/LPS R345- und PL/LPS R60-Membranen zusammengefaßt. Die Signifikanzniveaus wurden mittels *t*-Test berechnet. Dabei ergab sich, daß lediglich die Unterschiede in der Porenanzahl zwischen PL/LPS R595- und PL/LPS R60-Membranen signifikant sind. Die Signifikanzniveaus zweier benachbarter Kurven betragen 0,61 für PL/LPS R60 und PL/LPS R345, 0,60 für PL/LPS R345 und PL/LPS R7, 0,48 für PL/LPS R7 und PL/LPS R5 und 0,23 für PL/LPS R5 und PL/LPS R595. Für weiter auseinanderliegende Kurven sind die Signifikanzniveaus kleiner als 0,15 mit Ausnahme des Wertes zwischen PL/LPS R345 und PL/LPS R5 (0,34).

Tab. 2: Relative Anzahl von Poren (bezogen auf PL/LPS R60-Membranen) 20 min nach Zugabe von 13 ng/ml PhoE auf die PL-Seite von PL/LPS R595-, PL/LPS R7-, PL/LPS R5-, PL/LPS R345- und PL/LPS R60-Membranen (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C).

Lipidmatrix	PL/LPS R60	PL/LPS R345	PL/LPS R5	PL/LPS R7	PL/LPS R595
relative Porenanzahl / %	100	71	16	24	6

5.3.4. Einfluß der Glycostruktur von Lipopolysacchariden auf das Schaltverhalten von Porinen in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien

Zusätzlich zum Einbau von PhoE in die unterschiedlichen Lipidmatrizes wurde das Schaltverhalten der interkalierten Moleküle untersucht. In Abb. 23 sind die Strom/Spannungs (I/U)-Kennlinien von PhoE in unterschiedlichen Lipiddoppelschichten, deren eine Seite aus LPS der Tiefrauhmutanten Stämme F515 von *E. coli*, R595 von *S. minnesota* bzw. R45 von *P. mirabilis* besteht, gezeigt. Die Gegenseite, auf der die Zugabe des Porins erfolgte, wurde von PL gebildet.

Etwa 20 min nach Zugabe von Porin nimmt die Porenbildung stark ab oder kommt vollends zum Stillstand. Um das spannungsabhängige Schalten von PhoE-Trimeren näher zu charakterisieren, wurden in dieser Phase I/U-Kennlinie aufgenommen, dabei wurde die Spannung im Bereich von -200 mV bis +200 mV (3,2 mV/s) variiert. Alle Kurven wurden aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Membranpräparationen bestimmt. Die in Abb. 23 bis 25 gezeigten I/U-Kurven sind Mittelwerte der entsprechenden Daten. Zudem wurde für alle Datensätze der Strom auf den Wert normiert, der bei 40 mV ermittelt wurde. Bei dieser Spannung waren alle Poren in den verschiedenen Membransystemen im offenen Zustand. Generell gilt, daß

sich für kleine Klemmspannungen ($|V| < 50$ mV) der Strom proportional zur angelegten Spannung verhält, d.h. die Poren verhalten sich wie ein Ohm'scher Widerstand. Bei höheren Klemmspannungen weicht die I/U-Charakteristik der Porine allerdings vom Ohm'schen Verhalten ab, dabei steigt der Strom unterproportional an, bis schließlich mit steigender Spannung kein weiterer Anstieg des Stromes beobachtet werden kann, es kommt im Gegenteil in vielen Fällen zu einem Abfall. Die I/U-Charakteristik von PhoE zeigt einen hysteretischen Verlauf, die Effizienz des spannungsabhängigen Schaltens kann dem Einsetzen und der Form der Hystereseschleife entnommen werden.

In Abb. 23 sind die I/U-Charakteristiken von PhoE für unterschiedliche Lipidmatrizes gezeigt, deren eine Seite von PL und deren andere Seite von LPS von unterschiedlichen Rauhmutanten Stämmen von *S. minnesota* gebildet wird. Zur besseren Unterscheidbarkeit zwischen den einzelnen Kurven sind die Spannungen, bei denen die Abweichung vom linearen Verhalten im positiven V_{C+} und im negativen V_{C-} Spannungsbereich beginnt, in der Bildunterschrift angegeben. $V_{OM} = 26$ mV (Sen et al., 1988) (in Abb. 23 und 24) bzw. $V_{IM} = 100$ mV bis 150 mV (Bakker und Mangerich, 1981) (in Abb. 25) markieren die Spannung über der äußeren bzw. inneren Membran. Für negative Klemmspannungen kann so gut wie kein Schließen der Poren beobachtet werden. Für positive Klemmspannungen wird ein hysteretischer Verlauf der I/U-Charakteristik beobachtet. Die Effizienz des spannungsabhängigen Schaltens steigt mit der Länge des Zuckerteils des verwendeten LPS von LPS R595 über LPS R7 zu LPS R5. Im Falle des LPS R345 sinkt die Effizienz des Schaltens im Vergleich zum LPS R5. Im Falle des LPS R60 konnte auf Grund der Instabilität der Lipidmatrix keine I/U-Charakteristik bestimmt werden.

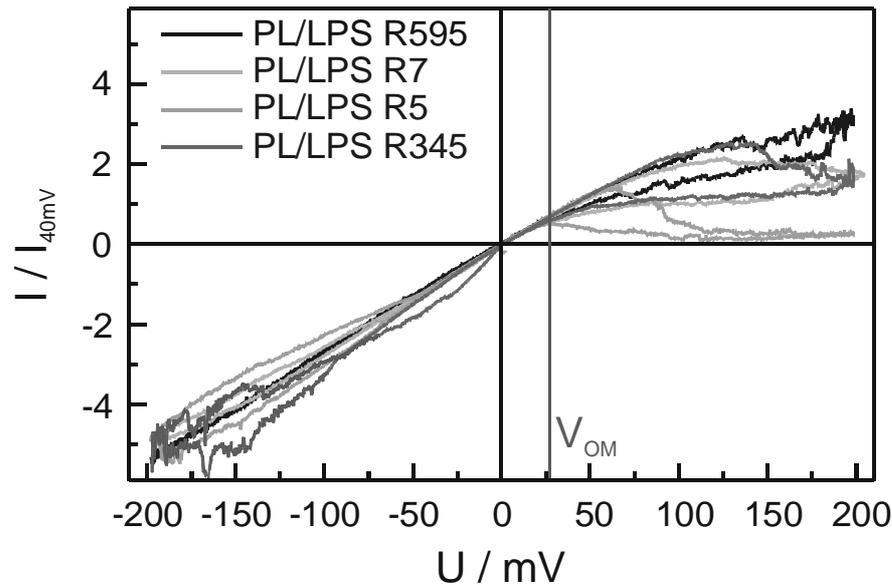


Abb. 23: Spannungsabhängiges Schließen von PhoE. Die I/U-Charakteristiken von PhoE wurden an planaren Lipiddoppelschichten durch Anlegen einer Dreiecksspannung (3,2 mV/s) an unterschiedliche Lipidmatrizes, deren eine Seite von PL und deren andere Seite von unterschiedlichen Chemotypen von LPS von Rauhmутanten von *S. minnesota* gebildet wurde, bestimmt (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C). Alle Kurven wurden mindestens 2-fach an unabhängigen Membranpräparationen aufgezeichnet, die gezeigten Daten stellen den Mittelwert aller Daten dar. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit wurde der Strom auf den Stromwert bei + 40 mV normiert. Die Klemmspannungen V_{C+} und V_{C-} sind die Spannungen, bei denen der Strom vom Ohm'schen Verlauf abweicht. Sie ergeben sich wie folgt: Rauhmутanten LPS von *S. minnesota* Stamm R595 (schwarze Kurve, $V_{C+} \sim 80$ mV, $V_{C-} < -200$ mV), Stamm R7 (blaue Kurve, $V_{C+} \sim 65$ mV, $V_{C-} \sim -150$ mV), Stamm R5 (grüne Kurve, $V_{C+} \sim 60$ mV, $V_{C-} \sim -150$ mV) und Stamm R345 (rote Kurve, $V_{C+} \sim 95$ mV, $V_{C-} \sim -145$ mV).

Abb. 24 zeigt die I/U-Charakteristiken von PhoE in unterschiedlichen Lipidmatrizes, deren eine Seite von PL und deren andere Seite von LPS-Tiefrauhmutanten unterschiedlicher Gram-negativer Spezies, z. B. *S. minnesota* Stamm R595, *E. coli* Stamm F515, *P. mirabilis* Stamm R45, gebildet wird. Die Kurve für die PL/LPS R595-Membran entspricht der in Abb. 23 gezeigten, sie ist hier nur zur Verbesserung der Übersichtlichkeit noch einmal gezeigt. Für PL/LPS R45- und PL/LPS F515-Membranen

5. Einfluß der Glycostruktur von Lipopolysacchariden auf die Porenbildung durch Porine

kann im Gegensatz zu den PL/LPS R595-Membranen ein effektives Schließen auch für negative Klemmspannungen von -100 mV bis -120 mV beobachtet werden. Im Bereich positiver Klemmspannungen zeigt insbesondere die PL/LPS F515-Membran einen starken Abfall des Stromes. Für PL/LPS R45 und PL/LPS R595 kann lediglich ein stationärer Zustand beobachtet werden, der hysteretische Charakter der I/U-Kurve ist somit auch wesentlich geringer ausgeprägt.

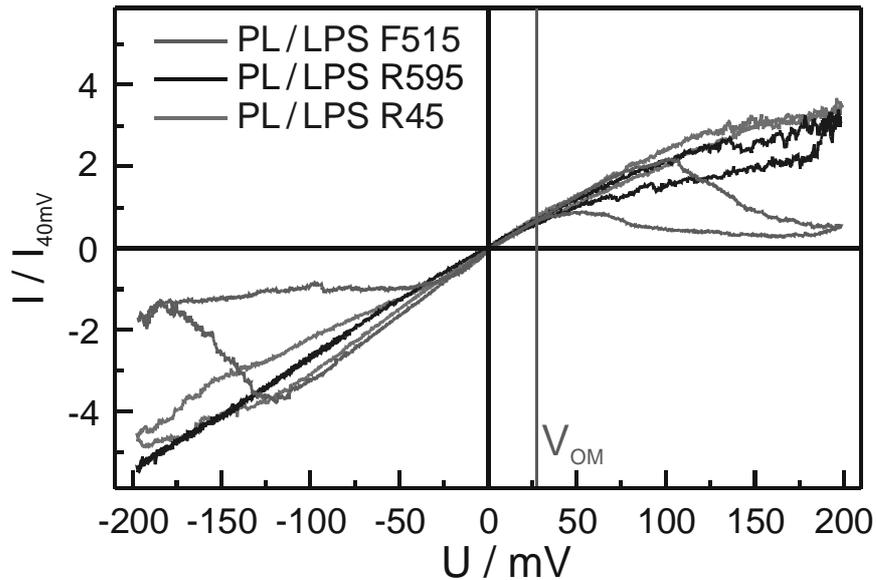


Abb. 24: Spannungsabhängiges Schließen von PhoE. Die I/U-Charakteristiken von PhoE wurden an planaren Lipiddoppelschichten durch Anlegen einer Dreiecksspannung ($3,2$ mV/s) an unterschiedliche Lipidmatrizes, deren eine Seite von PL und deren andere Seite von LPS von Tiefrauhmutanten unterschiedlicher Spezies gebildet wurde, bestimmt (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, pH 7.0, $T = 37^\circ C$). Die Bestimmung der Kurven aus den Rohdaten erfolgte wie für Abb. 23 beschrieben. Die Klemmspannungen V_{C+} und V_{C-} sind die Spannungen, bei denen der Strom vom Ohm'schen Verlauf abweicht. Sie ergeben sich wie folgt: Tiefrauhmutanten LPS von *E. coli* Stamm F515 (grüne Kurve, $V_{C+} \sim 100$ mV, $V_{C-} \sim -110$ mV), *S. minnesota* Stamm R595 (schwarze Kurve, $V_{C+} \sim 80$ mV, $V_{C-} < -200$ mV), *P. mirabilis* Stamm R45 (blaue Kurve, $V_{C+} \sim 80$ mV, $V_{C-} \sim 120$ mV).

In Abb. 25 sind die I/U-Charakteristiken von PhoE in Lipidmatrizes dargestellt, deren eine Seite von PL und deren Gegenseite von LPS von *E. coli* Stamm F515, von PG als

geladenem Phospholipid bzw. von PL gebildet wird. Die für die PL/LPS F515-Membranen gezeigte Kurve ist mit der in Abb. 24 gezeigten Kurve identisch. Für die beiden Phospholipidsysteme wird ein ähnlich effizientes Schalten wie für die PL/LPS F515-Membranen beobachtet. Allerdings zeigt sich für negative Spannungen für die asymmetrische PL/PG-Membran ein wesentlich stärker ausgeprägtes Schalten als für die symmetrische PL/PL-Membran, was zu einer Asymmetrie in der I/U-Charakteristik im letzteren Fall führt.

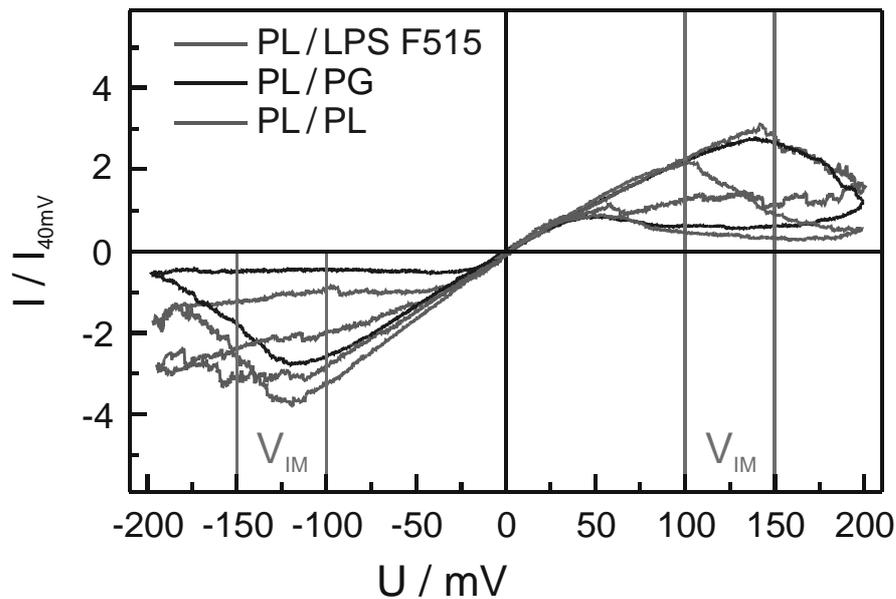


Abb. 25: Spannungsabhängiges Schließen von PhoE. Die I/U-Charakteristiken von PhoE wurden an planaren PL/LPS-Doppelschichten durch Anlegen einer Dreiecksspannung (3,2 mV/s) an unterschiedliche Lipidmatrizes, deren eine Seite von PL und deren andere Seite von unterschiedlichen Phospholipiden und Tiefrauhmutenten von *E. coli* gebildet wurde, bestimmt (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C). Die Bestimmung der Kurven aus den Rohdaten erfolgte wie für Abb. 23 beschrieben. Die Klemmspannungen V_{C+} und V_{C-} sind die Spannungen, bei denen der Strom vom Ohm'schen Verlauf abweicht. Sie ergeben sich wie folgt: Tiefrauhmutanten LPS von *E. coli* Stamm F515 (grüne Kurve, $V_{C+} \sim 100$ mV, $V_{C-} \sim -110$ mV), PG (schwarze Kurve, $V_{C+} \sim 110$ mV, $V_{C-} \sim 100$ mV), und PL (rote Kurve, $V_{C+} \sim 125$ mV, $V_{C-} \sim -115$ mV).

5.4. Diskussion

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Untersuchungen publiziert, die zu einem tieferen Verständnis der Biogenese von Porinen beitragen konnten. In Untersuchungen zur Faltung in Bakterienkulturen (*in vitro*) konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit von LPS im Periplasma für ein korrektes und effizientes Falten von PhoE in eine monomere, trimerisierungsfähige Zwischenform notwendig ist (De Cock et al., 1999). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß die Anwesenheit von LPS einen Einfluß auf das Falten und die Trimerisierung von OmpF hat (Sen und Nikaido, 1991a). In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht, insbesondere die chemische Struktur des LPS auf der der Zugabe des Porins abgewandten Seite eine wichtige, möglicherweise die entscheidende Rolle für den Einbau und/oder spätere Schritte der Porenbildung durch PhoE spielt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß die Zusammensetzung der Lipidmatrix einen Einfluß auf das elektrische Schaltverhalten, nicht aber auf die Leitfähigkeit der PhoE-Trimere hat.

In Untersuchungen an Bakterienkulturen konnte demonstriert werden, daß die Effizienz des Einbaus von *in vitro* synthetisiertem PhoE in die äußere Membran von unterschiedlichen Mutanten von *E. coli* von der Ra-Mutante zur Re-Mutante um 95% abnimmt (De Cock et al., 1996). In diesem System konnte jedoch nicht zwischen Faltung, Trimerisierung und Einbau in die äußere Membran unterschieden werden. Dieser Effekt wurde durch eine verminderte Anzahl von sogenannten „insertion sites“ in einer Re-Mutante im Vergleich zur Ra-Mutante erklärt. In der Folge konnte nachgewiesen werden, daß LPS für frühe Schritte in der Faltung, der Bildung eines gefalteten Monomers, notwendig ist (De Cock und Tommassen, 1996). Dabei ist LPS vom Chemotyp Re weit weniger effizient als LPS vom Chemotyp Ra (De Cock et al., 1999). In der vorliegenden Untersuchung konnte nun gezeigt werden, daß die Zusammensetzung der Lipidmatrix einen starken Einfluß auf spätere Schritte der Porinbiogenese, den Einbau und/oder die Porenbildung von *in vitro* gefaltetem, LPS-freiem Porin hat. Die Effizienz der Porenbildung durch PhoE unterscheidet sich für Lipidmatrizes, die unterschiedliche Chemotypen von LPS von *S. minnesota* enthalten. Dabei gilt: die Anzahl der Poren zu einem bestimmten Zeitpunkt sinkt von Ra-LPS (LPS R60) zu Re-LPS (LPS R595) (Abb. 22). Auf Grund der teilweisen Überlappung

der Fehlerbalken kann keine quantitative Korrelation zwischen Porenbildung und Lipidzusammensetzung für Kurven, die zu benachbarten Chemotypen gehören, aufgestellt werden. Mit steigender struktureller Distanz zwischen den Chemotypen sinken jedoch die Signifikanzniveaus bis auf $p < 0,01$ zwischen LPS R60 und LPS R595. Auf Grund dieser Tatsache und dem Fakt, daß die Reihenfolge in der Anzahl der Poren, die in eine Lipidmatrix eingebaut sind, zu jedem Zeitpunkt gleich ist, kann geschlossen werden, daß die Lipidmatrix – also die Struktur der Seite der Porinzugabe gegenüberliegenden LPS – die Effizienz des Einbaus von Porin in die äußere Membran bestimmt. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß LPS mit einer langen Zuckerkette alle Schritte der Porinbiogenese begünstigt.

Nun stellt sich die Frage, welche physikochemischen Eigenschaften der Membran für diesen Effekt verantwortlich sind. In erster Linie werden im folgenden die Einflüsse der Membranfluidität und der Oberflächenladungsdichte, aber auch von Parametern wie der Membranstabilität diskutiert, wobei insbesondere die Eigenschaften der LPS-Seite berücksichtigt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß ein Anstieg der Membranfluidität die Bildung lytischer Poren durch das Komplementsystem begünstigt (Wiese et al., 2001). Dieser Parameter kann jedoch nicht erklären, warum die Porenbildung durch PhoE mit der Länge der Zuckerkette des LPS korreliert, da sich die Membranfluidität für die verwendeten LPS nur sehr wenig unterscheidet (Brandenburg et al., 1997). Des Weiteren konnte die geringste Effizienz für PL/Pg- und PL/PL-Membranen beobachtet werden, die die höchste Fluidität aller verwendeter Lipidmatrizes aufweisen.

Im Falle asymmetrischer PL/LPS-Membranen entsteht auf Grund der höheren Oberflächenladungsdichte der LPS-Seite im Vergleich zur PL-Seite ein Potentialgradient, folglich kann für den Einfluß der Zuckerkette auf die Porenbildung eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der negativen Ladungen und der Porenbildung erwartet werden. LPS R60 und LPS R345, welche die höchste Porenbildungsrate von PhoE verursachten, tragen mindestens 5 negative Ladungen, LPS R7, LPS R5 und LPS F515, welche 4 negative Ladungen tragen, befinden sich im mittleren Bereich und LPS R595 und LPS R45, die weniger als 4 negative Ladungen tragen, zeigen die geringste Porenbildungsrate. Auch die Abnahme der Porenbildungsrate bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen läßt sich durch eine Abnahme der negativen Ladungen auf der LPS-Seite erklären. Es muß jedoch erwähnt werden, das sich beispielweise die Unterschiede in der Porenbildung durch PhoE in PL/LPS R60-

Membranen im Vergleich zu PL/LPS R345-Membranen ebensowenig durch Ladungseffekte erklären lassen, wie die nahezu identischen Porenbildungsraten in PL/LPS R595- und LP/LPS R45-Membranen. Des Weiteren ist aus den I/U-Kennlinien zu entnehmen, daß ein hohes Transmembranpotential (bis zu ± 200 mV) keine weitere Porenbildung verursacht (Abb. 23 bis 25). Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, daß weniger der Potentialgradient als vielmehr spezifische Wechselwirkungen zwischen funktionalen Gruppen der Porinmoleküle mit den Ladungen des LPS und den zweiwertigen Kationen das Porin in seiner funktionalen, transmembranen Konfiguration stabilisieren (Weiss et al., 1991; Weiss und Schulz, 1992). Solche spezifischen Wechselwirkungen können möglicherweise auch erklären, warum die Porenbildungsrate in PL/LPS R7-Membranen geringfügig höher ist als die Porenbildungsrate in PL/LPS R5-Membranen, obwohl LPS R5 eine zusätzliche Glukose in der Kopfgruppe trägt.

Neben der Membranfluidität und der negativen Oberflächenladung gibt es eine Reihe weiterer struktureller Parameter, die einen Einfluß auf die Porenbildung haben können. So kann beispielsweise die Stabilität der LPS-Seite der PL/LPS-Membran durch die Länge der Zuckerkette beeinflusst werden, da eine längere Zuckerkette eine Erhöhung der Hydrophilie bedeutet. Zudem kommt es auf Grund der steigenden Nettoladung zu einer stärkeren Abstoßung zwischen den einzelnen Lipidmolekülen. Im Zusammenhang mit der Membranstabilität kann auch die reduzierte Porenbildung in PL/LPS F515-Doppelschichten, die in Subphasen mit erhöhter Mg^{2+} -Konzentration präpariert wurden, verstanden werden, da die erhöhte Konzentration zweiwertiger Kationen zu einer Stabilisierung der Membran durch eine erhöhte Quervernetzung der Lipidmoleküle beiträgt (Nikaido und Vaara, 1985). Eine Reduzierung der Stabilität der LPS-Seite kann (i) die Porenbildung von bereits in die PL-Seite eingebauten Porinen begünstigen und (ii) die Stabilität der gesamten Membran verändern und somit die Insertion und die Porenbildung erleichtern. Die erste Möglichkeit scheint allerdings unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, daß die Membranen von Re-Mutanten geringere Konzentrationen an PhoE (Tommasen und Lugtenberg, 1981; Korteland und Lugtenberg, 1984) und anderen Proteinen der äußeren Membran (Ames et al., 1974) enthalten, was darauf hindeutet, daß sich diese Proteine gar nicht erst in die Membran einbauen.

Der Unterschied zwischen den PL/LPS R595- und PL/LPS R45-Membranen auf der einen und der PL/LPS F515-Membran auf der anderen Seite kann durch die

Anwesenheit einer zusätzlichen L-Arap4N am Lipid A-Teil erklärt werden, der die Nettoladung von -4 auf $-3,5$ verringert. Die zweite L-Arap4N am ersten Kdo des LPS R45, welcher die Nettoladung auf -3 reduziert, scheint dagegen keinen Einfluß auf die Porenbildungsrate zu haben. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß der destabilisierende Effekt der höheren Nettoladung des LPS R595 durch eine zusätzliche Fettsäure kompensiert wird.

Die hier gezeigten Ergebnisse erlauben auch, eine Frage zu beantworten, die von Korteland und Lugtenberg (1984) aufgebracht worden ist. Diese Autoren konnten in *in vivo* Untersuchungen zeigen, daß die Aufnahme von negativ geladenen Substanzen durch PhoE in Re-Mutanten am effizientesten ist. Für diesen Effekt wurden drei mögliche Erklärungen diskutiert: (i) ein erhöhter effektiver Durchmesser der Pore in Re-Mutanten, (ii) eine höhere Anzahl an offenen und funktionalen Poren oder (iii) eine Reduzierung der sterischen Hinderung durch die Zuckerkette und den Verlust von negativen Ladungen, der zu einer reduzierten Ladungsabstoßung führt. Aus den hier gezeigten Daten wird klar, daß sich weder der Durchmesser der Pore signifikant ändert (Tab. 1) noch die Anzahl von Poren steigt (Abb. 21). Dies macht Möglichkeit (iii) wahrscheinlich.

In Gram-negativen Bakterien ist der periplasmatische Raum stark anionisch im Vergleich zum Außenmedium, in erster Linie auf Grund der Anwesenheit der sogenannten anionischen „Membrane-derived Oligosaccharides“ (Mdo). Diese Mdo tragen zum Transmembranpotential V_{OM} über der äußeren Membran bei. Für *E. coli* wurde für V_{OM} in der Anwesenheit einer Kationenkonzentration im Außenmedium von 100 mM ein Wert von 26 mV (innen negativ) bestimmt (Sen et al., 1988). Für die innere Membran wird ein Wert von bis zu 150 mV (innen negativ) diskutiert (Bakker und Mangerich, 1981).

Für alle hier untersuchten Lipidmatrizes ist die Spannung, die für das Schließen der Porinkanäle notwendig ist, dem Betrage nach größer als 50 mV. Dies läßt den Schluß zu, daß alle in die Lipidmatrix eingebauten PhoE-Porine sich im offenen Zustand befinden und sie aus diesem Grunde keine regulatorische Funktion für die Transmembranspannung über der äußeren Membran haben. Interessanterweise beträgt die Spannung, die für das Schließen von PhoE in PL/PL-Membranen notwendig ist, in beiden Richtungen weniger als 125 mV. Dies ist der Bereich, der für die Transmembranspannung über der inneren Membran diskutiert wird. Ähnliche Werte

wurden bereits in Patch-clamp Experimenten an Riesenvesikeln aus Azolectin (einem natürlichen Lipidgemisch) gefunden (Berrier et al., 1997). Dies untermauert die Vermutung (Eppens et al., 1997), daß das spannungsgesteuerte Schließen der Porine ein Schutzmechanismus ist, der die innere Membran vor einem Kurzschluß durch fälschlich in die Membran inkorporierte Porine schützt. Somit ist die innere Membran durch zwei Mechanismen geschützt, (i) die reduzierte Porenbildung in PL/PL-Membranen im Vergleich zu PL/LPS-Membranen und (ii) das spannungsabhängige Schließen von zufällig in die innere Membran inkorporierten Porinmolekülen. Aus der Asymmetrie der I/U-Kennlinie von PhoE in symmetrischen PL/PL-Membranen kann zudem auf einen gerichteten Einbau der Porinmoleküle geschlossen werden. Ein solcher Effekt wurde im Detail für Porin von *Paracoccus denitrificans* untersucht (Wiese et al., 1994).

Auch für das Schaltverhalten der Porine stellt sich die Frage, welche physikochemischen Eigenschaften der Membran diesen Prozeß bestimmen. Auch in diesem Falle scheinen Oberflächenladungsdichte und Membranfluidität mögliche Einflußfaktoren zu sein. Auch spezifische Interaktionen zwischen funktionalen Gruppen der Porin- und der LPS-Moleküle – beispielsweise durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäuren in den Loops der Porine und Phosphaten oder L-Arap4N an den LPS-Molekülen – können nicht ausgeschlossen werden.

Für Porin von *P. denitrificans* konnte zudem eine Korrelation zwischen Oberflächenladungsdichte der Glycolipidseite und dem Schalten der Porine nachgewiesen werden, wenn die LPS-Seite der Membran auf einem negativen Potential gegenüber der PL-Seite ist (Wiese et al., 1994 und 1996). Diese Untersuchungen waren jedoch beschränkt auf Re-LPS und ein Glycosphingolipid, das GSL-1. Aus Abb. 24 ist ersichtlich, daß unter identischen Bedingungen (positive Spannung, LPS-Seite negativ) auch für PhoE-Kanäle das Schließen am ausgeprägtesten für LPS F515 ist, welches 4 negative Ladungen trägt und über LPS R595 zum LPS R45 (3 negative Ladungen) hin abnimmt. Für PhoE-Moleküle, die sich in einer PL/LPS-Doppelschicht befinden, dessen LPS von unterschiedlichen Rauhmütantenstämmen von *S. minnesota* stammt, ist das Schließen am effizientesten in PL/LPS R5-Membranen, gefolgt von PL/LPS R7. Die geringste Effizienz wurde für PL/LPS R595 gefunden. Alle LPS tragen 3 bis 4 negative Ladungen. Der Anstieg der negativen Ladung zwischen diesen LPS bis zum LPS R345 führt zu einem verringerten Schließen im Vergleich zum LPS R5. Des Weiteren wurde

das effizienteste Schließen für PL/PG-Membranen beobachtet, trotz der Tatsache, daß die Oberflächenladungsdichte von PG geringer ist als die von LPS R45.

Interessanterweise scheint im positiven Spannungsbereich die Spannung, die notwendig ist, um ein Schließen der Poren in Membranen zu induzieren, deren LPS-Seite von LPS der *S. minnesota* Stämme R595, R7 bzw. R5 gebildet wird, mit steigender Länge der Zuckerkette zu steigen. Diese Daten zeigen, daß nicht nur für die Porenbildung, sondern auch für das spannungsabhängige Schließen der Porinmoleküle neben der Oberflächenladungsdichte auch funktionale Gruppen am LPS verantwortlich sind.

Für negative Klemmspannungen bis zu -200 mV kann für LPS von *S. minnesota* praktisch kein Schließen beobachtet werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die für LPS F515, LPS R45 und PG gefunden wurden, die auch im negativen ein ausgeprägtes Schließen bewirken. Dieser Effekt kann beispielsweise durch mechanischen Streß durch die zusätzliche Fettsäure am LPS von *S. minnesota* erklärt werden. Ein Einfluß der Fettsäureregion der Lipidmatrix konnte auch für Porin von *P. denitrificans* nachgewiesen werden (Wiese et al., 1994). In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß ein Schließen bei Temperaturen unterhalb des Phasenüberganges komplett inhibiert werden konnte.

Die hier gezeigten Daten zeigen deutlich, daß LPS eine entscheidende Rolle bei der Porenbildung durch PhoE und der Funktion des Porins in der Membran spielt. Insbesondere die Korrelation zwischen dem Einbau in PL/LPS-Membran und den *in vivo* gefundenen Porinkonzentrationen in der äußeren Membran unterschiedlicher Rauhmutanten von *E. coli* zeigen, daß LPS eine wichtige, wenn nicht gar die entscheidende Rolle in diesem späten Schritt der Porinbiogenese spielt und daß keine weiteren Bindungs- oder Eindringstellen notwendig sind, um diesen Effekt zu erklären. Zudem beeinflußt die chemische Struktur von LPS nicht nur den Einbau sondern auch die Funktion der eingebauten Poren. Dies verdeutlicht, daß es unumgänglich ist, bei allen Untersuchungen zur Funktionsweise von Porinen der Asymmetrie der äußeren Membran Rechnung zu tragen. Dies unterstreicht zudem die besondere Rolle der Methode von Montal und Mueller zur Präparation planarer Lipiddoppelschichten, die derzeit die einzige Methode darstellt, mit der sich asymmetrische Lipidmatrizes präparieren lassen.

6. Bestimmung der intrinsischen

Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$

asymmetrischer Lipiddoppelschichten

Die IFC-Methode zur Bestimmung von $\Delta\Psi$ bietet im Vergleich zur Carrier-Transport-Methode zur Bestimmung von $\Delta\Phi$ einige wesentliche Vorteile. So werden beispielsweise weder Sondenmoleküle (z.B. Carriermoleküle wie Nonactin oder Valinomycin) benötigt, noch ist diese Methode auf Subphasen beschränkt, die bestimmte Ionen enthalten. Einer der wesentlichen Vorteile ist jedoch, dass die IFC-Methode erlaubt, $\Delta\Psi$ zeitaufgelöst zu messen, was zusätzliche Informationen über die zu untersuchenden biologischen Prozesse liefert. Des Weiteren bietet die IFC-Methode die Möglichkeit, $\Delta\Psi$ und C simultan zu bestimmen.

Es muß jedoch erwähnt werden, daß keine der beiden Methoden eine Untersuchung an einem elektrisch ungestörten System erlaubt. In beiden Fällen werden relativ hohe Klemmspannungen im Vergleich zur Transmembranspannung *in vivo* an die Membran angelegt, die eine Umorientierung von Peptiden/Proteinen auf der Membranoberfläche und ein Eintauchen in die Membran verursachen können mit der möglichen Folge von Läsionsbildungen. Weiterhin muß erwähnt werden, daß ein Einfluß des Carriers Nonactin in einem K^+ -freien System nicht beobachtet werden konnte, d.h. daß die Anwesenheit der Carriermoleküle keine meßbare Beeinträchtigung der Meßmethode darstellt.

Im Folgenden werden nun Ergebnisse vorgestellt, die Rückschlüsse auf die Vergleichbarkeit von $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ zulassen. Anhand eines einfachen Modells sollen dann mögliche Gründe für die Unterschiede zwischen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ für asymmetrische LPS/PL-Membranen diskutiert werden.

6.1. Verwendete Materialien

Re-LPS von *E. coli* Stamm F515, *S. minnesota* Stamm R595 und *P. mirabilis* Stamm R45 wurde wie in Kapitel 5.2 beschrieben verwendet.

PE von *E. coli*, PG aus Eigelb, synthetisches DPG, synthetisches Diphytanoylphosphatidylcholin (DPhyPC) und Phosphatidylserin (PS) aus Schweinehirn (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Lipide wurden in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in Chloroform gelöst und bei 4°C gelagert.

Nonactin wurde in einer Konzentration von 1 mM in Methanol gelöst, die Gebrauchslösung wurde mit der bei den Untersuchungen verwendeten Subphase auf eine Konzentration von 10^{-5} M verdünnt. Beide Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

6.2. Ergebnisse und Diskussion

Abweichend von der Gliederung der anderen Teile dieser Arbeit werden hier die Präsentation der Ergebnisse und die Diskussion zu einem Kapitel zusammengefaßt, da hier anhand der Daten und deren Auswertung ein Modell zum intrinsischen Potentialprofil über einer LPS/PL-Membran erarbeitet werden soll, mit dessen Hilfe sich die beobachteten Effekte erklären lassen.

$\Delta\Psi$ und $\Delta\Phi$ wurden für unterschiedliche asymmetrische Lipiddoppelschichten bestimmt. In Abb. 26 sind die Werte von $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ für planare Membranen, deren eine Seite aus LPS F515 von *E. coli*, LPS R595 von *S. minnesota* oder LPS R45 von *P. mirabilis* sowie PS, PG oder DPhyPC und deren andere Seite aus PL bestand, gezeigt. $\Delta\Psi$ (dunkelgraue Balken) wurde per IFC-Methode bestimmt, $\Delta\Phi$ (hellgraue Balken) nach der Carrier-Transport-Methode an Nonactin-dotierten Membranen. Man erkennt, das sich $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ im Falle der Phospholipid/PL-Membran zwar im Betrag unterscheiden, nicht aber im Vorzeichen. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ im Falle der LPS/PL-Membran sowohl im Betrag als auch im Vorzeichen.

6. Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ asymmetrischer Lipiddoppelschichten

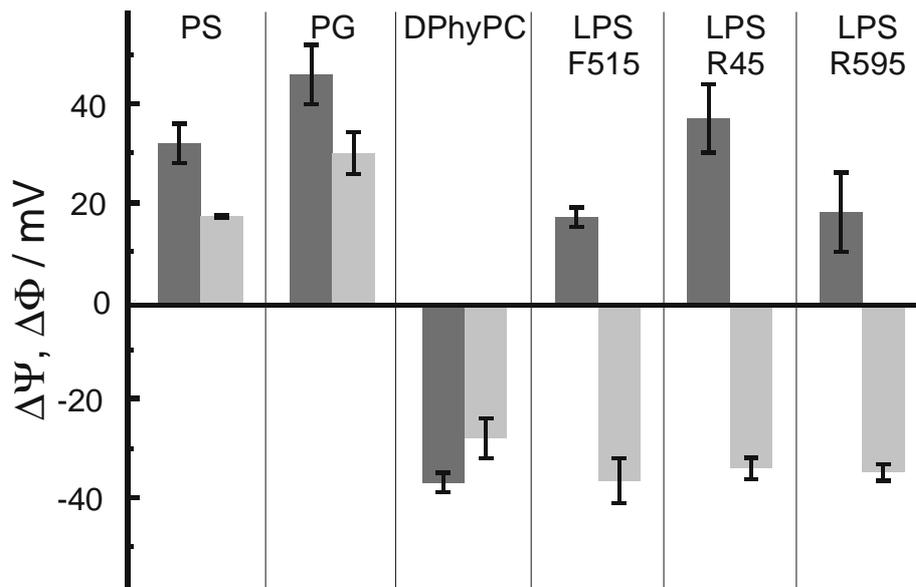


Abb. 26: Vergleich zwischen den intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ (hellgraue Balken) und $\Delta\Psi$ (dunkelgraue Balken), die für unterschiedliche asymmetrische Membranen, deren eine Seite jeweils von einem Phospholipid bzw. Lipopolysaccharid und deren andere Seite von PL gebildet wurden. Die PL-Seite bestand aus 81 Mol% PE, 17 Mol% PG und 2 Mol% DPG (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C).

In Abb. 27 sind die Werte von $\Delta\Psi$ und $\Delta\Phi$ für Phospholipid/PL-Membranen gegeneinander aufgetragen. Über eine lineare Kurvenanpassung ergab sich $\Delta\Psi = (1,50 \pm 0,12) \Delta\Phi$ (mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,998$). Interessanterweise konnte eine solche positive lineare Korrelation zwischen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ nur für Phospholipid/PL-Membranen festgestellt werden, wobei die beiden Werte zudem mit der Oberflächenladungsdichte der Phospholipidseite korrelierten. Im Gegensatz dazu wurde für LPS/PL-Membranen keine Korrelation zwischen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ gefunden, lediglich die Werte von $\Delta\Psi$ korrelierten qualitativ mit der Oberflächenladungsdichte der LPS-Seite.

6. Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ asymmetrischer Lipiddoppelschichten

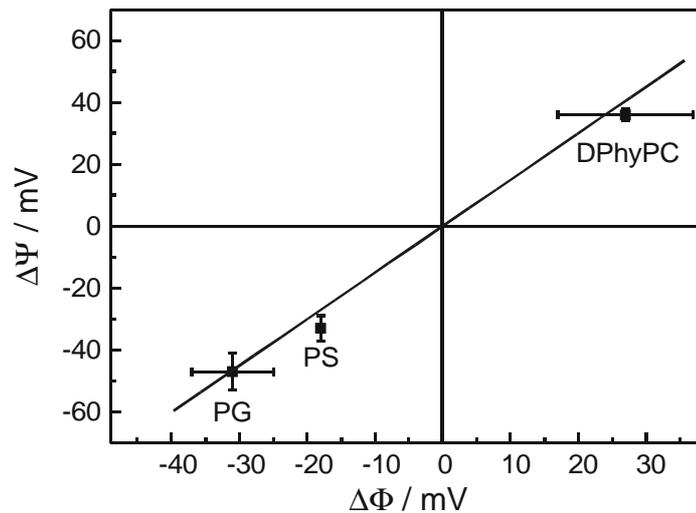


Abb. 27: Korrelation zwischen den intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Psi$ und $\Delta\Phi$, die nach der IFC-Methode bzw. der Carrier-Transport-Methode für PS/PL-, PG/PL- und DPhyPC/PL-Membranen ermittelt wurden (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C). Über eine lineare Kurvenanpassung (durchgezogene Linie) ergab sich $\Delta\Psi = (1,50 \pm 0,12) \Delta\Phi$; (R = 0,998).

Auffällig ist, daß die Werte von $\Delta\Psi$ und $\Delta\Phi$ für PS/PL- und PG/PL-Membranen unterschiedlich sind, für $\Delta\Psi$ beträgt der Unterschied ungefähr 14 mV, für $\Delta\Phi$ etwa 13 mV, obwohl die Nettoladung der beiden Lipide PS und PG jeweils -1 beträgt. Dieser Unterschied läßt sich jedoch durch Unterschiede in der Größe der Kopfgruppe (bestimmt aus Monofilisothermen an einer Langmuir-Filmwaage) erklären. Aus diesen Größenunterschieden ergeben sich wiederum Unterschiede im Gouy-Chapman-Potential, dabei wurden Werte von - 150 mV für PG und - 141 mV für PS, d.h. ein Unterschied von 9 mV berechnet. Weitere Beiträge können aus Unterschieden im Born- und im Dipol-Potential der beiden Monoschichten resultieren.

Über das Potentialprofil über einer LPS/PL-Membran ist bis heute wenig bekannt. Auf der Basis des Modells von Schoch et al. (1979) für Phospholipidmembranen (Abb. 28 A) läßt sich jedoch ein komplexeres Modell für die LPS/PL-Membranen

(Abb. 28 B) konstruieren, wobei der trapezförmige Verlauf des Potentialprofils und der Beitrag der PL-Seite unverändert bleiben. Auf Grund der komplexeren Struktur der

6. Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ asymmetrischer Lipiddoppelschichten

Kopfgruppe des LPS (Abb. 4), insbesondere der Größe und der Verteilung der negativen Ladungen im Lipid A Teil und dem Kdo-Disaccharid, wurde der Bereich der Kopfgruppe im Potentialprofil verbreitert. Insbesondere das Gouy-Chapman-Modell – basierend auf der Annahme, daß die Membranoberfläche auf molekularer Ebene glatt ist – könnte beeinflußt werden. In dem Modell in Abb. 28 B wurde zunächst nur berücksichtigt, daß das Gouy-Chapman-Potential negativ ist und sein Beitrag geringer ist als der des Dipol-Potentials. Aus diesem Grunde steigt das Potential im Bereich der LPS-Kopfgruppe von einem negativen auf einen positiven Wert. In Ermangelung genauerer Angaben über den exakten Verlauf des Potentialprofils in der Kopfgruppenregion wurde für den Anstieg ein linearer Verlauf als erste Näherung gewählt.

Der K^+ -Carrier Nonactin ist ein Molekül mit definierter geometrischer Abmessung, die geringer ist als die Dicke von Phospholipidmembranen. Aus diesem Grund wird der Carrier-Transport in erster Linie durch die Potentialdifferenz zwischen den beiden Punkten n_1 und n_2 im hydrophoben Bereich der Doppelschicht bestimmt und die weiter außen liegende Kopfgruppe spielt dabei lediglich eine untergeordnete Rolle. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, daß sich die drei verschiedenen LPS, welche sich in erster Linie in ihrer Kopfgruppe und nicht in ihrem hydrophoben Bereich (Abb. 4) unterscheiden, ähnliche Werte für $\Delta\Phi$ besitzen (Abb. 26). Im Gegensatz dazu wird die Spannungsabhängigkeit der Kapazität, auf der die IFC-Methode beruht, im wesentlichen durch elektromechanische Eigenschaften der Membran bestimmt (Alvarez und Latorre, 1978). Deshalb ist es möglich, daß $\Delta\Psi$ zwischen den Punkten n_1^* und n_2^* in der Membran bestimmt wird. Im Falle der Phospholipidmembran liegen die Positionen n_1 und n_1^* sowie n_2 und n_2^* jedoch eng zusammen, so daß sich nur ein geringer Unterschied zwischen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ ergibt. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich im Fall von LPS/PL Membranen n_1 und n_1^* signifikant, wobei n_1^* in der Kopfgruppenregion der LPS-Schicht liegt (Abb. 28). Diese Annahme wird von den Ergebnissen in Abb. 26 unterstützt, die zeigen, daß sich $\Delta\Psi$ und $\Delta\Phi$ für LPS/PL-Membranen nicht nur in ihrem Wert, sondern auch in der Polarität unterscheiden.

6. Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$
 asymmetrischer Lipiddoppelschichten

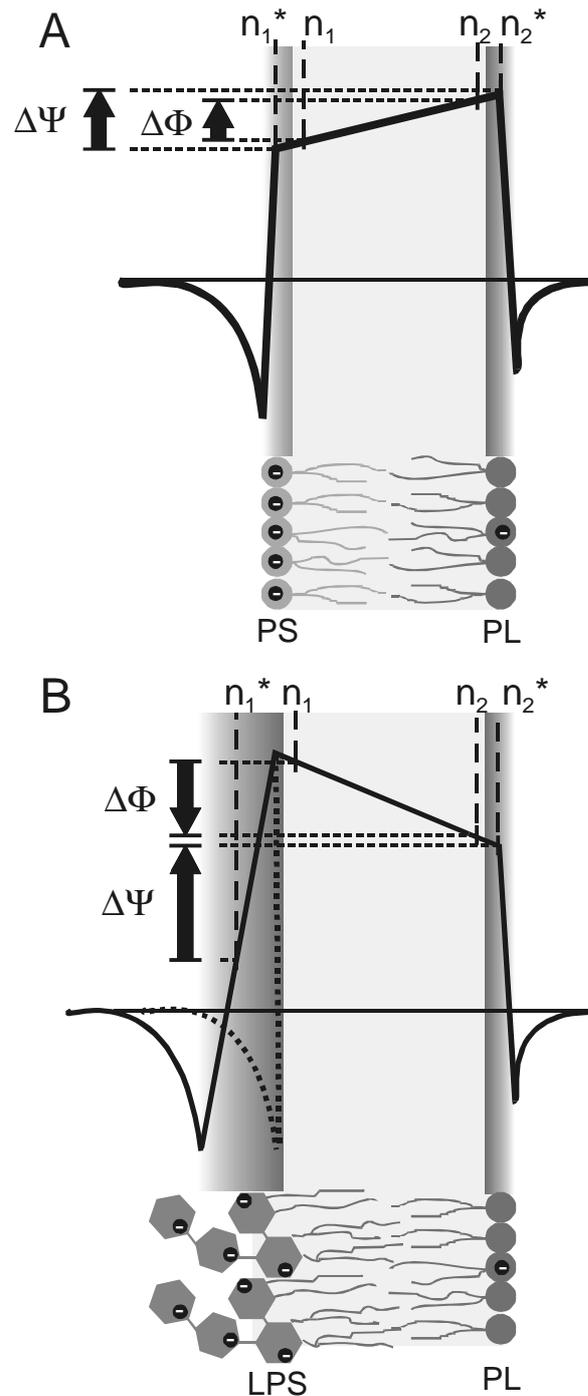


Abb. 28: Schematische Abbildung des Potentialprofils über asymmetrischen PS/PL- (A) und LPS/PL-Membranen (B) auf der Basis des Modells von Schoch et al. (1979). Die negativen Nettoladungen der Lipidmoleküle sind durch schwarze Kreise gekennzeichnet. Die Pfeile kennzeichnen das Vorzeichen von $\Delta\Phi$ bzw. $\Delta\Psi$. Da der exakte Verlauf des Potentialprofils in der Kopfgruppenregion des LPS unbekannt ist, ist der mögliche Bereich für den Verlauf des Potentialprofils in

6. Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Phi$ und $\Delta\Psi$ asymmetrischer Lipiddoppelschichten

diesem Bereich durch eine geschlossene und eine gepunktete Linie gekennzeichnet.

Abschließend läßt sich somit sagen, daß beide Methoden – IFC und Carrier-Transport-Messungen – ihre Berechtigung haben und weniger konkurrierende als vielmehr komplementäre Methoden sind, mit denen sich unter Umständen auch unterschiedliche Schritte der Interaktion zwischen Membranen und Peptiden/Proteinen untersuchen lassen, so daß eine Kombination beider Methoden zu einem tieferen Verständnis der entsprechenden Prozesse beiträgt.

7. Wechselwirkung polykationischer antimikrobieller Peptide mit asymmetrischen planaren Membranen

Polykationische antimikrobielle Peptide spielen eine große Rolle im Rahmen der Immunabwehr von Säugetieren gegenüber Bakterien, Viren und Pilzen. Die steigende Anzahl von Resistenzen gegenüber herkömmlichen Antibiotika macht es unumgänglich, zu einem tieferen Verständnis von der Wirkungsweise dieser Peptide zu gelangen. Auch zu diesem Zweck leistet die Methode der asymmetrischen planaren Membranen einen entscheidenden Beitrag, als besonders sensitiv haben sich dabei Messungen der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$ nach der IFC-Methode (siehe Kapitel 4.4.2) herausgestellt.

Mit Hilfe der IFC-Methode sollte nachgewiesen werden, ob und in welcher Weise sich antimikrobielle Peptide an unterschiedliche Lipidmatrizes anlagern bzw. in diese einlagern. Im Zentrum des Interesses steht auch hier der Einfluß der Struktur des LPS auf diese ersten Schritte der Wechselwirkung, insbesondere soll geklärt werden, wie es dazu kommt, daß einige Bakterienstämme resistent und andere dagegen sensitiv sind.

Im folgenden werden zunächst zwei Peptide der Hauptfamilien der antimikrobiellen Peptide näher beschrieben, das CAP18 aus der Kathelizidin- (Zanetti et al., 1995; Zaiou und Gallo, 2002; Lehrer und Ganz, 2002a; Zanetti, 2003; Bals und Wilson, 2003) und das hBD-3 aus der Defensinfamilie (Harder et al., 2001; Lehrer und Ganz, 2002b).

7.1. Kathelizidine

Das kationische antimikrobielle Protein CAP18 (relative Molmasse 18 kDa) gehört zur Familie der Kathelizidine. Dies sind Proteine mit hoch konserviertem N-Terminus mit bisher weitgehend unbekannter Funktion und variablem antimikrobiellen C-Terminus. Im folgenden wird die Bezeichnung CAP18 für das antimikrobielle Peptid des entsprechenden Proteins verwendet. Das erste in der Literatur beschriebene Kathelizidinpeptid ist das CAP18 vom Kaninchen (Abb. 29), im weiteren als rCAP18

7. Wechselwirkung polykationischer antimikrobieller Peptide mit asymmetrischen planaren Membranen

bezeichnet. rCAP18 wird aus den Aminosäuren 106 bis 142 des Gesamtproteins gebildet. Das in den hier beschriebenen Untersuchungen verwendete rCAP18-Fragment, das rCAP18₁₀₆₋₁₃₇, wird von den Aminosäuren 106 bis 137 gebildet. Ähnliche Peptide wurden mittlerweile für verschiedene Säugetierspezies gefunden, z.B. das SMAP29 (Brogden et al., 2001) vom Schaf, das hCAP18 bzw. LL37 vom Menschen (Larrick et al., 1994) sowie die CRAMP-Peptide von Maus und Ratte. Allen diesen Peptiden ist gemeinsam, daß sie eine nahezu ideale α -helikale Struktur besitzen und stark positiv geladen sind, im Falle des rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ beträgt die Nettoladung +12.

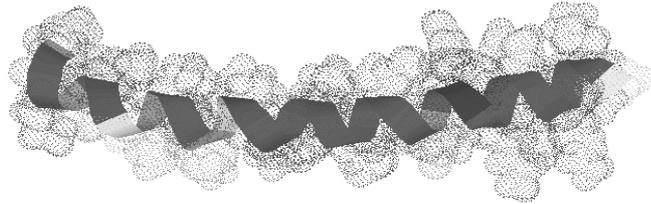


Abb. 29: NMR Struktur rCAP18₁₀₆₋₁₄₂ vom Kaninchen (Chen et al., 1995).

Für CAP18 wurde antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Spezies wie *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* sowie gegen die Gram-negativen Spezies *E. coli*, *S. minnesota* und *S. typhimurium* gefunden. Resistenzen wurden für die Gram-negative Spezies *P. mirabilis*, Pilze sowie *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium tuberculosis* entdeckt.

In Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten wurde gezeigt, daß die Lipidmatrix einen entscheidenden Einfluß auf die Wechselwirkung von unterschiedlichen CAP18-Fragmenten mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien hat (Gutsmann et al., 1999, 2000; 2001). So konnte am Beispiel von *P. mirabilis* gezeigt werden, daß eine definierte Variation in der chemischen Struktur des LPS dieses Stammes, nämlich das Vorhandensein zusätzlicher L-Arap4N am Lipid A und am ersten Kdo und einer damit verbundenen Ladungsreduktion, den entscheidenden Beitrag zur Bildung der Resistenzen gegen CAP18 liefert. Ziel der hier gezeigten Untersuchungen ist nachzuweisen, in welchem Schritt der Membran/Peptid-Interaktion es zu dieser Lipidspezifität kommt.

7.2. Defensine

Defensine stellen eine Hauptkomponente der Immunabwehr gegen Bakterien, Pilze und Viren dar. Hauptmerkmal der Defensine ist ihre hohe positive Ladung sowie das Auftreten von drei Disulfidbrücken. Man unterscheidet zwischen α -, β -, θ - und Insektendefensinen (Ganz und Lehrer, 1995; Lehrer und Ganz, 2002b), die sich im wesentlichen in der Verknüpfung der Disulfidbrücken unterscheiden. Die β -Defensine, zu denen das in dieser Untersuchung verwendete humane β -Defensin-3 (hBD-3) gehört, zeichnen sich durch eine 1-5, 2-4, 3-6 Verknüpfung der Disulfidbrücken aus (Tang und Selsted, 1993). Die Primärstruktur von hBD-3 ist in Abb. 30 gezeigt.



Abb. 30: Primärstruktur von hBD-3 (Harder et al., 2001)

Das erste humane β -Defensin wurde 1995 isoliert (Bensch et al., 1995). 2001 wurde die Primärstruktur von hBD-3 publiziert (Harder et al., 2001), die NMR Struktur (Schibli et al., 2002) ist in Abb. 31 gezeigt.

hBD-3 wird in Keratinocyten und Lungenepithelzellen produziert und ist aktiv gegen Gram-positive Bakterien (*Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*), Gram-negative Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, und *E. coli*) und Pilze (*Candida albicans*). hBD-3 ist bereits in geringen Konzentrationen und auch bei physiologischen Salzkonzentrationen aktiv, eine reduzierte Aktivität wurde lediglich bei suprphysiologischen Salzkonzentrationen festgestellt (Harder et al., 2001). Resistenzen gegenüber hBD-3

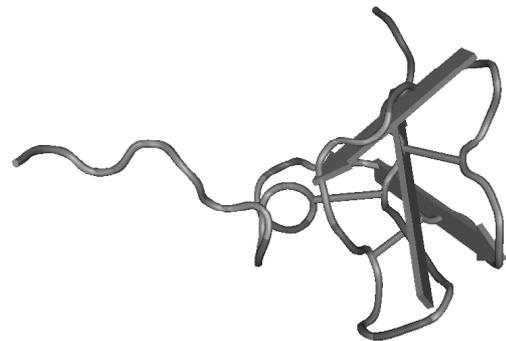


Abb. 31: NMR Struktur von hBD-3 (Schibli et al., 2002)

wurden für die Gram-negative Spezies *Burkholderia cepacia* gezeigt (Sahly et al., 2003). Eine haemolytische Wirkung von hBD-3 konnte dagegen bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml nicht nachgewiesen werden (Harder et al., 2001).

Die eigentliche Rolle der Defensine für die Immunabwehr ist allerdings immer noch umstritten. Während zum Teil die antibakterielle Wirkung als Hauptaufgabe gesehen wird, deuten einige Arbeiten darauf hin, daß eine weitere wichtige Funktion eines Defensins die Funktion als Chemokin ist. Es konnte gezeigt werden, das zum Teil massive Änderungen der Struktur des hBD-3 durch Weglassen bzw. Ändern der Disulfidbrückenverknüpfungen, keinen oder nur einen marginalen Einfluß auf die antibakterielle Aktivität (Hoover et al., 2003), wohl aber auf die chemotaktische Aktivität haben (Wu et al., 2003).

Ziel der hier gezeigten Untersuchungen ist es, mit einer hochsensitiven Methode eine direkte Interaktion von hBD-3 mit der Lipidmatrix, in diesem Fall einer LPS F515/PL-Membran, nachzuweisen, um somit die Grundlage für weitere materialaufwendige Untersuchungen zu schaffen.

7.3. Verwendete Materialien

Re-LPS von *E. coli* Stamm F515, *S. minnesota* Stamm R595 und *P. mirabilis* Stamm R45 wurde wie in Kapitel 5.2 beschrieben verwendet.

PE von *E. coli*, PG aus Eigelb, synthetisches DPG und synthetisches Diphytanoyl-phosphatidylcholin (DPhyPC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Lipide wurden in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in Chloroform gelöst und bei 4°C gelagert.

Für die Untersuchung zur Wechselwirkung von CAP18 mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wurde ein aus 32 Aminosäuren bestehendes Fragment des Kaninchen CAP18, rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ verwendet. Dieses Fragment wurde von James W. Larrick vom Palo Alto Institute of Molecular Medicine (Mountainview, CA, USA) mittels Merrifield Synthese hergestellt (Larrick et al., 1994) und uns zur Verfügung gestellt. CAP18 wurde in einer Konzentrationen von 1 mg/ml und 0,1 mg/ml in 0,01%-iger Essigsäure gelöst und bei -16°C gelagert.

Synthetisches hBD-3 wurde von Jerini BioTools GmbH (Berlin, Deutschland) hergestellt. HBD-3 wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in 0,01%-iger Essigsäure gelöst und bei -16°C gelagert.

Beide Peptide wurden mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren auf ihre Reinheit und korrekte Zusammensetzung überprüft.

7.4. Ergebnisse

7.4.1. rCAP18₁₀₆₋₁₃₇

Der Einfluß des rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ auf $\Delta\Psi$ wurde mittels IFC-Messungen bestimmt. Zu diesem Zweck wurde rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ zur LPS-Seite unterschiedlicher asymmetrischer planarer Membran zugegeben. Eine Seite wurde gebildet von PG, DPhyPC bzw. LPS F515 von *E. coli*, LPS R595 von *S. minnesota* oder LPS R45 von *P. mirabilis* und die Gegenseite jeweils von PL. In Abb. 32 sind einige typische zeitliche Verläufe von $\Delta\Psi$ (schwarze Kurven) am Beispiel einer LPS F151/PL- (A), LPS R45/PL- (B) und DPhyPC/PL-Membran (C) gezeigt. Das Peptid wurde jeweils 5 min nach der Membranpräparation (gekennzeichnet durch einen Pfeil) zugegeben. Die grauen Kurven repräsentieren die zugehörigen relativen Änderungen der Membrankapazität C/C_i in Abhängigkeit von der Zeit, die simultan zur Änderung von $\Delta\Psi$ aufgezeichnet wurden. C_i ist die Kapazität der Membran vor der Zugabe des Peptids.

Etwa 60 bis 90 s nach der Zugabe von 2 $\mu\text{g/ml}$ rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ zur LPS-Seite einer LPS F515/PL-Membran (Abb. 32) fällt $\Delta\Psi$ zunächst drastisch von etwa 40 mV auf -100 mV. Ein ähnlich starker Abfall von $\Delta\Psi$ konnte auch für die LPS R45/PL-Membran (40 mV auf -60 mV) und die DPhyPC/PL-Membran (-30 mV auf -70 mV) beobachtet werden, jedoch stieg nur im Falle der LPS F515/PL-Membran $\Delta\Psi$ nach diesem starken Abfall wieder an, so daß sich für diesen Membrantyp schließlich ein Wert von etwa -40 mV einstellte. Etwa 5 min nach der Zugabe des Peptides wurde für alle Membranen keine weitere Änderung von C/C_i und $\Delta\Psi$ beobachtet.

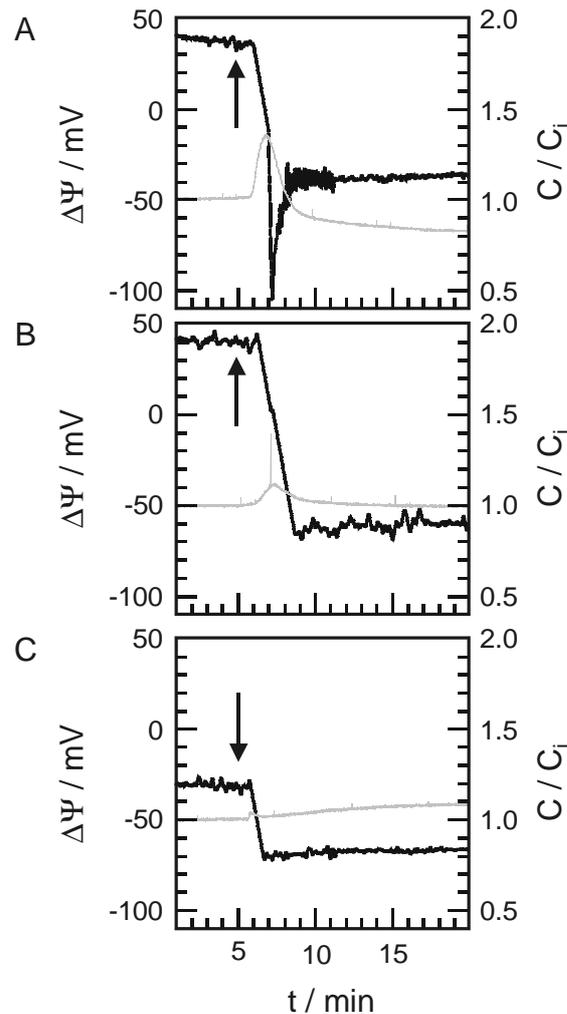


Abb. 32: Zeitliche Änderung der relativen Kapazität C/C_i (graue Kurve) und der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$ (schwarze Kurve) nach Zugabe (durch einen Pfeil markiert) von rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ zur LPS-Seite von LPS F515/PL- (A), LPS R45/PL- (B), und DPhyPC/PL-Membranen (C) (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0, T = 37°C).

In Tab. 3 sind die Gesamtänderungen von $\Delta\Psi$ für LPS F515/PL-, LPS R595/PL-, LPS R45/PL-, PG/PL- und DPhyPC/PL-Membranen wiedergegeben, die sich als Summe aus dem Abfall und dem Anstieg in $\Delta\Psi$ ergeben.

7. Wechselwirkung polykationischer antimikrobieller Peptide mit asymmetrischen planaren Membranen

Tab. 3: Gesamtänderung $\Delta(\Delta\Psi)$ der intrinsischen Membranpotentialdifferenz nach Zugabe von $2\ \mu\text{g/ml}$ rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ zur LPS-Seite der genannten Lipidmatrizes. $\Delta(\Delta\Psi)$ ergibt sich dabei als Summe aus dem Abfall und dem Anstieg von $\Delta\Psi$.

Lipidmatrix	LPS F515/PL	LPS R595/PL	LPS R45/PL	PS/PL	DPhyPC/PL
$\Delta(\Delta\Psi)/\text{mV}$	178 ± 14	109 ± 9	123 ± 19	102 ± 3	43 ± 6

Zudem führte die Zugabe von CAP18 zu Änderungen der relativen Membrankapazität C/C_i . Für LPS F515/PL-Membranen wurde zunächst ein Anstieg der Membrankapazität auf 135% des Anfangswertes beobachtet, gefolgt von einem Abfall auf etwa 80%. Im Falle der LPS R45/PL-Membranen ergab sich lediglich ein kurzzeitiger Anstieg auf 110% des Anfangswertes, doch stellte sich dann wieder das Ausgangsniveau ein. Für DPhyPC/PL-Membranen wurde keine signifikante Änderung der Membrankapazität beobachtet.

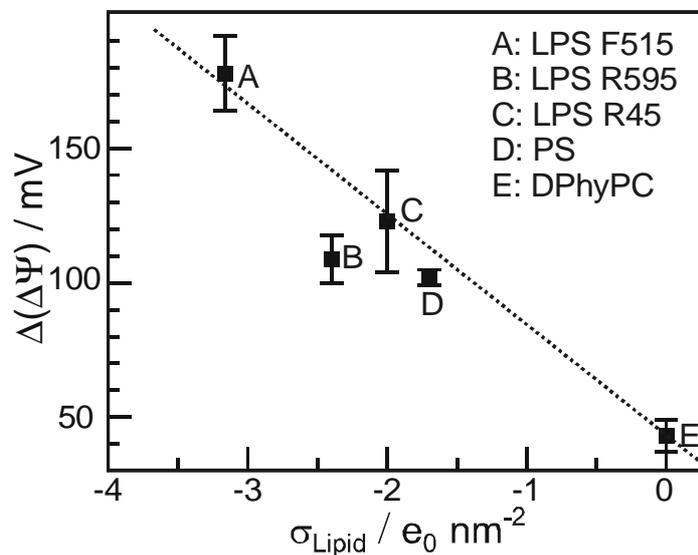


Abb. 33: Korrelation zwischen der Gesamtänderung von $\Delta\Psi$ und Oberflächenladungsdichte auf der Seite der Peptidzugabe.

In Abb. 33 ist die Gesamtänderung von $\Delta\Psi$ über die Oberflächenladungsdichte σ auf der Seite der Zugabe des Peptides aufgetragen. Es zeigt sich, daß die Gesamtänderung von $\Delta\Psi$ mit steigender negativer Ladung zunimmt.

Es sei erwähnt, daß sowohl die Änderung in $\Delta\Psi$ als auch die in C/C_i mit der Konzentration des CAP18 zunehmen. In den meisten Fällen führte eine CAP18-Konzentration von mehr als 20 $\mu\text{g/ml}$ allerdings zur Zerstörung der Membranintegrität.

7.4.2. hBD-3

Ein typischer Verlauf für die hBD-3 induzierte Änderung von $\Delta\Psi$ ist in Abb. 34 gezeigt. Der erste Pfeil markiert dabei die Zugabe von 2 $\mu\text{g/ml}$ hBD-3, der zweite markiert die Erhöhung der Konzentration auf 4 $\mu\text{g/ml}$. Die erste Zugabe führt zu einer Reduktion von $\Delta\Psi$ um etwa 30 mV, wohingegen C/C_i nur um 7% ansteigt. Die zweite Zugabe von hBD-3 führt zu einer weiteren Reduktion von $\Delta\Psi$ um 12 mV und einem weiteren leichten Anstieg der Kapazität.

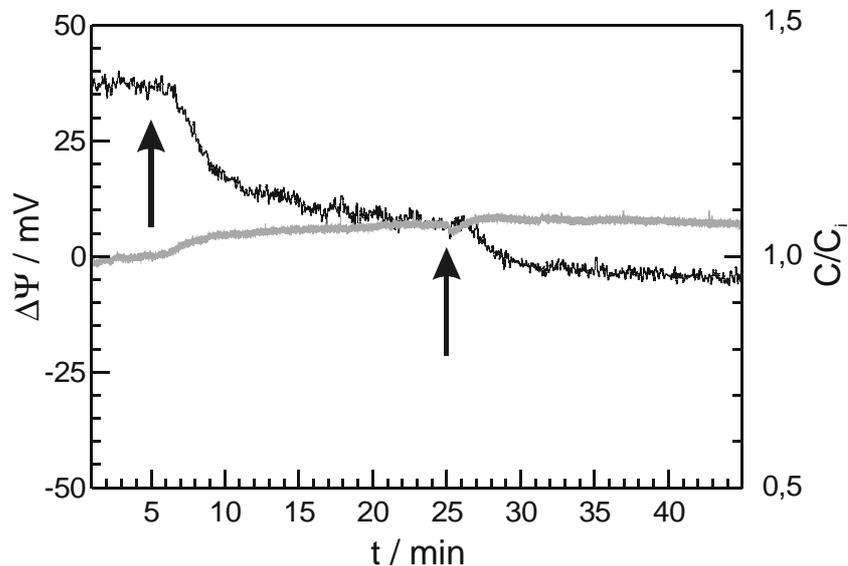


Abb. 34: Zeitliche Änderung der relativen Kapazität C/C_i (graue Kurve) und der intrinsischen Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$ (schwarze Kurve) nach Zugabe von hBD-3 zur LPS-Seite einer LPS F515/PL-Membran. Der erste Pfeil markiert die erste, der zweite eine weitere Zugabe von jeweils 2 $\mu\text{g/ml}$.

(Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH
7.0, T = 37°C)

7.5. Diskussion

Membranen stellen den ersten Angriffsort für antimikrobielle Peptide dar. Es konnte bereits früher gezeigt werden, daß die Lipidmatrix der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung mit unterschiedlichen antimikrobiellen Peptiden (Wiese et al., 1998; Gutschmann et al., 1999) spielt.

Zunächst wurden Wechselwirkungen von rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ mit verschiedenen LPS/PL- und Phospholipid/PL-Membranen untersucht. Dabei wurde sowohl LPS von sensitiven (*E. coli* Stamm F515 und *S. minnesota* Stamm R595) und resistenten (*P. mirabilis* Stamm R45) Gram-negativen Spezies, bzw. geladene (PG) und neutrale, zwitterionische (DPhyPC) Phospholipide untersucht. Ergebnisse für $\Delta\Psi$ und C/C_i sind in Abb. 32 gezeigt.

Über die zeitaufgelöste Bestimmung von $\Delta\Psi$ nach der IFC-Methode konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ zur LPS-Seite einer LPS F515/PL-Membran als Rekonstitutionsmodell der äußeren Membran einer sensitiven Spezies sehr schnell zu starken Änderungen in $\Delta\Psi$ und C/C_i führt. Wurde rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ jedoch zur LPS-Seite einer Membran zugegeben, die ein Mimetikum für eine resistente Spezies wie *P. mirabilis* darstellt, so führte dies zu wesentlich geringeren Änderungen in $\Delta\Psi$ und C/C_i . Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit älteren Ergebnissen, die für diese Membranen im Vergleich zu Membranen sensitiver Stämme eine Reduzierung der Porenbildung durch rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ zeigen konnten (Gutschmann et al., 1999).

Interessanterweise hat rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ nur einen geringen Einfluß auf die relative Membrankapazität von DPhyPC/PL-Membranen, wohingegen sich $\Delta\Psi$ signifikant ändert. Diese Beobachtung zeigt, daß die IFC-Methode sensitiver auf eine Wechselwirkung zwischen Membranen und Peptiden/Proteinen reagiert, als z. B. die Messung der Änderung der Membrankapazität oder aber auch Untersuchungen an der Langmuir-Filmwaage, die keine Veränderung der Meßparameter in Folge der Wechselwirkung von rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ mit PC-Membranen zeigten (Gutschmann et al., 1999, 2000, 2001). Diese Ergebnisse basieren auf der Tatsache, daß sich weder die Membrankapazität planarer Membranen, noch die Filmfläche in Monofilm-

Untersuchungen an der Langmuir-Filmwaage signifikant ändern. Des Weiteren ist die Klemmspannung, die zur Induzierung von Membranläsionen in DPhyPC/PL-Membranen durch rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ benötigt wird, signifikant höher als bei LPS/PL-Membranen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Rolle der IFC als sehr sensitive Methode zur Untersuchung von Membran/Peptid-Interaktionen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die rCAP18₁₀₆₋₁₃₇-induzierten Änderungen von $\Delta\Psi$ linear mit der Oberflächenladungsdichte der LPS-Seite der Membran korreliert sind (Abb. 33). Dies weist darauf hin, daß elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Anlagerung des Peptids an die Membranoberfläche und/oder den Einbau des Peptides in die Lipidmatrix spielen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in *in vivo* Untersuchungen und Liposomen Assays für die Peptide der Magainin-Familie und deren Derivate gefunden (Dathe et al., 2001). Interessanterweise zeigen Ergebnisse aus Carrier-Transport-Messungen (Gutsmann et al., 1999) andere Endwerte von $\Delta\Phi$ im Vergleich zu den hier gezeigten Endwerten von $\Delta\Psi$. Dies untermauert das in Kapitel 6 diskutierte Modell, daß die Membranpotentialdifferenzen, die von den beiden Methoden erfaßt werden, auf Grund der Unterschiede in den Positionen n_1 und n_1^* unterschiedlich sind.

Bis heute sind keine Ergebnisse publiziert, die eine direkte Interaktion zwischen hBD-3 und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zeigen, obwohl *in vivo* Untersuchungen an unterschiedlichen Bakterienspezies Hinweise ergaben, daß die Lipidmatrix eine wichtige Rolle in frühen Schritten der Abtötung der Bakterien spielt (Harder et al., 2001; Sahly et al., 2003). Da die IFC-Methode sehr sensitiv auf Anlagerung und Einbau von Peptiden reagiert, erschien es naheliegend, diese Methode zur Klärung dieser Frage heranzuziehen.

Die Untersuchungen an planaren LPS F515/PL-Doppelschichten konnten nun erstmals zeigen, daß eine direkte Wechselwirkung von hBD-3 mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien stattfindet. In Ermangelung ausreichender Mengen des Peptides konnten allerdings bislang keine Untersuchungen an rekonstituierten Membranen anderer sensitiver und resistenter Gram-negativer Spezies durchgeführt werden (Harder et al., 2001; Sahly et al., 2003). Interessant wären in diesem Zusammenhang insbesondere Untersuchungen mit LPS von *P. mirabilis*, da diese Gram-negative Spezies bereits weniger sensitiv gegen rCAP18 ist, und von *Burkholderia cepacia*, einer Spezies, die sich in einer detaillierten *in vivo* Studie an

7. Wechselwirkung polykationischer antimikrobieller Peptide mit asymmetrischen planaren Membranen

unterschiedlichen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien als besonders resistent herausgestellt hat (Sahly et al., 2003). Auf Grund der Substitution mit L-Arap4N werden 3 von 4 negativen Ladungen kompensiert, was zu einer Nettoladung von -1 für dieses LPS führt (Gronow et al., 2003).

8. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten

Biologische Prozesse auf molekularer Ebene sind bislang einer direkten visuellen Beobachtung kaum zugänglich. Elektrische Messungen an planaren Lipiddoppelschichten haben sich als potente Methode zur Untersuchung einer Vielzahl solcher Prozesse dargestellt und konnten in Kombination mit anderen biophysikalischen Meßmethoden entscheidend zu deren Aufklärung beitragen. Aus diesem Grunde wurde der elektrische Aufbau um eine fluoreszenzmikroskopische Einheit erweitert (siehe Kapitel 4.5), um neben den elektrischen Daten weitere optische Daten erfassen zu können und somit zu einem tieferen Verständnis der Wirkmechanismen biologischer Prozesse zu gelangen.

Im Zusammenhang mit der Wechselwirkung antimikrobieller Peptide mit bakteriellen Membranen wurde die Frage aufgeworfen, ob und auf welche Weise die Membranomorphologie an diesen Prozessen beteiligt ist. So legen beispielsweise epifluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an LPS-Monoschichten die Vermutung nahe, daß sich antimikrobielle Peptide bevorzugt an der Grenze zwischen rigiden und fluiden Bereichen der Membran einlagern.

Im Folgenden wird an zwei Beispielen – asymmetrische LPS/PL-Membranen und symmetrische Phospholipidmembranen – erstmals gezeigt, in welcher Weise sich die Domänenstruktur einer Lipidmonoschicht durch das Hinzufügen einer zweiten Lipidmonoschicht zu einer Lipiddoppelschicht verändert. Zunächst sollen jedoch die Grundlagen der Bildung sogenannter Domänen näher dargelegt werden.

8.1. Domänenbildung

Von großem Interesse in der modernen Biowissenschaft ist seit einigen Jahren die Bildung von Domänen in Membranen und deren Einfluß auf unterschiedlichste biologische Prozesse. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die sogenannten „Lipid-Rafts“ zu nennen (zur Übersicht siehe Simons und Ikonen (1997) und Binder et al. (2003)). Domänen entstehen unter anderem auf Grund der Tatsache, daß sich Lipide und andere Moleküle mit gleichen chemischen und biophysikalischen Eigenschaften aus

energetischen Gründen bevorzugt in räumlicher Nähe zueinander befinden. Neben stereochemischen Unterschieden und Ladungsunterschieden ist die Fluidität der Lipidmatrix ein wesentlicher Faktor. In der Regel findet der Phasenübergang einer Lipidmatrix von der Gel- in die flüssigkristalline Phase nicht sprunghaft bei der Temperatur T_C statt, d.h. der Phasenübergang hat eine endliche Breite ΔT . Bei einer gegebenen Temperatur innerhalb von ΔT wird sich somit ein bestimmter Anteil an Lipidmolekülen in der Gelphase befinden und ein weiterer Anteil in der flüssigkristallinen. In fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen an Lipidmonoschichten konnte gezeigt werden, daß sich Lipide, die sich im gleichen Phasenzustand befinden, zu Domänen zusammenschließen.

Auch wurde gezeigt, daß sowohl die Änderung der Zusammensetzung der Lipidmatrix als auch die Interaktion von antimikrobiellen Peptiden einen Einfluß auf die Bildung und Struktur von Domänen hat. Für das in Kapitel 7.1 beschriebene rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ wurde in epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Lipid A und ReLPS-Monoschichten gezeigt, daß es einen dramatischen Einfluß auf die Domänenstruktur, insbesondere auf die Verteilung und die Form der Domänen, hat (Gutsmann et al., 2000).

Von besonderem Interesse sind gegenwärtig eine spezielle Art von Mikrodomänen, sogenannte Lipid-Rafts. Die Existenz von Rafts wurde bereits im Jahre 1988 von Simons und van Meer (Simons und van Meer, 1988) postuliert. Die den Rafts zugeschriebenen Funktionen sind vielfältig (Sankaram und Thompson, 1990; Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998). Im Zusammenhang mit der bakteriellen Sepsis ist dabei insbesondere die Vermutung zu nennen, daß Signalproteine in großer Anzahl in Rafts zu finden sind. Zwei der Hauptkomponenten von Lipid-Rafts sind Sphingolipide (Kapitel 2.2.2), insbesondere das SM, und Chol (Kapitel 2.2.4).

Die Bedeutung von Rafts bzw. Raft-ähnlichen Strukturen für die bakterielle Zelle, die weder SM noch Chol enthält, ist bis dato noch nicht untersucht. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, daß sich beispielsweise auch Proteine in der bakteriellen Membran, wie zum Beispiel die in Kapitel 5 beschriebenen Porine, bevorzugt in Rafts einbauen.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist zunächst nachzuweisen, ob eine Domänenbildung in asymmetrischen LPS/PL-Membranen und den sie aufspannenden Lipidmonoschichten zu beobachten ist.

8.2. Verwendete Materialien

Re-LPS von *P. mirabilis* Stamm R45 wurde wie in Kapitel 5.2 beschrieben verwendet.

PE von *E. coli*, PG aus Eigelb, synthetisches DPG und Di-Oleoylphosphatidylcholin (DOPC), sowie SM vom Schweinehirn und Chol aus Wollfett (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Lipide wurden in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in Chloroform gelöst und bei 4°C gelagert.

In den hier gezeigten Versuchen wurde PE, dessen Kopfgruppe mit 7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol (NBD) markiert wurde, als Fluoreszenzmarker verwendet. NBD-PE von Molecular Probes (Eugene, OR, USA) wurde ohne weitere Aufreinigung in Chloroform gelöst und in einer Konzentration von 1% den unmarkierten Lipiden zugesetzt.

8.3. Ergebnisse

8.3.1. Untersuchung an asymmetrischen LPS/PL Doppelschichten

Die Versuche mit dem fluoreszenzmikroskopischen Aufbau an planaren Lipiddoppelschichten (siehe Kapitel 4.5) wurde an LPS/PL-Membranen durchgeführt. Dabei wurde LPS von *P. mirabilis* Stamm R45 verwendet, da es sich in vorangegangenen Untersuchungen als ein besonders guter Membranbildner herausgestellt hat. Zu diesem Zweck wurde der LPS-Lösung 1 Mol% NBD-markiertes PE (NBD-PE) zugesetzt. NBD-PE hat die Eigenschaft, sich bevorzugt in die fluiden Bereiche von Lipidmonoschichten einzulagern. Alle Versuche wurden in einer Subphase durchgeführt, der 100 mM KCl und 5 mM MgCl₂ enthielt und mit 5 mM HEPES gepuffert wurde, der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt. Bei den Untersuchungen an Lipidmonoschichten wurden diese jeweils durch das unbefüllte, dem Mikroskop zugewandte Kompartiment betrachtet (siehe Abb. 15), um Störungen durch Streuteilchen in diesem Kompartiment zu vermeiden.

Zunächst wurde jedoch das Phasenverhalten von LPS R45 mittels FTIR-Spektroskopie bestimmt (Kapitel 3.3). In Abb. 35 ist die Wellenzahl der symmetrischen Streckschwingung $\nu_s(\text{CH}_2)$ in Abhängigkeit von der Temperatur für

LPS R45 gezeigt. Es ist erkennbar, daß der Phasenübergang einen Temperaturbereich zwischen etwa 28°C und 40°C überstreicht.

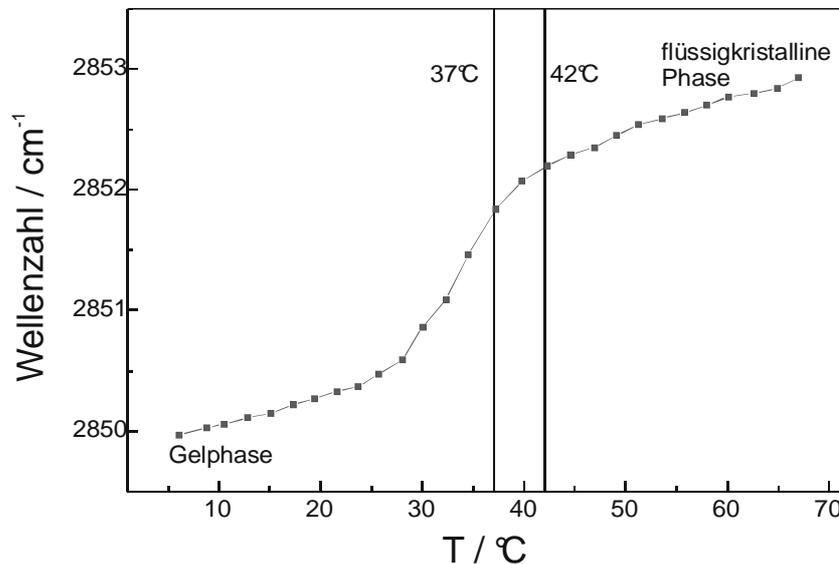


Abb. 35: Wellenzahl der symmetrischen Streckschwingung $\nu_s(\text{CH}_2)$ in Abhängigkeit von der Temperatur für 20 mM LPS R45 (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7). Die beiden senkrechten Linien markieren die Temperaturen, bei denen die in Abb. 36 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gemacht wurden.

In Abb. 36 A ist eine LPS R45 Monoschicht gezeigt, die bei 37°C über der Apertur eines Septums mit 150 μm Durchmesser aufgespannt ist. Deutlich sind Bereiche mit unterschiedlich starker Fluoreszenzintensität, im folgenden Domänen genannt, zu erkennen. Wird die Temperatur auf 42°C erhöht (Abb. 36 B), so verschwinden die hellen Bereiche vollständig (dabei muß erwähnt werden, daß die Belichtungszeit von 200 ms auf 1 s heraufgesetzt worden ist, um sicher zu stellen, daß das Verschwinden der Domänen nicht auf einem Ausbleichen des Farbstoffes beruht). Wird in einem weiteren Schritt die Temperatur wieder auf 37°C gesenkt (Abb. 36 C), so kommt es wieder zur Ausbildung von Domänen.

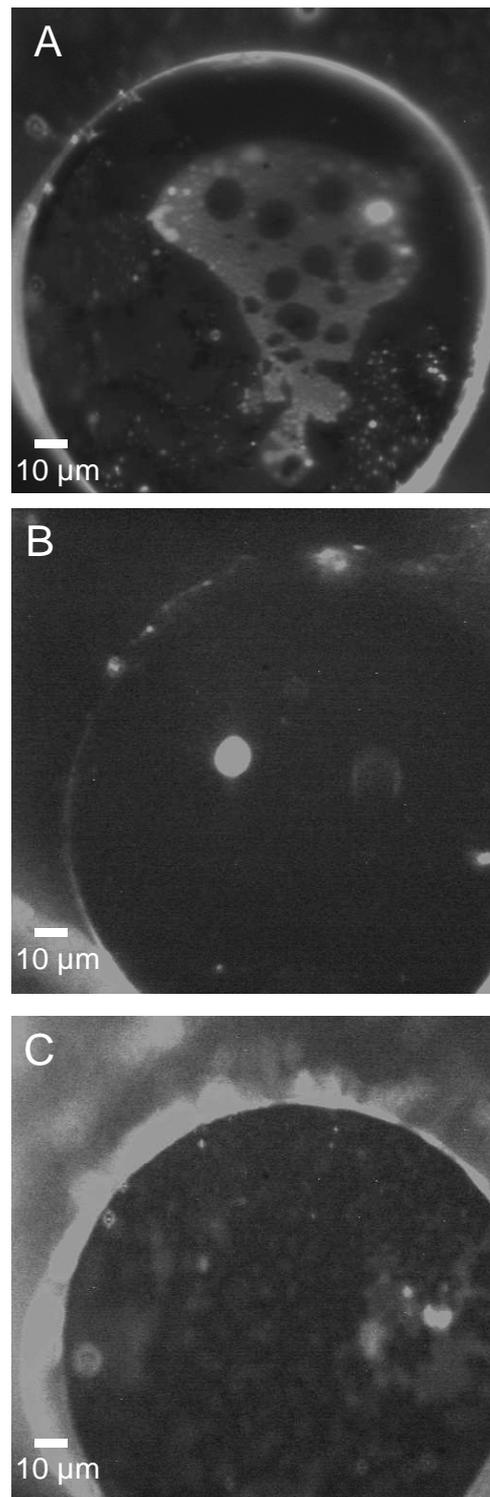


Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit 1 Mol% NBD-PE dotierten LPS R45 Monoschicht über der Apertur eines Septums bei 37°C (A), nach Aufheizen auf 42°C (B) und anschließender Abkühlung auf 37°C (C) (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7). Die Belichtungszeiten für diese Aufnahmen betragen 200 ms (A und C) bzw. 1 s (B)

8. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten

Die teilweise Unschärfe des Bildes im Bereich des Randes der Apertur ist durch Unebenheiten im Septum zu erklären, die dazu führen, daß sich lediglich ein Teil der Apertur in der Fokusebene befindet.

Abb. 37 zeigt eine LPS R45/PL-Membran, die bei 37°C präpariert worden ist. Es fällt auf, daß in diesem Falle keine Domänenbildung erkennbar ist. Eine Absenkung der Temperatur führte in allen Versuchen zum Bruch der Membran.

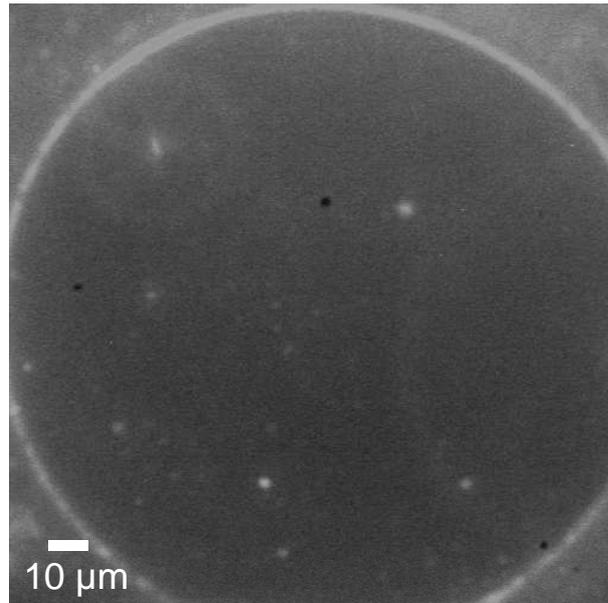


Abb. 37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer LPS R45/PL-Membran bei 37°C. Die LPS-Seite war mit 1 Mol% NBD-PE dotiert (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7). Die Belichtungszeit für diese Aufnahme betrug 200 ms.

Zum besseren Verständnis sei darauf hingewiesen, daß eine PL-Monoschicht auf Grund der hohen Fluidität bei 37°C keine Domänenstruktur ausweist. Die Präparation symmetrischer LPS/LPS-Doppelschichten, die in der Natur nicht vorkommen, scheiterte.

8.3.2. Untersuchungen an symmetrischen Phospholipiddoppelschichten

Für die Untersuchungen an symmetrischen Phospholipiddoppelschichten als Beispiel einer eukaryotischen Membran wurden beide Seiten der Membran aus einem Gemisch aus 45 Mol% DOPC, 45 Mol% SM und 10 Mol% Chol (DOPC:SM:Chol) gebildet. Die Markierung mit 1 Mol% NBD-PE erfolgte auf der dem Mikroskop abgewandten Seite der Membran.

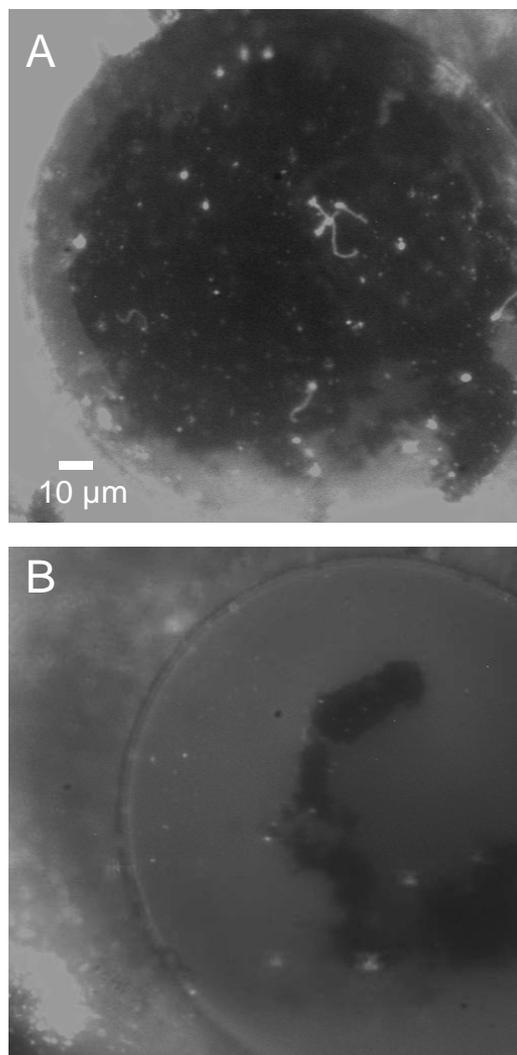


Abb. 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer (DOPC:SM:Chol)-Monoschicht bei Raumtemperatur (A) und 37°C (B) (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7). Die Belichtungszeit betrug bei beiden Aufnahmen 200 ms.

Abb. 38 zeigt eine (DOPC:SM:Chol)-Monoschicht bei Raumtemperatur (A) und 37°C (B). Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37°C zeigt sich eine ausgeprägte Domänenstruktur, wobei die Größe des dunklen Bereiches bei 37°C deutlich kleiner ist als bei Raumtemperatur. Auch hier wurden die Monoschichten durch die unbefüllte, dem Mikroskop zugewandte Seite beobachtet

Abb. 39 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer symmetrischen (DOPC:SM:Chol)-Membran bei Raumtemperatur. Deutlich ist eine ausgeprägte Domänenstruktur zu erkennen.

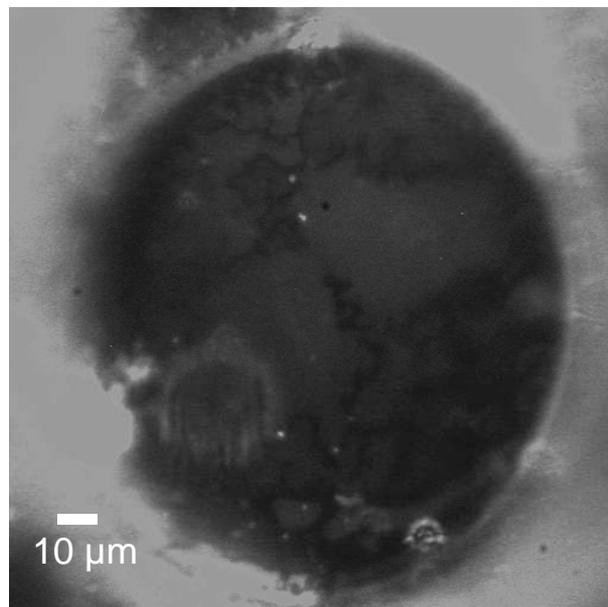


Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer symmetrischen (DOPC:SM:Chol)-Membran bei Raumtemperatur (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7). Die dem Mikroskop abgewandte Seite war mit 1% NBD-PE dotiert. Die Belichtungszeit für diese Aufnahme betrug 200 ms.

Eine Wiederholung des Experiments bei 37°C führte zu dem in Abb. 40 gezeigten Bild. Auch in diesem Fall ist eine Domänenbildung deutlich zu erkennen.

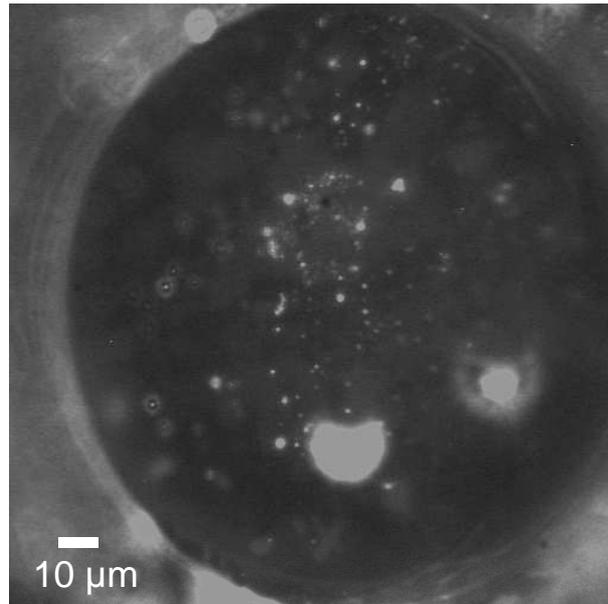


Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer symmetrischen (DOPC:SM:Chol)-Membran bei 37°C (Subphasenzusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7). Die dem Mikroskop abgewandte Seite war mit 1% NBD-PE dotiert. Die Belichtungszeit für diese Aufnahme betrug 200 ms.

8.4. Diskussion

Die Fluoreszenzmikroskopie an planaren Lipiddoppelschichten stellt eine zusätzliche unabhängige Methode zu den bisherigen elektrischen Messungen an planaren Membranen dar. Eine genaue Kenntnis von der molekularen Struktur und den elektrischen Eigenschaften planarer Membranen und deren Änderungen durch Wechselwirkungen mit Peptiden/Proteinen kann entscheidend zu einem tieferen Verständnis biologischer Prozesse beitragen. Daher ist die gleichzeitige Erfassung mehrerer Meßparameter an einem Modellsystem wie der Membranstrom, der Membrankapazität und der intrinsischen Membranpotentiale sowie der Fluidität der Lipiddoppelschicht und der damit verbundenen Domänenbildung äußerst erstrebenswert.

Die Fluoreszenzmikroskopie eröffnet eine Vielzahl von Möglichkeiten. In den hier gezeigten Untersuchungen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie an NBD-PE

dotierten Membranen gezeigt, in welcher Weise sich die beiden Monoschichten einer Membran gegenseitig beeinflussen. NBD-PE eignet sich insbesondere dazu, Bereiche unterschiedlicher Fluidität darzustellen, dabei erscheinen die fluideren Bereiche heller.

Zunächst wurde mit dieser Methode die asymmetrische LPS/PL-Membran und die sie aufspannenden Monoschichten am Beispiel des LPS R45 untersucht. Die LPS R45-Monoschicht bildet bei 37°C eine ausgeprägte Domänenstruktur aus. Eine Erhöhung der Temperatur auf 42°C führte zu einem völligen Verschwinden der Domänen, die nach einer Abkühlung auf 37°C wieder erkennbar wurden. Dies zeigt, daß der hier beobachtete Effekt eindeutig mit der Temperatur und damit der Fluidität korreliert ist. Diese Hypothese wurde mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie weiter unterstützt. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß sich die Fluidität von LPS-Aggregaten im Temperaturbereich zwischen 37°C und 42°C, obwohl die Phasenübergangstemperatur bei etwa 35°C liegt, stark ändert (Abb. 35). Die Tatsache, daß auch bei 42°C die Änderung der Lage der Absorptionsbande der symmetrischen Streckschwingung der CH₂-Gruppen noch nicht abgeschlossen ist, weist darauf hin, daß sich auch bei dieser Temperatur noch Teile der Lipidmonoschicht in der Gelphase befinden, die Größe der rigiden Domänen allerdings kleiner ist als das Auflösungsvermögens des Mikroskops, das bei etwa 470 nm liegt. Eine wesentliche Verbesserung dieser Auflösung ist mit optischen Methoden allerdings nicht zu erreichen. Zum Nachweis von Strukturen im Bereich von wenigen Nanometern finden rastersondenmikroskopische Verfahren Anwendung. Allerdings ist es theoretisch auch möglich, daß tatsächlich keine Domänen in der Lipidmonoschicht vorhanden sind, sich aber der Phasenzustand der hier betrachteten Lipidmonoschicht vom Phasenzustand von Lipidaggregaten, wie sie bei der FTIR-Spektroskopie verwendet werden, unterscheidet.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie an planaren Lipiddoppelschichten konnte nun erstmals gezeigt werden, daß in LPS R45/PL-Doppelschichten bei 37°C interessanterweise keine Domänenbildung auftritt. Das Vorhandensein der zweiten, fluiden Lipidmonoschicht hat also offensichtlich einen ähnlichen Effekt auf die LPS-Schicht wie eine Erhöhung der Temperatur, führt also zu einer Fluidisierung und die PL-Seite verändert somit die Eigenschaften der LPS-Seite deutlich. Dies weist darauf hin, daß es nicht ohne weiteres möglich ist, aus Messungen an Lipidmonoschichten Rückschlüsse auf die Lipiddoppelschicht zu ziehen, da die beiden Seiten der Membran nicht als zwei vollkommen unabhängige Lipidmonoschichten betrachtet werden können. Auch hier sei noch einmal darauf hingewiesen, daß eine Bildung von

Mikrodomänen nicht ausgeschlossen werden kann. Allerdings ist offensichtlich, daß, unabhängig von der Frage ob Mikrodomänen in LPS/PL-Membranen existieren oder nicht, der Einfluß der PL-Seite auf die LPS-Seite auf keinen Fall vernachlässigt werden darf.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Wechselwirkung von rCAP18₁₀₆₋₁₃₇ mit einer LPS- bzw. Lipid A-Monoschicht zu einer Änderung in deren Domänenstruktur führt. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, daß sich CAP18 bevorzugt in den Grenzbereich zwischen rigiden und fluiden Bereichen ein- bzw. anlagert (Gutsmann et al., 2000). Sowohl in dieser Arbeit (Kapitel 7) als auch in unterschiedlichen Publikationen (Gutsmann et al., 1999 und 2001) konnte zudem eine Wechselwirkung von CAP18 mit unterschiedlichen LPS/PL-Membranen gezeigt werden. Dies zeigt, daß obwohl eine Einlagerung in die Domänengrenzen in einer LPS-Monoschicht beobachtet worden ist, ihr Vorhandensein aber nicht von essentieller Bedeutung für die Einlagerung und die anschließende Porenbildung in LPS/PL-Doppelschichten ist.

Interessant ist nun die Frage, wie sich die Domänenstruktur und damit die Fluidität der Membran verändert, wenn die Membran aus zwei eher rigiden Monoschichten aufgebaut wird. Da die Präparation einer LPS/LPS-Membran auf Grund zu geringer Stabilität nicht möglich ist, wurden Untersuchungen an einem Lipidsystem durchgeführt, welches insbesondere bei der Untersuchung von Lipid-Rafts von Interesse ist. Dabei handelt es sich um symmetrische Membranen aus einer Mischung von DOPC und SM im molaren Verhältnis 1:1, die mit 10 Mol% Chol versetzt ist (Lawrence et al., 2003). An diesem System konnte mittels Rasterkraftmikroskopie die Bildung von Mikrodomänen nachgewiesen werden.

Diese (DOPC:SM:Chol)-Doppelschichten zeigen im Gegensatz zur LPS/PL-Membran eine ausgeprägte Domänenstruktur sowohl in der Doppel- als auch in der Monoschicht. Dies läßt sich dadurch verstehen, daß in diesem Fall zwei Monoschichten zusammenkommen, in denen Domänen und somit zwei Phasen nebeneinander vorliegen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen an Lipidmono- und -doppelschichten auf einem festen Substrat gefunden (Lawrence et al., 2003).

Es wäre nun interessant zu klären, ob diese Domänen transmembran sind, d.h. ob sie sich in den beiden Hälften der Membran gegenüber liegen. Um diese Frage klären zu können, wäre es erforderlich, beide Seiten der Membran mit unterschiedlichen

Farbstoffen zu markieren und an einer Membran zwei Bilder bei unterschiedlichen Wellenlängen aufzunehmen, die anschließend übereinander gelegt werden. Wenn die Domänen transmembran sind, dann sollten beide Bilder deckungsgleich sein. Dies ist zur Zeit mit der hier vorgestellten Apparatur (Kapitel 4.5) noch nicht durchführbar.

Die hier präsentierten Ergebnisse zu fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten geben bereits an zwei Beispielen einen Eindruck von der weitreichenden Bedeutung dieser Methode für die Charakterisierung von Membranen und damit auch für die Untersuchung von Interaktionen zwischen Membranen und Peptiden/Proteinen. In diesem Zusammenhang soll noch einmal auf die Einzigartigkeit der Präparationsmethode nach Montal und Mueller hingewiesen werden, die es in diesem Aufbau nicht nur erlaubt, die Lipidzusammensetzung der Membran frei zu wählen, sondern auch die Seite der Membran, die fluoreszenzmarkiert werden soll. Die beiden Seiten einer Membran lassen sich somit nicht nur unabhängig voneinander, sondern auch in ihrer gegenseitigen Wechselwirkung betrachten.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ist auf Grund der ausgeprägten Asymmetrie in ihrer Lipidzusammensetzung – LPS auf der einen, der äußeren und Phospholipide auf der inneren Seite – als einzigartig zu betrachten. Zudem gehört LPS als Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zu den komplexesten bekannten (Glyco)lipidmolekülen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen waren grundsätzlich auf die Frage der Funktion von LPS für die bakterielle Zelle fokussiert.

Es konnte gezeigt werden, daß die Struktur des LPS und seine biophysikalischen Eigenschaften einen wichtigen Einfluß auf die Funktion der Membran und auf eine Reihe von biologischen Prozessen haben. Dies konnte anhand von zwei vollkommen unterschiedlichen Funktionen der äußeren Membran – zum einen als Trägermatrix für das bakterielle Membranprotein Porin und zum anderen als Barriere für Peptide der Immunabwehr von Säugetieren – untermauert werden. Als besonders erstaunlich erwiesen sich erste optische Untersuchungen an dem Rekonstitutionsmodell der äußeren Membran, die deutliche Hinweise darauf ergaben, daß die Eigenschaften der einen Seite durch die Anwesenheit der Gegenseite geändert werden.

Die Porenbildung durch bakterielle Porine, wird wesentlich durch die Zusammensetzung der Lipidmatrix bestimmt (Kapitel 5). Am Beispiel des Phosphoporins PhoE wurde gezeigt, daß LPS einen starken, eventuell den entscheidenden Einfluß auf die Porenbildung durch Porine hat, wobei die Porenbildungsrate mit länger werdendem Zuckerteil des LPS steigt. Der Einfluß der Lipidmatrix auf das spannungsabhängige Schaltverhalten von Porinen im biologischen System ist dagegen nur wenig relevant, da die Transmembranspannung über der äußeren Membran nicht ausreicht um ein Schließen zu induzieren. Das spannungsabhängige Schließen scheint, ebenso wie die stark verminderte Porenbildung in Phospholipidmembranen, vielmehr ein Schutzmechanismus für die innere Membran zu sein, über der eine wesentlich höhere Transmembranspannung anliegt.

Die Zusammensetzung der Lipidmatrix bestimmt aber auch die Wechselwirkung mit antimikrobiellen Peptiden, dabei ist insbesondere der Einfluß der Oberflächenladung zu nennen. Es konnte am Beispiel des kationischen antimikrobiellen Peptides vom Kaninchen (rCAP18), einem Peptid mit einer relativen Molmasse von 18

kDa, (Kapitel 7) gezeigt werden, daß elektrostatische Kräfte eine entscheidende Rolle für die ersten Schritte der Wechselwirkung und somit auch für die Lipidspezifität spielen. Auf der Basis dieser Daten lassen sich Resistenzen wie im Falle der Gram-negativen Spezies *P. mirabilis* verstehen, deren LPS im Vergleich zu dem der sensitiven Spezies *E. coli* eine deutlich reduzierte Ladung trägt. Dabei hat sich die Bestimmung der intrinsischen Membranpotentialdifferenz mit Hilfe der IFC-Methode als leistungsfähige und sehr sensitive Methode zur Charakterisierung der Wechselwirkung von antimikrobiellen Peptiden mit Lipiddoppelschichten erwiesen. Mit Hilfe dieser Methode konnte auch erstmals eine direkte Interaktion von humanem β -Defensin-3 (hBD-3) mit asymmetrischen Lipiddoppelschichten am Beispiel der äußeren Membran von *E. coli* gezeigt werden. In Zukunft werden Untersuchungen zur Lipidspezifität von hBD-3 folgen, dabei stehen zunächst Messungen des hBD-3-induzierten Membranstromes und die Charakterisierung der durch hBD-3-induzierten Membranläsionen im Vordergrund.

Der Vergleich der Werte der intrinsischen Membranpotentialdifferenzen $\Delta\Psi$ und $\Delta\Phi$ führte zu einem neuen modifizierten Modell des Membranpotentialprofils über der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Kapitel 6). In dieses Modell fließt neben der Oberflächenladungsdichte der LPS-Schicht auch die chemische Struktur des LPS-Moleküls ein, was in dem Standardmodell von Schoch und Mitarbeitern, das auf der Basis von Phospholipiddoppelschichten etabliert wurde, nicht berücksichtigt wird. In Zukunft sollen Messungen durchgeführt werden, bei denen die Länge des Zuckerteils (Abb. 3) des LPS variiert wird, um so die Frage zu klären, in welcher Weise auch eine Abschirmung der Ladungen nach außen oder ein Hinzufügen von zusätzlichen Ladungen, die deutlich außerhalb des hydrophoben Teil der Membran lokalisiert sind, die Werte der intrinsischen Membranpotentialdifferenzen und somit auch den Verlauf des Potentialprofils verändert.

Um bei Messungen zur Membran/Peptid-Interaktionen die Membran nicht nur als homogene Fläche zu betrachten, sondern auch lokale Unterschiede wie Domänen zu charakterisieren, wurde ein fluoreszenzmikroskopischer Aufbau an planaren Membranen etabliert (Kapitel 4.5). Es konnte gezeigt werden, daß die Bildung von Domänen wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Membran/Peptid-Interaktion haben kann, da in der asymmetrischen LPS/PL-Doppelschicht im Rahmen der optischen Auflösung keine Domänen feststellbar waren (Kapitel 8). Die gezeigten Ergebnisse

weisen zudem darauf hin, daß die Eigenschaften einer Lipiddoppelschicht weit mehr sind, als die Summe der Eigenschaften zweier Lipidmonoschichten, da es erst durch das Hinzufügen einer Phospholipidgegenseite zu einer Auflösung von Domänen kommt, die in der LPS-Monoschicht deutlich erkennbar sind. Es konnte somit eine direkte Wechselwirkung zwischen den beiden Seiten einer Membran nachgewiesen werden. Dies bedeutet allerdings, daß insbesondere Daten, die an Lipidmonoschichten gewonnen worden sind, kritisch betrachtet werden müssen und eine Übertragung auf das Doppelschichtsystem nicht ohne weiteres möglich ist. Dies gilt insbesondere für Daten, aus denen postuliert wird, daß sich Peptide/Proteine bevorzugt in Phasen- oder Domänengrenzen einlagern.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen aber auch, daß Fluoreszenzmikroskopie an planaren Membranen einen wesentlichen Fortschritt für die Untersuchung der Eigenschaften planarer Membranen bedeutet. Sie stellt somit den methodischen Teil dieser Arbeit dar, der für die Zukunft am meisten Potential bietet, so soll in der naheliegenden Zukunft sollen mit dieser Methode zunächst LPS/PL-Doppelschichten weiter charakterisiert werden. In einem folgenden Schritt sollen dann Untersuchungen zu Wechselwirkungen mit unterschiedlichen antimikrobiellen Peptiden durchgeführt werden. Dabei werden polykationische Peptide wie das rCAP18, für das bereits eine Vielzahl von Daten an planaren Membranen und anderen Modellsystemen vorliegen, im Mittelpunkt stehen.

Interessant scheint in diesem Zusammenhang auch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Peptide. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Peptiden könnte die Frage beantwortet werden, ob diese sich gerichtet in die Membran einbauen. Dies ließe sich bei der Verwendung von NBD durch chemisches Ausbleichen des Farbstoffes realisieren. Als Bleichstoff wird dabei Natriumdithionit verwendet (McIntyre und Sleight, 1991; Angeletti und Nichols, 1998). Dithionitionen sind selbst nicht in der Lage eine geschlossene Lipidschicht zu durchdringen (Langner und Hui, 1993). Läßt sich nun die Fluoreszenz der eingebauten Peptide im Falle der Markierung des einen Endes des Peptides vollständig auslöschen und im Falle der Markierung des anderen Endes nicht, so weist dies auf einen gerichteten Einbau hin. Entsprechend weist ein nur teilweises Ausbleichen in beiden Fällen auf einen ungerichteten Einbau hin.

Der Schwerpunkt bei der technischen Weiterentwicklung des Aufbaus zur Fluoreszenzmikroskopie an planaren Membranen wird auf der Optimierung der Meßkammer liegen. Die ersten Bilder haben gezeigt, daß Lipiddoppelschichten häufig

wesentlich unschärfer als Lipidmonoschichten dargestellt werden, dies liegt an der großen Anzahl von Streuzentren (z.B. Luftblasen oder Lipidaggregate) in der wäßrigen Phase zwischen Membran und Objektiv. Die Schärfe der Abbildungen sollte sich daher durch eine Verringerung der Dicke der Wasserschicht noch erheblich verbessern lassen.

In Zukunft sollte es möglich sein, weitere fluoreszenzmikroskopische Verfahren an den planaren Membranen zu etablieren, wobei die „Fluorescence Recovery After Photobleaching“ Methode von besonderem Interesse ist. Hierzu wird mit einer starken Lichtquelle, beispielsweise einem Laser, ein Teil der fluoreszierenden Membran ausgebleicht. Aus der Zeit, die benötigt wird, um wieder eine homogen fluoreszierende Membran zu erhalten, lassen sich Rückschlüsse auf die Lateralbewegung der den Fluoreszenzfarbstoff tragenden Moleküle – Lipide, Proteine, Peptide – in der Membran ziehen.

Weiter ist eine Etablierung der FRET-Methode (Stryer, 1978), mit deren Hilfe sich nachweisen läßt, ob sich zwei Moleküle in räumlicher Nähe befinden, denkbar. Voraussetzung dafür ist, daß beide Moleküle mit jeweils einem Farbstoff markiert sind, die zusammen ein sogenanntes Förster-Paar bilden. Wird nun der eine Farbstoff angeregt, so kommt es in der Regel zu Fluoreszenzemission. Befindet sich jedoch ein Molekül, das den zweiten Farbstoff trägt, in räumlicher Nähe zu dem angeregten, so kann dieser über einen strahlungslosen Energietransfer seinerseits in einen angeregten Zustand versetzt werden. Die Effizienz des Energietransfers ist dabei umgekehrt proportional zur 6. Potenz des Abstandes der beiden Fluorophore.

Die hier vorgestellten Untersuchungen haben demonstriert, daß planare Membranen einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der Eigenschaften von Lipiddoppelschichten und der Änderung dieser Eigenschaften durch Proteine/Peptide leisten. Dies gilt insbesondere für die asymmetrische äußere Membran Gram-negativer Bakterien, die sich mit keinem anderen Modellsystem rekonstituieren läßt, und den Einfluß der Zuckerstruktur des LPS auf ihre Funktion. Auch ist es mit keinem anderen Modellsystem möglich dem biologischen System bei der Beschreibung des Einbaus von Porinen nahe zu kommen.

10. Literaturverzeichnis

Adam, G., P. Läuger und G. Stark. 1977. Physikalische Chemie und Biophysik. Springer-Verlag, Berlin.

Alvarez, O. und R. Latorre. 1978. Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. *Biophys. J.* 21:1-17.

Ames, G.F.L., E.N. Spudich und H. Nikaido. 1974. Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J. Bacteriol.* 117:406-416.

Angeletti, C. und J.W. Nichols. 1998. Dithionite quenching rate measurement of the inside-outside membrane bilayer distribution of 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labeled phospholipids. *Biochemistry* 37:15114-15119.

Babakov, A.V., L.N. Ermishkin und E.A. Liberman. 1966. Influence of electric field on the capacity of phospholipid membranes. *Nature* 210:953-955.

Bakker, E.P. und W.E. Mangerich. 1981. Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.* 147:820-826.

Bals, R. und J.M. Wilson. 2003. Cathelicidins - A family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol. Life Sci.* 60:711-720.

Benga, G. 1985. Structure and properties of cell membranes, Vol. I: A survey of molecular aspects of membrane structure and function. CRC Press, Boca Raton.

Bensch, K.W., M. Raida, H.-J. Magert, P. Schulz-Knappe und W.-G. Forssmann. 1995. hBD-1: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 368:331-335.

Benz, R. und K. Bauer. 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins. *Eur. J. Biochem.* 176:1-19.

Bernstein, H.D. 2000. The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:203-209.

- Berrier, C., M. Besnard und A. Ghazi. 1997. Electrophysiological characteristics of the PhoE porin channel from *Escherichia coli*. Implications for the possible existence of a superfamily of ion channels. *J. Membr. Biol.* 156:105-115.
- Binder, W.H., V. Barragan und F.M. Menger. 2003. Domänen und Rafts in Lipidmembranen. *Angew. Chem.* 115:5980-6007.
- Brandenburg, K., S. Kusumoto und U. Seydel. 1997. Conformational studies of synthetic lipid A analogues and partial structures by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1329:183-201.
- Brogden, K.A., V.C. Kalfa, M.R. Ackermann, D.E. Palmquist, P.B. McCray, Jr. und B.F. Tack. 2001. The ovine cathelicidin SMAP29 kills ovine respiratory pathogens in vitro and in an ovine model of pulmonary infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:331-334.
- Brown, D.A. und E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-136.
- Carius, W. 1976. Voltage Dependence of bilayer membrane capacitance - Harmonic reponse to ac excitation with dc bias. *J. Colloid Interface Sci.* 57:301-307.
- Chen, C., R. Brock, F. Luh, P.J. Chou, J.W. Larrick, R.F. Huang und T.H. Huang. 1995. The solution structure of the active domain of CAP18 - A lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett.* 370:46-52.
- Cowan, S.W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R.A. Pauptit, J.N. Jansonius und J.P. Rosenbusch. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358:727-733.
- Crowley, J.M. 1973. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys. J.* 13:711-724.
- Danielli, J.F. und H. Davson. 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell Biol.* 5:495-508.
- Darnell, J., H. Lodish und D. Baltimore. 1986. Molecular cell biology. Scientific American Books, New York.

- Dathe, M., H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann und M. Bienert. 2001. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* 501:146-150.
- De Cock, H., K. Brandenburg, A. Wiese, O. Holst und U. Seydel. 1999. Non-lamellar structure and negative charges of lipopolysaccharides required for efficient folding of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274:5114-5119.
- De Cock, H., R. Hendriks, T. de Vrije und J. Tommassen. 1990. Assembly of an *in vitro* synthesized *Escherichia coli* outer membrane porin into its stable trimeric configuration. *J. Biol. Chem.* 265:4646-4651.
- De Cock, H. und J. Tommassen. 1996. Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E-coli*. *EMBO J.* 15:5567-5573.
- De Cock, H., S. van Blokland und J. Tommassen. 1996. *In vitro* insertion and assembly of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12 into the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 271:12885-12890.
- Eppens, E.F., N. Saint, P. Van Gelder, R. van Boxtel und J. Tommassen. 1997. Role of the constriction loop in the gating of outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 415:317-320.
- Flewelling, R.F. und W.L. Hubbel. 1986. The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes. *Biophys. J.* 49:541-552.
- Franklin, J.C. und D.S. Cafiso. 1993. Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles. *Biophys. J.* 65:289-299.
- Galanos, C., O. Lüderitz und O. Westphal. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9:245-249.
- Ganz, T. und R.I. Lehrer. 1995. Defensins. *Pharmacol. Ther.* 66:191-205.

- Gawrisch, K., D. Ruston, J. Zimmerberg, V.A. Parsegian, R.P. Rand und N. Fuller. 1992. Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophys. J.* 61:1213-1223.
- Gronow, S., C. Noah, A. Blumenthal, B. Lindner und H. Brade. 2003. Construction of a deep-rough mutant of *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 and characterization of its chemical and biological properties. *J. Biol. Chem.* 278:1647-1655.
- Gutsmann, T., M. Fix, J.W. Larrick und A. Wiese. 2000. Mechanisms of action of rabbit CAP18 on monolayers and liposomes made from endotoxins or phospholipids. *J. Membr. Biol.* 176:223-236.
- Gutsmann, T., S.O. Hagge, J.W. Larrick, U. Seydel und A. Wiese. 2001. Interaction of CAP18-derived peptides with membranes made from endotoxins or phospholipids. *Biophys. J.* 80:2935-2945.
- Gutsmann, T., J.W. Larrick, U. Seydel und A. Wiese. 1999. Molecular mechanisms of interaction of rabbit CAP18 with outer membranes of gram-negative bacteria. *Biochemistry* 38:13643-13653.
- Harder, J., J. Bartels, E. Christophers und J.M. Schroder. 2001. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276:5707-5713.
- Heller, H., M. Schaefer und K. Schulten. 1993. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phases. *J. Phys. Chem.* 97:8343-8360.
- Holst, O. 1999. Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. In *Endotoxin in Health and Disease*. H. Brade, S.M. Opal, S.N. Vogel und D.C. Morrison, editors. Marcel Dekker, Inc., New York. 115-54.
- Hoover, D.M., Z. Wu, K. Tucker, W. Lu und J. Lubkowski. 2003. Antimicrobial characterization of human β -defensin 3 derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2804-2809.

- Jansen, C., M. Heutink, J. Tommassen und H. De Cock. 2000. The assembly pathway of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 267:3792-3800.
- Kawahara, K., U. Seydel, M. Matsuura, H. Danbara, E.Th. Rietschel und U. Zähringer. 1991. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. *FEBS Lett.* 292:107-110.
- Korteland, J. und B. Lugtenberg. 1984. Increased efficiency of the outer membrane PhoE protein pore in *Escherichia coli* K-12 mutants with heptose-deficient lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta* 774:119-126.
- Koval, M. und R.E. Pagano. 1989. Lipid recycling between the plasma membrane and intracellular compartments: transport and metabolism of fluorescent sphingomyelin analogues in cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 108:2169-2181.
- Koval, M. und R.E. Pagano. 1991. Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* 1082:113-125.
- Langner, M. und S.W. Hui. 1993. Dithionite penetration through phospholipid bilayers as a measure of defects in lipid molecular packing. *Chem. Phys. Lipids* 65:23-30.
- Larrick, J.W., M. Hirata, H. Zheng, J. Zhong, D. Bolin, J.-M. Cavillon, H.S. Warren und S.C. Wright. 1994. A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity. *J. Immunol.* 152:231-240.
- Lawrence, J.C., D.E. Saslowsky, J.M. Edwardson und R.M. Henderson. 2003. Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. *Biophys. J.* 84:1827-1832.
- Lehninger, A.L. 1983. Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim.
- Lehrer, R.I. und T. Ganz. 2002a. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.* 9:18-22.
- Lehrer, R.I. und T. Ganz. 2002b. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 14:96-102.

- Lugtenberg, B. und L. Van Alphen. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 737:51-115.
- McIntyre, J.C. und R.G. Sleight. 1991. Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry* 30:11819-11827.
- McLaughlin, S. 1989. The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18:113-136.
- Montal, M. 1974. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers. *Meth. Enzymol.* 32:545-554.
- Montal, M. und P. Mueller. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 3561-3566.
- Mueller, P., D.O. Rudin und H.T. Tien. 1962. Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system. *Nature* 194:979-981.
- Müller, D.J. und A. Engel. 1999. Voltage and pH-induced channel closure of porin OmpF visualized by atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 285:1347-1351.
- Neumecke, B. und P. Läuger. 1969. Nonlinear electric effects in lipid bilayer membranes II. Integration of the generalized Nernst-Planck equations. *Biophys. J.* 9: 1160-1170.
- Nikaido, H. und M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbial. Rev.* 49:1-32.
- Osborn, M.J., J.E. Gander, E. Parisi und J. Carson. 1972. Mechanism and assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 247:3962-3972.
- Pohl, E.E., U. Peterson, J. Sun und P. Pohl. 2000. Changes of intrinsic membrane potentials induced by flip-flop of long-chain fatty acids. *Biochemistry* 39:1834-1839.
- Requena, J., D.A. Haydon und S.B. Hladky. 1975. Lenses and Compression of Black Lipid Membranes by an Electric Field. *Biophys. J.* 15:77-81.

- Rietschel, E.Th., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, F. Di Padova, M. Schreier und H. Brade. 1994. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8:217-225.
- Sahly, H., S. Schubert, J. Harder, P. Rautenberg, U. Ullmann, J. Schroder und R. Podschun. 2003. *Burkholderia* is highly resistant to human β -defensin 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1739-1741.
- Sankaram, M.B. und T.E. Thompson. 1990. Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry* 29:10670-10675.
- Schatz, P.J. und J. Beckwith. 1990. Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 24:215-248.
- Schibli, D.J., H.N. Hunter, V. Aseyev, T.D. Starner, J.M. Wiencek, P.B. McCray, Jr., B.F. Tack und H.J. Vogel. 2002. The solution structures of the human β -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 277:8279-8289.
- Schindler, H. 1980. Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles. *FEBS Lett.* 122:77-79.
- Schoch, P., D.F. Sargent und R. Schwyzer. 1979. Capacitance and conductance as tools for the measurement of asymmetric surface potentials and energy barriers of lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 46:71-89.
- Sen, K., J. Hellman und H. Nikaido. 1988. Porin channels in intact cells of *Escherichia coli* are not affected by Donnan potentials across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 263:1182-1187.
- Sen, K. und H. Nikaido. 1991a. Lipopolysaccharide structure required for *in vitro* trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. *J. Bacteriol.* 173:926-928.
- Sen, K. und H. Nikaido. 1991b. Trimerization of an *in vitro* synthesized OmpF porin of *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* 266:11295-11300.

- Simons, K. und E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
- Simons, K. und G. van Meer. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27:6197-6202.
- Singer, S.J. und G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 173:720-731.
- Sokolov, V.S. und V.G. Kuz'min. 1980. Study of surface potential difference in bilayer membranes according to the second harmonic response of capacitance current. *Biofizika* 25:170-172.
- Stryer, L. 1978. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Ann. Rev. Biochem.* 47:819-846.
- Tang, Y.Q. und M.E. Selsted. 1993. Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial β -defensin peptide from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268:6649-6653.
- Tommassen, J. und B. Lugtenberg. 1981. Localization of phoE, the structural gene for outer membrane protein e in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 147:118-123.
- Weiss, M.S., U. Abele, J. Weckesser, W. Welte, E. Schiltz und G.E. Schulz. 1991. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254: 1627-1630.
- Weiss, M.S. und G.E. Schulz. 1992. Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227:493-509.
- White, S.H. 1970a. A study of lipid bilayer membrane stability using precise measurements of specific capacitance. *Biophys. J.* 10:1127-1147.
- White, S.H. 1970b. Thickness changes in lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 196:354-357.
- White, S.H. 1972. Analysis of the torus surrounding planar lipid bilayer membranes. *Biophys. J.* 12:432-445.

- White, S.H. 1974. Letter: Comments on "electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability". *Biophys. J.* 14:155-158.
- White, S.H. und T.E. Thompson. 1973. Capacitance, area, and thickness variations in thin lipid films. *Biochim. Biophys. Acta* 323:7-22.
- Wiese, A., P. Grünewald, K.J. Schaper und U. Seydel. 2001. Influence of acyl chain fluidity on the lipopolysaccharide-induced activation of complement. *J. Endotoxin. Res.* 7:147-155.
- Wiese, A., M. Münstermann, T. Gutschmann, B. Lindner, K. Kawahara, U. Zähringer und 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.
- Wiese, A., J.O. Reiners, K. Brandenburg, K. Kawahara, U. Zähringer und U. Seydel. 1996. Planar asymmetric lipid bilayers of glycosphingolipid or lipopolysaccharide on one side and phospholipids on the other: Membrane potential, porin function, and complement activation. *Biophys. J.* 70:321-329.
- Wiese, A., G. Schröder, K. Brandenburg, A. Hirsch, W. Welte und U. Seydel. 1994. Influence of the lipid matrix on incorporation and function of LPS-free porin from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1190:231-242.
- Wiese, A. und U. Seydel. 2000. Electrophysiological measurements on reconstituted outer membranes. *Methods Mol. Biol.* 145:355-370.
- Wobschall, D. 1972. Voltage dependence of bilayer membrane capacitance. *J. Colloid Interface Sci.* 40:417-423.
- Wu, Z., D.M. Hoover, D. Yang, C. Boulegue, F. Santamaria, J.J. Oppenheim, J. Lubkowski und W. Lu. 2003. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 8880-8885.
- Zachowski, A. 1993. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* 294 (Pt 1):1-14.

Zaiou, M. und R.L. Gallo. 2002. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J. Mol. Med.* 80:549-561.

Zanetti, M. 2003. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* Online-Publikation (am 22. Juli 2003) vor der Drucklegung.

Zanetti, M., R. Gennaro und D. Romeo. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374: 1-5.

Eidesstattliche Erklärung

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

Kiel, den

Lebenslauf

Name:		Hagge, Sven Olaf
Anschrift:		Königsberger Str. 68 24837 Schleswig
geboren	01.12.1973	in Schleswig
Familienstand:		ledig
Staatsangehörigkeit:		Deutsch
Hochschul- ausbildung:	seit 01.11.2000	Promotion am Forschungszentrum Borstel Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Abteilung Immunchemie und biochemische Mikrobiologie, Laborgruppe Biophysik
	10.1995	Studium der Physik an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Abschluß mit Diplom Prüfungsfächer: Theoretische Physik, Festkörperphysik, Biophysik und anorganische Chemie Diplomarbeit bei Prof. Dr. Seydel (Forschungszentrum Borstel): Bestimmung der inneren Membranpotentialdifferenz planarer Lipiddoppelschichten durch Inner Field- Compensation
Wehrersatzdienst:	1994/95	Zivildienstleistender im Feriedorf Golsmaas, des Deutschen Erholungswerks
Schulausbildung:	1990-1993	Fachgymnasium der Beruflichen Schulen des Kreises Schleswig-Flensburg
	1984-1990	Bruno-Lorenzen-Schule in Schleswig
	1980-1984	Schule Nord in Schleswig

Kiel, den..... ..

Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mir die Promotion ermöglicht haben und mir bei der Anfertigung der Arbeit stets tatkräftig zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Ulrich Seydel, Leiter der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel, für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Arbeit, für die konstruktiven Diskussionen, die intensive Betreuung und die anhaltende Unterstützung bei der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Andre Wiese und Dr. Thomas Gutschmann für die gute Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen. Herrn PD Dr. Klaus Brandenburg und Herrn PD Dr. Buko Lindner danke ich für Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die Beantwortung meiner Fragen zum Thema Lipopolysaccharide. Für die hervorragende Zusammenarbeit und die ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion danke ich Herrn Dr. Jörg Andrä, Frau Dipl. Phys. Stefanie Roes und Herrn Dipl. Chem. Alexander David.

Der gesamten Laborgruppe Biophysik danke ich für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima und die Hilfe die mir zu Teil wurde. Frau Helga Lüthje danke ich für die Extraktion und Aufreinigung des Lipopolysaccharides, Frau Brigitte Kunz für die Anfertigung massenspektrometrischer Untersuchungen, Frau Maren Lohs für die Hilfe bei der Anfertigung diverser Grafiken und Herrn Dipl.-Ing. Gerold von Busse für die Anfertigung infrarotspektrometrischer Untersuchungen. Für die Anfertigung der Foliensepten und die Unterstützung bei der Durchführung von Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten danke ich den Auszubildenden am Forschungszentrum Borstel.

Für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der gezeigten Untersuchungen danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 470 Projekt B5 und SFB 617 Projekt A17).

Für die Bereitstellung des Phosphoporphyrins von *Escherichia coli* danke ich Herrn Dr. Hans de Cock und seinen Mitarbeitern von der Universität Utrecht (Utrecht, Die Niederlande). Für die Versorgung mit Peptiden der Kathelizidinfamilie danke ich Herrn James W. Larrick vom Palo Alto Institute of Molecular Medicine (Mountain View, CA, USA).

Besonders herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Hildegard und Horst Hagge, bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben und stets für mich da waren. Für die moralische Unterstützung und die Ablenkung von der Arbeit während meiner Freizeit danke ich meinem Bruder Holger und meinen Freunden.