

Charakterisierung und Kontrolle selbstorganisierter Peptidhelixbündel in Phospholipidmembranen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Natascha Naarmann
aus Hamm

2005

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2001 bis Januar 2005 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Claudia Steinem am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Januar 2005.

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2005

1. Prüfer:	Prof. Dr. C. Steinem
2. Prüfer:	Prof. Dr. O. Wolfbeis
3. Prüfer:	Prof. Dr. B. Dick
Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. H. Krienke

Meiner Familie

und

Stephan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Phasenseparation hochfluorinierter Substanzen	1
1.2	<i>Coiled coil</i>-Strukturen	2
1.2.1	Das <i>coiled coil</i> -Motiv.....	2
1.2.2	Konzepte zum <i>de novo</i> -Design von synthetischen <i>coiled coil</i> -Strukturen..	5
1.2.3	Verwendete Peptidsequenzen.....	6
1.3	Lipid-Peptid-Wechselwirkungen	8
1.3.1	Modellmembranen	8
1.3.2	Phasenseparation in Lipiddoppelschichten	9
2	Zielsetzung	12
3	Materialien und Methoden	13
3.1	Präparative und Analytische Methoden	13
3.1.1	Vesikelpräparation	13
3.1.2	Phosphat-Test zur quantitativen Bestimmung von Phospholipidkonzentrationen	14
3.1.3	Bestimmung der Peptidkonzentration mittels UV-Spektroskopie	16
3.1.4	SDS-Gelelektrophorese zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Peptide.....	16
3.2	Fluoreszenzspektroskopische Methoden	18
3.2.1	Theoretische Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie.....	18
3.2.2	Allgemeine Messbedingungen der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen.....	20
3.2.3	Untersuchung der Insertion von Peptiden in Lipiddoppelschichten mittels Tryptophan-Fluoreszenz.....	20

3.2.3.1	Tryptophan-Fluoreszenz.....	20
3.2.3.2	Messbedingungen.....	22
3.2.4	Löschexperimente mit DOXYL-Sonden.....	23
3.2.4.1	Prinzip des Fluoreszenzquenchings	23
3.2.4.2	Quenchingexperimente mit DOXYL-stearinsäuren.....	25
3.2.4.3	Messbedingungen.....	27
3.2.5	Reversibilität der Peptidinsertion	28
3.2.5.1	Beschreibung des Versuchs und Probenvorbereitung.....	28
3.2.5.2	Messbedingungen.....	29
3.2.6	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET).....	29
3.2.6.1	Theoretische Grundlagen des Energie Transfers nach FÖRSTER	29
3.2.6.2	Untersuchung der Aggregation von Peptiden mittels FRET.....	32
3.2.6.3	Messbedingungen.....	33
3.2.7	Temperatur als Trigger für FRET	34
3.2.7.1	Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur einer Lipidmischung mittels Patman	34
3.2.7.2	Untersuchung der temperaturabhängigen Ausbildung von Lipiddomänen mittels FRET	35
3.2.7.3	Messbedingungen.....	36
3.3	CD-Spektroskopie	38
3.3.1	Theoretische Grundlagen der CD-Spektroskopie	38
3.3.2	Untersuchung der Sekundärstrukturen von Proteinen.....	42
3.3.3	Messbedingungen.....	44
3.4	ATR-FT-IR-Spektroskopie	45
3.4.1	Theoretische Grundlagen der FT-IR-Spektroskopie	45
3.4.2	Untersuchung der räumlichen Orientierung von Peptiden in Multischichten mittels ATR-FT-IR-Spektroskopie	48
3.4.3	Messbedingungen.....	52
4	Ergebnisse und Diskussion	53
4.1	Synthese der Peptide	53

4.2	Charakterisierung der Lipid-Peptid-Wechselwirkung.....	54
4.2.1	Visualisierung der Oligomerisierung der Peptide mittels SDS-Gelelektrophorese.....	54
4.2.2	Insertion der Peptide in Lipiddoppelschichten.....	56
4.2.2.1	Fluoreszenzintensität und λ_{\max} in Abhängigkeit des Lipid-zu-Peptidverhältnisses	56
4.2.2.2	Untersuchungen zur Reversibilität der Peptidinsertion.....	64
4.2.2.2.1	Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Vesikelsuspension	64
4.2.2.2.2	Zeitliche Abhängigkeit der Reversibilität	69
4.2.3	Lokalisierung des Tryptophan-Rests in der Membran.....	69
4.2.3.1	Fluoreszenzintensität in Anwesenheit der Quencher 5- und 16-DOXYL-stearinsäure.....	69
4.2.3.2	Berechnung des Abstands zwischen dem Tryptophan-Rest und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht nach Perrin.....	75
4.2.4	Bestimmung der Sekundärstruktur der Peptide mittels CD-Spektroskopie	77
4.2.4.1	CD-Spektren.....	77
4.2.4.2	Elliptizitäten und α -helikaler Gehalt.....	80
4.2.5	Untersuchung der räumlichen Orientierung der Peptide in der Membran	81
4.2.5.1	ATR-FT-IR-Spektren.....	81
4.2.5.2	Bestimmung der räumlichen Orientierung der Peptide in der Membran..	83
4.2.6	Diskussion	85
4.3	Kontrolle der Aggregation der Peptide durch die Einführung fluorinierter Seitenketten.....	94
4.3.1	Theoretische Betrachtung der FRET-Experimente	94
4.3.2	Untersuchung des Aggregationszustands der Peptide in Lipidvesikeln mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET).....	96
4.3.3	Diskussion	105
4.4	Kontrolle der Aggregation der Peptide auf Membranebene	108
4.4.1	Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur einer DPPC/POPC-Mischung (6:4) nach der Patman-Methode.....	109

4.4.2	Untersuchung der Ausbildung DPPC-haltiger Domänen in DPPC/POPC-Mischungen (6:4) mittels FRET.....	111
4.4.3	Temperaturabhängigkeit der Energie Transfer-Effizienz gelabelter Peptide in einer Lipidmischung.....	113
4.4.4	Diskussion	115
5	Zusammenfassung	118
6	Literaturverzeichnis.....	120
7	Anhang	131
7.1	Symbolverzeichnis.....	131
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	134
7.3	Chemikalien	135
7.4	Materialien	136
7.5	Geräte	137

1 Einleitung

1.1 Phasenseparation hochfluorinierter Substanzen

Es gibt Moleküle, die in der Lage sind in einem selbstorganisierenden Prozess unter Beteiligung zahlreicher intermolekularer Wechselwirkungen Aggregate auszubilden. Neben hydrophilen und hydrophoben Effekten sind hierbei auch Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte involviert.

Bei der Ausbildung biologischer Makromoleküle spielt in erster Linie der hydrophobe Effekt eine sehr große Rolle. Er stellt die Haupttriebkraft für die Faltung von Makromolekülen, für die Bindung von Substraten an Enzyme und für die Bildung von Membranen dar. Unter dem hydrophoben Effekt versteht man das Phänomen, dass unpolare Moleküle dazu tendieren sich in Wasser zu größeren Aggregaten zusammenzulagern, um die Entropieabnahme durch die Ausbildung geordneter Wasserstrukturen möglichst gering zu halten (Frank and Evans, 1945; Winter and Noll, 1998). Demnach ist die Phasenseparation unpolare Oberflächen ein wichtiges Strukturelement in biologischen Systemen.

Eine Möglichkeit die hydrophoben Wechselwirkungen von Molekülen zu forcieren, besteht in der Verwendung fluorinierter Materialien. Aus diesem Grund beschäftigen sich die Arbeitsgruppen von DeGrado und Kumar mit Proteinen und Peptiden, die durch den Einbau von fluorinierten Aminosäuren modifiziert wurden und veränderte Eigenschaften in den intermolekularen Wechselwirkungen aufweisen. Das Hauptaugenmerk der Forschungen richtet sich dabei auf die stabilisierende Wirkung der eingeführten fluorinierten Seitenketten bezogen auf die gebildeten Oligomere (Bilgicer et al., 2001a; Bilgicer and Kumar, 2002; Bilgicer et al., 2001b; Tang et al., 2001a; Tang et al., 2001b).

Der Grund für die unterschiedlich starken Wechselwirkungen der fluorinierten Substanzen verglichen mit den nicht fluorinierten Analoga beruht auf der Erhöhung

des unpolaren Charakters der Moleküle. Nach Israelachvili et al. weisen fluorinierte CF_2 - und CF_3 -Gruppen ein deutlich größeres Volumen von 38 und 92 \AA^2 auf als die entsprechenden CH_2 - und CH_3 -Gruppen mit 27 und 54 \AA^2 (Israelachvili et al., 1977). Da der hydrophobe Effekt sich proportional zu der an das Lösungsmittel angrenzenden Moleküloberfläche verhält (Tanford, 1980) und die fluorinierten Reste darüber hinaus eine geringere Polarisierbarkeit besitzen als die H-Analoga, wird die Hydrophobizität erhöht. Ein weiterer Effekt, der ebenfalls auf die geringe Polarisierbarkeit fluorinierter Substanzen zurückzuführen ist, sind die kleinen kohäsiven Energiedichten, die dazu führen, dass die Moleküle nur eine sehr geringe Tendenz zur Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen aufweisen (Riess, 1994; Scott, 1948). Entsprechend zeigen Peptide oder Proteine mit fluorinierten Seitenketten sowohl einen lipophoben als auch einen hydrophoben Charakter und neigen in Membranen zur Phasenseparation (Neil and Marsh, 2000). Es wird vermutet, dass fluorinierte Peptide oder Proteine, die in der Lage sind *coiled coil*-Strukturen zu formen, einen fluorinierten Kern ausbilden (Hildebrand and Cochran, 1949; Scott, 1948). Dieser eröffnet zahlreiche neue Möglichkeiten auf dem Gebiet der Stabilität von nativen Proteinstrukturen in organischen Lösungsmitteln (Zaks and Klibanov, 1984), der selektiven Protein-Protein-Wechselwirkungen (Neil and Marsh, 2000) oder im Bereich des Designs neuer Transmembranhelizes (Bilgicer et al., 2001a; Kienker et al., 1994; Marsh, 1996; Mingarro et al., 1997).

1.2 *Coiled coil*-Strukturen

1.2.1 Das *coiled coil*-Motiv

Die α -Helix ist ein wichtiges Sekundärstrukturelement, das u.a. durch die Ausbildung sogenannter *coiled coil*-Strukturen an der Stabilisierung von Proteinen beteiligt ist. Unter *coiled coil*-Strukturen versteht man definitionsgemäß Bündel von zwei oder mehr α -Helizes, die sich in einem Winkel von ca. 20° umeinanderwinden und über Wechselwirkungen, welche die Helizes untereinander ausbilden, stabilisiert werden (superspiralisierte α -Helix, Abb. 1–1) (Crick, 1953; Stryer, 1996).

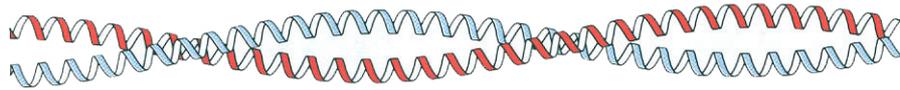


Abb. 1–1: Darstellung einer doppelsträngigen α -helikalen Superhelix (coiled coil) (Stryer, 1996).

Die Ausbildung von *coiled coil*-Strukturen basiert auf dem Vorhandensein einer sich wiederholenden Sequenz von 7 Aminosäuren [abcdefg]_n (*heptad repeat*) (Abb. 1–2), wobei die Positionen **a** und **d** charakteristischerweise mit hydrophoben Resten besetzt sind (Adamson et al., 1993; Hodges, 1996) und den Kern der Struktur ausbilden (Harbury et al., 1993; Kohn et al., 1997). Häufig befindet sich ein Leucin-Rest in Stellung **d**, da dies die aliphatische Aminosäure mit der höchsten stabilisierenden Wirkung auf die *coiled coil*-Struktur darstellt (Moitra et al., 1997). Neben den Wechselwirkungen der Positionen **a** und **d** können aber auch Interaktionen zwischen **e** und **g** eine Rolle spielen, die im allgemeinen mit hydrophilen Aminosäuren belegt sind und bei der Ausbildung von *coiled coil*-Strukturen in der Größe von Tetrameren zum Tragen kommen (Abb. 1–2). Demnach sind sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Wechselwirkungen an der Stabilisierung einer *coiled coil*-Struktur beteiligt (Betz and DeGrado, 1996; Lazo and Downing, 2001; Lumb and Kim, 1995b; Zhou et al., 1992), die darüber entscheiden wie viele Helizes in den Aufbau der Oligomere integriert werden. In der Natur sind zahlreiche Beispiele für Aggregate in der Größe von Dimeren, Trimeren oder Tetrameren bekannt. Abb. 1–2 zeigt die **a-d**-Wechselwirkungen der unterschiedlichen *coiled coil*-Varianten.

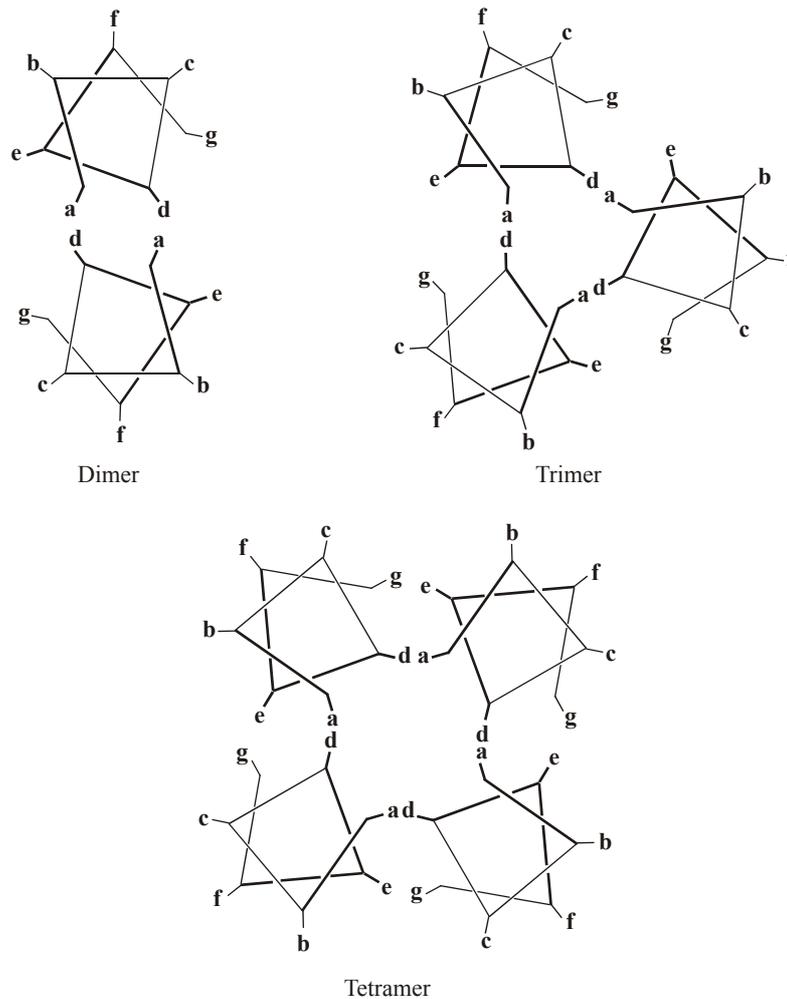


Abb. 1–2: Darstellung der **a-d**-Wechselwirkung in dimeren, trimeren und tetrameren *coiled coil*-Strukturen.

Typische Beispiele für Proteine, in denen dimere *coiled coil*-Bereiche auftreten, sind Tropomyosin, Myosin oder die längste bisher beobachtete zweisträngige *coiled coil*-Struktur NuMA (Harboth et al., 1995). Mit Hilfe von kristallographischen und NMR-Untersuchungen konnte für den Leucin-Zipper (bZIP)¹ ebenfalls eine Ausbildung von Dimeren bestätigt werden (Glover and Harrison, 1995). Bekannte Oligomere in der Größe von Trimeren werden u.a. von Laminin, Tenascin und Fibrinogen ausgebildet (Woolfson and Alber, 1995). Ein weiterer bekannter Vertreter, dessen dreisträngige *coiled coil*-Struktur mittels Kristallstrukturanalyse nachgewiesen wurde, ist der GCN4 Leucin-Zipper und die entsprechenden synthetischen Analoga (Harbury et al., 1994). Tetramere Formen wurden z.B. für die isolierten Polypeptidketten des Apolipoprotein E3 (Wilson et al., 1991) und das menschliche Wachstumshormon (de Vos et al., 1992) beobachtet.

1.2.2 Konzepte zum *de novo*-Design von synthetischen *coiled coil*-Strukturen

Für das *de novo*-Design von Peptiden und Proteinen werden im allgemeinen relativ einfache und gut charakterisierte Faltungsmotive ausgewählt, die ein rationales Design der Moleküle ermöglichen. Da die Wechselwirkungen, die zur Ausbildung von *coiled coil*-Helixbündeln führen, sehr gut untersucht sind, ist dieses ein weit verbreitetes Motiv (Lupas, 1997).

Tripet et al. untersuchten im Speziellen die Auswirkungen von Modifikationen in zentraler Position des *heptad repeat*-Motivs. Es wurden systematisch 20 verschiedene Aminosäuren in Stellung **d** eines nach dem *de novo*-Design synthetisierten *coiled coil*-Modellpeptids eingesetzt und CD-spektroskopisch auf die Stabilität der Strukturen untersucht. Der Aggregationszustand wurde über Ultrazentrifugation und Größenausschlusschromatographie ermittelt (Tripet et al., 2000).

Ein Modell auf das häufig zurückgegriffen wird, ist die Vier-Helixstruktur. DeGrado et al. entwickelten eine Polypeptidsequenz, die aufgrund nicht kovalenter, hydrophober Interaktionen Tetramere ausbildet, basierend auf einem *coiled coil* einer sich wiederholenden Sequenz von sieben Aminosäuren (*heptad repeat*) (Betz et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit helikale Bündel anzuordnen wurde von Ghadiri et al. postuliert. Hierbei wurden mit Hilfe von N-terminalen Liganden jeweils drei Helizes über Übergangsmetalle komplexiert (Ghadiri et al., 1992a; Ghadiri et al., 1992b).

Zur Untersuchung von Helixbündeln in Detergenzmicellen wurden im allgemeinen Peptide und Proteine mit bekannten Strukturmotiven verwendet und entsprechend modifiziert. DeGrado et al. ersetzten in der Peptidsequenz des GCN4-Zippers polare Aminosäuren durch hydrophobe und gewährleisteten auf diesem Weg die Lipidlöslichkeit des Peptids (Choma et al., 2000). Die Gruppe führte Untersuchungen mittels Ultrazentrifugation, SDS-Gelelektrophorese und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer-Messungen an den entsprechenden gelabelten Molekülen zur selbstorganisierten Aggregation dieser Peptide in verschiedenen Detergenzien durch. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Austausch eines einzigen Asparagin-Rests

durch ein Valin zu einem Verlust der Assoziationsfähigkeit des Peptids führt (Choma et al., 2000; Gratkowski et al., 2001).

Eine neue Variante von Peptid-Peptid-Wechselwirkungen, die bereits in Kap. 1.1 angesprochen wurde und sowohl an hydrophoben als auch an lipophilen Grenzflächen beobachtet werden kann, wurde von Kumar et al. beschrieben. Durch die Einführung fluorhaltiger Aminosäuren konnten sie zeigen, dass die postulierte Phasenseparation hochfluorinierter Substanzen zur Ausbildung von Peptidaggregaten führt, die höhere Stabilitäten aufweisen als die entsprechenden nicht fluorinierten Analoga (Bilgicer et al., 2001a; Bilgicer and Kumar, 2002; Bilgicer et al., 2001b; Borman and Washington, 2001). Die Arbeitsgruppe untersuchte die Veränderungen der Wechselwirkungen der Peptide inseriert in Detergenz-Micellen, verglichen mit dem Verhalten der entsprechenden nicht fluorinierten Analoga. Als Detergenzien wurden hierbei Natriumdodecylsulfat (SDS), Octylpentaethylglykoether (C8E5) und Dodecyloctaethylglykoether (C12E8) verwendet. Mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese, Ultrazentrifugation und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer-Messungen an den entsprechenden gelabelten Peptiden konnten Kumar et al. im Falle der fluorinierten Moleküle die Ausbildung tendenziell größerer und stabilerer Oligomere beobachten.

Vergleichbare Untersuchungen wurden von DeGrado et al. an dem modifizierten Leucin-Zipper Peptid GCN4-p1d durchgeführt. Die Gruppe konnte mittels CD-spektroskopischen Untersuchungen und Simulationen zur Moleküldynamik zeigen, dass die Einführung fluorinierter Aminosäuren zu einer Erhöhung der Resistenz gegen denaturierende Reagenzien und der thermischen Stabilität der *coiled coil*-Struktur führt (Tang et al., 2001b).

1.2.3 Verwendete Peptidsequenzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide verwendet, die nach dem Vorbild einer *coiled coil*-Struktur synthetisiert wurden. Durch die Herstellung entsprechender fluorinierter Analoga sollte die stabilisierende Wirkung von fluorinierten Seitenketten auf die Oligomerisierung der Peptide in Lipidvesikeln untersucht werden.

TMH-1 und TMH-2.

Ausgehend von der 33 Aminosäuren umfassenden *coiled coil*-Domäne des GCN4-Zippers wurden von Kumar et al. die beiden Peptide TMH-1 und TMH-2 synthetisiert (Abb. 1–3) (Bilgicer and Kumar, 2004).



Abb. 1–3: Peptidsequenzen der Peptide TMH-1 (oben) und TMH-2 (unten). Das Buchstabensymbol B steht für die Aminosäure β -Alanin.

Um die Lipidlöslichkeit der Moleküle zu gewährleisten, wurden die hydrophilen Aminosäuren in der Teilsequenz des GCN4-Zippers durch entsprechende hydrophobe Reste ersetzt. Gleichzeitig wurden am C-terminalen Ende fünf Lysin-Reste eingeführt, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen (Li et al., 2003). Die beiden Peptide unterscheiden sich in ihrer Sequenz nur durch eine Aminosäure. Der Asparagin-Rest in Position vierzehn des TMH-1 wurde im TMH-2 durch ein Leucin ersetzt, wodurch die Assoziationsfähigkeit des Peptids herabgesetzt werden sollte. In Position vier befindet sich ein Tryptophan-Rest, der zahlreiche Fluoreszenzuntersuchungen zu den Lipid-Peptid-Wechselwirkungen ermöglicht.

TMF-1 und TMF-2.

Zur Untersuchung der Phasenseparation hochfluorinierter Substanzen und der Stabilisierung von Aggregaten, deren Peptide fluorhaltige Aminosäuren enthalten, wurden die beiden fluorinierten Analoga TMF-1 und TMF-2 von Kumar et al. synthetisiert (Abb. 1–4) (Bilgicer and Kumar, 2004).



Abb. 1–4: Peptidsequenzen der Peptide TMF-1 (oben) und TMF-2 (unten). Bei den grün gekennzeichneten Leucin-Resten handelt es sich um die fluorinierte Aminosäure 5, 5, 5, 5', 5', 5'-Hexafluoroleucin.

Zur Darstellung der fluorinierten Komponenten wurden lediglich die grün gekennzeichneten Leucin-Reste im TMH-1 und TMH-2 durch 5, 5, 5, 5', 5', 5'-Hexafluoroleucin (Abb. 1–5) ersetzt (Xing et al., 2001).

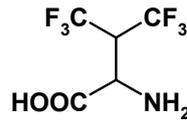


Abb. 1–5: Strukturformel der fluorinierten Aminosäure 5, 5, 5, 5', 5', 5'-Hexafluoroleucin.

1.3 Lipid-Peptid-Wechselwirkungen

1.3.1 Modellmembranen

Das Wissen über die Struktur und Dynamik biologischer Membranen basiert zu großen Teilen auf biophysikalischen Studien an künstlichen Lipiddoppelschichten. Hierfür bedient man sich häufig synthetischer Modellmembranen, die nur aus ein oder zwei Sorten von Lipiden aufgebaut und in definierter Zusammensetzung darstellbar sind. Je nach Wahl der Präparationsmethode können unterschiedliche Doppelschichtsysteme hergestellt werden. Planare, freitragende Lipiddoppelschichten entstehen, wenn die Lipide, gelöst in einem unpolaren organischen Lösungsmittel wie Dekan, über eine schmale Öffnung (bis zu 1 mm) einer Teflonscheibe in wässriger Lösung gestrichen werden (Lakey and Pattus, 1989; Mueller et al., 1962). Durch das Spreiten von Lipiden in organischen Lösungsmitteln an der Luft-Wasser-Grenzfläche werden Monoschichten hergestellt (Schacht et al., 1955). Festkörperunterstützte Membranen können über das Spreiten von Vesikeln (Sackmann, 1996) oder die Langmuir-Blodgett-Technik erhalten werden (Roberts, 1990; Schacht et al., 1955). Durch das Dispergieren von Lipid in Wasser bilden sich multilamellare Vesikel (Liposomen) aus (Abb. 1–6 links). Diese können mit Hilfe von hochfrequenten Schallwellen oder der Extrusionsmethode nach MacDonald in unilamellare Vesikel (Abb. 1–6 rechts) überführt werden (MacDonald et al., 1991; Stryer, 1996).

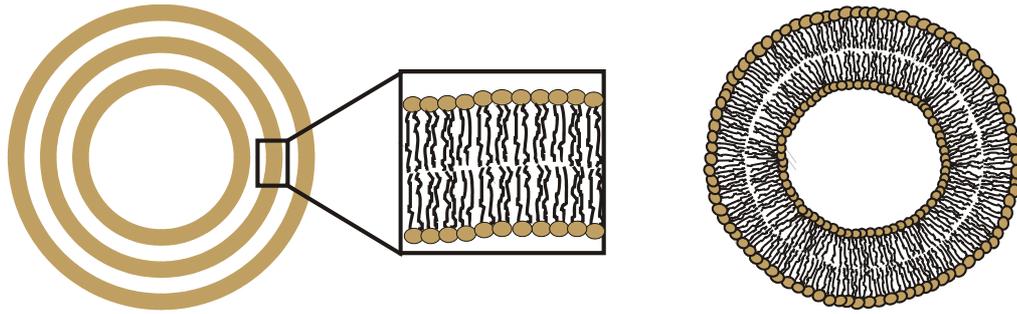


Abb. 1–6: Schematische Darstellung des Querschnitts durch einen multilamellaren Vesikel (links) bzw. einen unilamellaren Vesikel (rechts).

1.3.2 Phasenseparation in Lipiddoppelschichten

Natürliche Membranen bestehen im allgemeinen nicht aus einer einzigen fluiden Matrix, sondern weisen verschiedene Lipidkomponenten auf, die in unterschiedlichen physikalischen Zuständen nebeneinander koexistieren können. Ein Beispiel, das in der Literatur in den letzten Jahren viel diskutiert wurde, ist die Existenz von sogenannten *Lipid-rafts*, die auf der Ausbildung Sphingomyelin- und Cholesterinreicher Domänen in biologischen Membranen beruhen (Cottingham, 2004).

Um eine Phasenseparation in Modellmembranen zu induzieren, können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Ross et al. beschrieben die Möglichkeit DPPS-reiche Domänen in einer 4:1-Mischung von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin (DPPS) durch eine Komplexierung der negativ geladenen Lipide mittels Calcium zu erreichen (Ross et al., 2001).

Eine andere Methode basiert auf der Verwendung von Cholesterol und Sphingomyelin in Lipidmischungen. Shaikh et al. wiesen mit Hilfe der Filmwaagetechnik und über *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) die Ausbildung von 1-Stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (SDPE)-reichen fluiden ungeordneten Bereichen und Cholesterin- bzw. Sphingomyelin-reichen fluiden geordneten Domänen nach (Shaikh et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit um eine Phasenseparation in Lipidmischungen zu induzieren, besteht in der Variation der Temperatur. Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen visualisierten Shoemaker et al. DPPC-haltige Domänen, die unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur ausgebildet

werden und die fluide 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC)-Membran netzwerkartig durchspannen (Shoemaker and Vanderlick, 2003). Ein ähnliches Phänomen wurde von de Almeida et al. in einer 1:1-Mischung von 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC) und 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC) beobachtet. Die Phasenseparation wurde hierbei, wie auch in anderen Studien, über den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer zwischen fluoreszenten Proben untersucht, die unterschiedliche Affinitäten zur Gel- und zur flüssig-kristallinen Phase aufweisen (de Almeida et al., 2002; Leidy et al., 2001; Pedersen et al., 1996). Giocondi et al. beschrieben die temperaturgesteuerte Ausbildung von Domänen in festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten, die mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM) visualisiert werden konnte (Giocondi et al., 2001).

Die Tatsache den physikalischen Zustand einer Membran beeinflussen zu können, bietet die Möglichkeit die Phasenseparation von Lipiddoppelschichten zur Regulierung von Prozessen anderer Komponenten in der Membran auszunutzen. In der Literatur sind Beispiele bekannt, die sich mit der Kontrolle der Aggregation von Peptiden oder Proteinen auf der Lipidebene auseinandersetzen.

Janosch et al. untersuchten das Verhalten eines Lipid und fluoreszenzgelabelten Peptids, dass eine große Affinität zur fluiden 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC)-Phase in Mischungen von DMPC/DSPC/Cholesterol aufweist. In Temperaturbereichen, in denen Gel- und DMPC-reiche fluide Phasen koexistieren, konnte eine erhöhte Aggregation der Peptide nachgewiesen werden (Janosch et al., 2004).

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit dem Phänomen der erhöhten Oligomerisierung von Peptiden und Proteinen in Lipidmembranen in Anwesenheit von Sphingomyelin und Cholesterol. Shigematsu et al. führten die fluoreszierende Aminosäure Pyrenylalanin in die Sequenz des α -helikalen Transmembranpeptids P₂₄ ein und beobachteten eine erhöhte Excimerfluoreszenz, wenn die Peptide in Lipiddoppelschichten (Ei-PC) in Anwesenheit von Cholesterol und Sphingomyelin inseriert vorlagen. Diese Tatsache wurde auf die Abnahme des flüssig-kristallinen Anteils in der Membran und die damit verbundene erhöhte Aggregation der Peptide in der Membran zurückgeführt (Shigematsu et al., 2002). Mit Hilfe von Rhodamin gelabeltem HIV_c konnten Sáez-Ciri3n et al. zeigen, dass die Assoziation des Peptids

in POPC-Membranen in Anwesenheit von Cholesterol und Sphingomyelin erhöht wird (Sáez-Ciri3n et al., 2002).

2 Zielsetzung

Die Faltung von Proteinen resultiert in einer dreidimensionalen Struktur, deren Konformation über eine ganze Reihe von nicht kovalenten Wechselwirkungen ausgebildet wird. Zur Stabilisierung der Struktur muss die Oberfläche, die mit dem wässrigen Medium in Kontakt kommt, so minimal wie möglich gehalten werden. Diese Aufgabe wird in erster Linie durch hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Tertiärstruktur erfüllt. Um einen Einblick in den Mechanismus und eine mögliche Beeinflussung der Proteinfaltung zu bekommen, wird auf die Untersuchung einzelner Sekundärstrukturelemente zurückgegriffen, die maßgeblich an der Stabilisierung von Proteinen beteiligt sind. Hierzu gehören u.a. α -helikale *coiled coil*-Strukturen, die anhand einer Reihe von Messmethoden auf ihr Aggregationsverhalten getestet werden können. In der Literatur sind Arbeiten bekannt, die sich in erster Linie auf die Untersuchungen der Oligomerisierung der Moleküle in Detergenzmicellen als Modellsystem beschränken. Eine weitaus bessere Übereinstimmung mit den natürlichen Gegebenheiten in biologischen Membranen kann mit Hilfe von Studien an Phospholipidvesikeln erreicht werden.

In dieser Arbeit sollten die Wechselwirkungen der Peptide TMH-1 und TMH-2 mit Lipidmembranen untersucht werden, die nach dem Vorbild der 33 Aminosäuren umfassenden α -helikalen *coiled coil*-Struktur des GCN4-Zippers von Kumar et al. synthetisiert wurden. Gleichzeitig wurden fluorinierte Analoga der Peptide, TMF-1 und TMF-2, hergestellt, deren Aggregationsverhalten in Lipidvesikeln mit dem der Peptide TMH-1 und TMH-2 verglichen werden sollten. So sollte geklärt werden, ob eine Phasenseparation der hochfluorinierten Substanzen auftritt und inwieweit dies zu einer Erhöhung der Stabilität und der Größe von nicht kovalenten Peptidoligomeren führt.

Durch die Verwendung von Lipidmischungen, die in der Lage sind Membrandomänen auszubilden, die eine unterschiedliche Löslichkeit der Peptide besitzen, sollte ein System zur Kontrolle der Oligomerisierung der Peptide auf Membranebene entwickelt werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Präparative und Analytische Methoden

3.1.1 Vesikelpräparation

Vesikelpräparation unter vorherigem Einbau von Peptiden in den Lipidfilm.

Große unilamellare Vesikel bestehend aus 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) (Abb. 3–1), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) (Abb. 3–2) oder einer Mischung von DPPC und POPC im Verhältnis 6:4 wurden mit Hilfe der unter Punkt 1.3.1 beschriebenen Extrusionsmethode hergestellt (MacDonald et al., 1991).

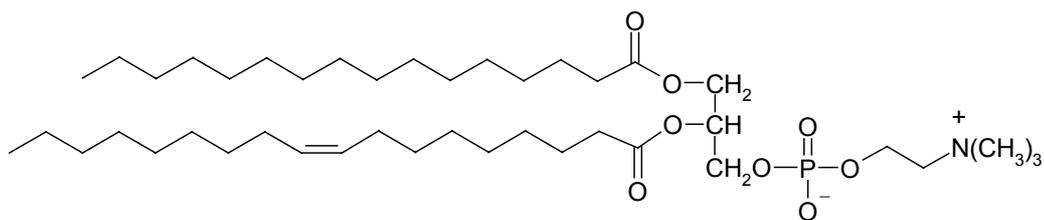


Abb. 3–1: Strukturformel des Lipids 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC).

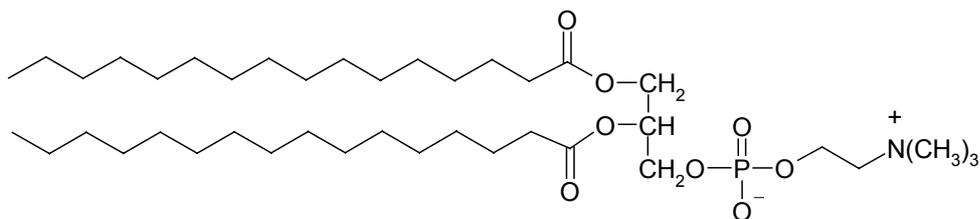


Abb. 3–2: Strukturformel des Lipids 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC).

Hierfür wurden zunächst entsprechende Mengen der in Chloroform gelösten Lipide und der in Ethanol gelösten Peptide in einem Reagenzglas vereint. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom zu einem dünnen, an der Glaswand haftenden Film verblasen. Um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen, wurden die Proben für 3 Stunden im Vakuum getrocknet. Die Filme wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung multilamellarer Vesikel wurde der Lipid-Peptid-Film nach Zugabe einer entsprechenden Menge Wasser 15 min lang im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in periodischen Abständen (4 x 30 s im Abstand von jeweils 5 min) auf einem Vortexer geschüttelt.

Zur Herstellung von großen unilamellaren Vesikeln mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm wurde die Vesikelsuspension mit Hilfe eines Miniextruders (Liposofast[®], Avestin) 31 mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm gepresst.

Die gesamte Präparation musste bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m der entsprechenden Lipide bzw. der Lipidmischung durchgeführt werden. Für POPC erfolgten daher alle Schritte bei Raumtemperatur, während für DPPC bzw. eine Mischung von DPPC/POPC im Verhältnis 6:4 bei einer Temperatur von 50 °C gearbeitet wurde, um oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur von reinem DPPC ($T_m = 41$ °C) zu verbleiben.

Vesikelpräparation ohne vorherigen Einbau von Peptiden in den Lipidfilm.

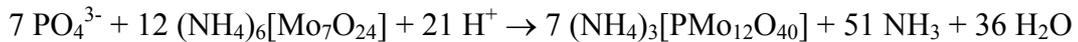
Für die Messungen, bei denen die Peptide erst nachträglich in die bereits hergestellten unilamellaren Vesikel insertiert wurden, erfolgte die Filmpräparation wie zuvor beschrieben, jedoch ohne Zugabe einer Peptidlösung.

Teilweise wurden die Vesikelsuspensionen vor Gebrauch mit Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) verdünnt. Der pH-Wert des Puffers wurde hierbei grundsätzlich durch Titration mit Salzsäure mittels eines pH-Meters des Typs Calimatic 766 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin) eingestellt.

3.1.2 Phosphat-Test zur quantitativen Bestimmung von Phospholipidkonzentrationen

Für verschiedene Messungen war es im Verlauf der praktischen Arbeit notwendig den Phospholipidgehalt einer Vesikelsuspension genau zu quantifizieren. Zu diesem Zweck eignet sich der Phosphat-Test nach der Ascorbinsäuremethode (Chen et al., 1956), mit dessen Hilfe der in den Lipiden enthaltene Phosphor nachgewiesen werden kann. Da sich der Nachweis auf anorganisches Phosphat beschränkt, mussten die Lipide zunächst verascht werden. Hierbei wurde der organisch gebundene Phosphor mittels einer nassen Veraschung in Perchlorsäure in anorganisches

Phosphat überführt, das in saurer Lösung mit Ammoniumheptamolybdat einen gelben Phosphomolybdatkomplex bildet:



Durch Reduktion mit Ascorbinsäure wurde dieser Komplex in Molybdänblau überführt. Unter Molybdänblau versteht man die tiefblaue, kolloidale Lösung von $[(\text{MoO})_{3-x}(\text{OH})_x]$, deren genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist. Die intensive Färbung ist auf die gleichzeitige Anwesenheit von Mo(IV) und Mo(VI) zurückzuführen und erlaubt die photometrische Bestimmung des Phosphatgehalts der Lösung bei einem Absorptionsmaximum von 820 nm.

Durchführung.

Zur Erstellung einer Eichgerade wurden 12.5 µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl und 100 µl einer NaH_2PO_4 -Stammlösung mit einer Phosphorkonzentration von [20 µg/ml] in Reagenzgläser pipettiert. Für die zu untersuchenden Lipidproben wurden je nach Konzentration und Verfügbarkeit zwischen 10 und 100 µl verwendet. Zusätzlich wurde eine Nullprobe mitgeführt. Sowohl für die Eich- als auch für die Lipidproben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Für die Veraschung wurden die Proben mit jeweils 200 µl 70 %iger Perchlorsäure versetzt und für 1 Stunde bei 200 °C in einem Aluminiumblock erhitzt, bis die Säure vollständig abgeraucht war. Die abgekühlten Proben wurden mit je 700 µl Reagenz A (0.45 % Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, 12.5 % Perchlorsäure) und Reagenz B (1.8 % Ascorbinsäure) versetzt und für 5 Minuten auf 80 °C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben bei 820 nm ermittelt. Der Lipidgehalt der unbekanntenen Probe in mg/ml wurde nach Gl. 3–1 berechnet:

$$c(\text{Lipid})_{\text{Probe}} = c(\text{P})_{\text{Lsg.}} / M(\text{P}) \cdot M(\text{Lipid}) \cdot V_{\text{Lsg.}} / V_{\text{Probe}} \cdot \text{VF} \quad \text{Gl. 3-1}$$

Dabei ist $c(\text{P})_{\text{Lsg.}}$ die Phosphorkonzentration in mg/ml, die aus der Steigung der Eichgerade bestimmt wurde, die durch Auftragung der Extinktion in Abhängigkeit von der Phosphorkonzentration $c(\text{P})_{\text{Lsg.}}$ erhalten wird (Lambert-Beersches-Gesetz, Gl. 3–2). $M(\text{P})$ bzw. $M(\text{Lipid})$ geben die molaren Massen M für Phosphor (30.97 g/mol) bzw. das entsprechende Phospholipid an. $V_{\text{Lsg.}}$ ist das Gesamtvolumen der Lösung (1400 µl), V_{Probe} das eingesetzte Volumen der zu untersuchenden Lipidprobe in µl und VF der Verdünnungsfaktor, der mit einbezogen werden musste, wenn die

Probe vor der photometrischen Untersuchung aus Konzentrationsgründen verdünnt wurde.

3.1.3 Bestimmung der Peptidkonzentration mittels UV-Spektroskopie

Die Peptidkonzentrationen wurden mit Hilfe eines Cary 50 Bio UV-Spektrometers (Varian, Darmstadt) ermittelt. Dabei wurde für die ungelabelten Peptide die Absorption des Tryptophanrests bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} von 5690 l/cm·mol gemessen (Fasman, 1976; Gill and von Hippel, 1989; Larive et al., 1997). Die Konzentrationen der farbstoffgelabelten Peptide wurde über die Absorption der Fluorophore 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD) ($\epsilon_{460} = 23000$ l/cm·mol in EtOH, $\epsilon_{485} = 28744$ l/cm·mol in H₂O/DMSO (8:2)) und 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) ($\epsilon_{550} = 92000$ l/cm·mol in EtOH, $\epsilon_{551} = 96363$ l/cm·mol in H₂O/DMSO (8:2)) bestimmt. Die Konzentration c wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz mit Gl. 3-2 berechnet:

$$c = E / \epsilon \cdot d \quad \text{Gl. 3-2}$$

Hierbei ist c die Konzentration der Lösung in mol/l, E die Extinktion, ϵ der Extinktionskoeffizient in l/cm·mol und d die Schichtdicke der Küvette in cm.

3.1.4 SDS-Gelelektrophorese zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Peptide

Durch Insertion der Peptide TMH-1 und TMH-2 und deren fluorinierter Analoga TMF-1 und TMF-2 in Vesikel oder SDS-Mizellen kann es zur Ausbildung von Oligomeren kommen. Eine schnelle und einfach zu handhabende Methode zur Untersuchung der Aggregation der Peptide ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), die Aufschluss über die Größe der ausgebildeten Oligomere geben kann.

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Peptide und Proteine aufgrund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen getrennt. Polyacrylamidgele werden durch Polymerisation von Acrylamid und Quervernetzung mit N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Die Porengröße und somit auch der Trennbereich des Gels kann durch die Konzentration

an Acrylamid und den Anteil an Bisacrylamid variiert werden. Für die Arbeit wurde ein Gel der Zusammensetzung 20 % Acrylamid und 0.53 % Bisacrylamid (37.5:1) verwendet. Die radikalische Polymerisation wurde mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator initiiert. Als Leition wurde Tricin verwendet, das eine bessere Auftrennung von kleinen Peptiden und Proteinen (1 bis 100 kDa) bei niedrigeren Acrylamidkonzentrationen erlaubt, als bei der gängigen SDS-Gelelektrophorese mit Glycin (Schägger and von Jagow, 1987).

Die zu untersuchenden Proben (TMH-1, TMH-2 und deren fluorinierte Analoga) wurden in Ethanol gelöst und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verblasen. Anschließend wurden die Peptide in dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgenommen. Nach der Insertion der Peptide in die SDS-Mizellen konnten die Moleküle miteinander aggregieren. Es entstand ein Komplex, dessen negative Ladung der Masse der monomeren oder oligomeren Peptide proportional ist. Für das Gel wurden pro Peptid 5 µg in 15 µl Probenpuffer aufgetragen.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 20 mV durchgeführt. Nach erfolgter Trennung erhielt man eine Reihe von Banden, die mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt wurden. Die Entfärbung der Gele erfolgte anschließend mit einer Methanol-Eisessig-Lösung.

Tab. 3–1: Zusammensetzung der in der SDS-Gelelektrophorese verwendeten Reagenzien.

Trenngel (20 %)	Sammelgel (4 %)
1.94 ml 3.1 M Tris/HCl, pH 6.8	2.57 ml 3.1 M Tris/HCl, pH 8.2
0.31 % SDS	0.31 % SDS
4.0 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)	0.40 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)
60 µl APS (10 %)	30 µl APS (10 %)
2.4 µl TEMED	2.4 µl TEMED
Laufpuffer	Probenpuffer
100 mM Tris/HCl, pH 8.4	100 mM Tris/HCl, pH 8.4
200 mM Tricin	200 mM Tricin
0.1 % SDS (w/v)	1.0 % SDS
	25 % Glycerin
	0.03 g/l Bromphenolblau
Färbelösung	Entfärbelösung
0.5 % Coomassie Brilliant Blue (w/v)	5.0 % Methanol (v/v)
45 % Methanol (v/v)	7.5 % Eisessig (v/v)
18.5 % Eisessig (v/v)	

3.2 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

3.2.1 Theoretische Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und die einfache Durchführung der Messungen aus und bietet eine große Zahl an Molekülinformationen. Unter Fluoreszenz versteht man die Emission elektromagnetischer Strahlung von Atomen oder Molekülen, die durch Absorption eines Photons in einen elektronisch angeregten Zustand angehoben wurden

(Lakowicz, 1999). Bis zur Aussendung der Strahlung in einem angeregten Molekül können bis zu 10^{-8} s vergehen. Innerhalb dieser Zeitspanne kann das Molekül seine Lage im Raum ändern oder auch mit der Umgebung wechselwirken. Aus diesem Grund wird die emittierte Strahlung nicht nur von der Molekülumgebung, sondern auch durch die dynamischen Eigenschaften des Moleküls beeinflusst.

Neben der Lichtemission treten weitere Desaktivierungsprozesse auf, die bei einer quantitativen Beschreibung der Fluoreszenz berücksichtigt werden müssen. Die verschiedenen Mechanismen können im JABLONSKI-Diagramm zusammengefasst werden (Abb. 3–3).

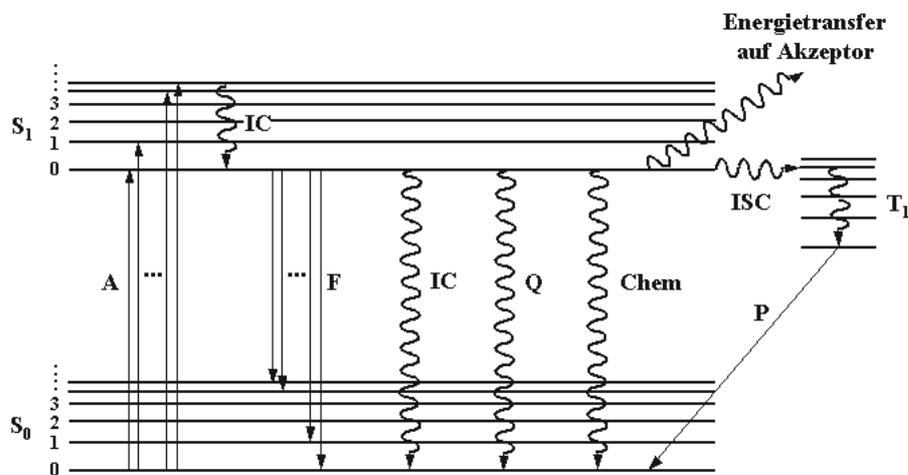


Abb. 3–3: JABLONSKI-Diagramm.

Durch Lichtabsorption (A) gelangen die Moleküle, nach dem zu der jeweiligen Absorption gehörigen FRANCK-CONDON-Faktor, vom Schwingungsgrundzustand S_0 ($v = 0$) in verschiedene Schwingungszustände v' des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 . Nachdem die angeregten Moleküle mittels innerer Umwandlung (*internal conversion*, IC), d.h. über die Abgabe der überschüssigen Energie in Form von Stößen mit umgebenden Lösungsmittelmolekülen, in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 ($v' = 0$) relaxiert sind, sind mehrere Desaktivierungsprozesse möglich. Neben erneuter innerer Umwandlung kann es zu einer Relaxation in den elektronischen Grundzustand unter Abgabe von Wärme (Q) oder über die Ausnutzung des Anregungslichts für chemische Reaktionen (Chem) kommen. Darüber hinaus ist eine Desaktivierung durch einen Singulett-Singulett-Energietransfer, auch FÖRSTER-Transfer genannt (Kap. 3.2.6), möglich, bei dem die Energie auf einen Akzeptor

übertragen wird. Bei der Desaktivierung unter Lichtemission, der sog. Lumineszenz, muss man zwei Arten unterscheiden. Bei der sogenannten Phosphoreszenz (P) kommt es im ersten Schritt zu einem *intersystem crossing* (ISC), wobei das angeregte Molekül unter Spinumkehr strahlungslos in höhere Schwingungszustände des elektronischen Triplettzustands T_1 übergeht. In einfachster Näherung ist dieser Übergang quantenmechanisch verboten, erfolgt aber bei geringen energetischen Abständen zwischen dem S_1 und T_1 Zustand in merklichem Ausmaß. Nach erneuter IC in den Schwingungsgrundzustand des T_1 Zustands kommt es wiederum unter Spinumkehr und Lichtemission zu einer Relaxation in den Schwingungsgrundzustand des S_0 Niveaus. Bei der zweiten Art der Desaktivierung mittels Lichtemission, der Fluoreszenz, gehen die angeregten Moleküle direkt vom Schwingungsgrundzustand des S_1 Zustands in den elektronischen Grundzustand S_0 über. Anders als bei der Phosphoreszenz können die Moleküle hierbei, je nach dem der jeweiligen Emission zugehörigen FRANCK-CONDON-Faktor, auch höhere Schwingungsniveaus des S_0 Zustands erreichen, wodurch das Fluoreszenzlicht im Vergleich zum Absorptionsspektrum rotverschoben erscheint (Winter and Noll, 1998).

3.2.2 Allgemeine Messbedingungen der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen

Alle fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen, wurden an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer der Firma Varian (Darmstadt) durchgeführt. Die Emissions- und die Anregungsbandweite wurde auf 5 nm festgelegt. Während der Messung wurden die Proben kontinuierlich mittels eines Variomag Electronicrührers (H+P Labortechnik, Oberschleißheim) gerührt. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte bei Raumtemperatur, sofern nicht explizit auf andere Messbedingungen hingewiesen wird.

3.2.3 Untersuchung der Insertion von Peptiden in Lipiddoppelschichten mittels Tryptophan-Fluoreszenz

3.2.3.1 Tryptophan-Fluoreszenz

Viele Biomoleküle enthalten bereits fluoreszierende Bestandteile, sog. intrinsische Fluorophore. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide TMH-1, TMH-2,

TMF-1 und TMF-2 weisen jeweils in Position 4 die Aminosäure Tryptophan auf, die aufgrund ihres aromatischen Rests fluoreszierende Eigenschaften besitzt und somit die Untersuchung der Umgebung der Peptide ermöglicht.

Um im Speziellen die Insertion von Peptiden in Lipidvesikel zu untersuchen, macht man sich die Tatsache zunutze, dass die Peptide bei einer Insertion in die Lipiddoppelschicht von einer wässrigen, polaren Umgebung in den hydrophoben, unpolaren Bereich der Membran übergehen. Das Tryptophan besitzt im wässrigen Medium gegenüber einer apolaren Umgebung in der Lipiddoppelschicht eine blauverschobene Fluoreszenz (hypsochromer Effekt) (Bong et al., 2000; Galla, 1988; Wimley and White, 2000). Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Stabilisierung des angeregten Zustands S_1 in den beiden verschiedenen Medien (Abb. 3–4).

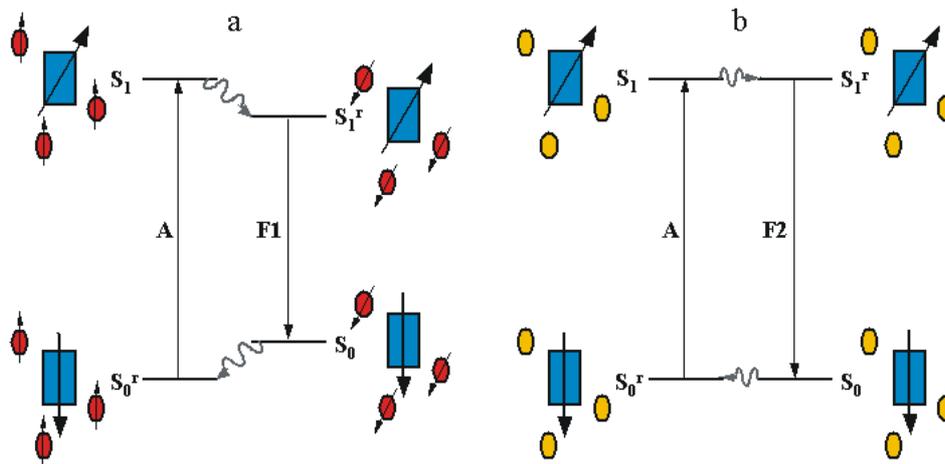


Abb. 3–4: Energieniveauschema zur Erklärung des hypsochromen Effekts der Tryptophan-Fluoreszenz durch Insertion der Peptide in Lipidvesikel. **a** Fluoreszenz in polaren Medien. **b** Fluoreszenz in unpolaren Medien.

In einer polaren Umgebung orientieren sich die Lösungsmitteldipole antiparallel zu dem Dipolmoment des Chromophors. Durch die Absorption von Licht ändert sich das elektrische Dipolmoment des Chromophors in Stärke und Orientierung. Da sich die polaren Lösungsmittelmoleküle erst durch Umlagerung auf das neue Gleichgewicht einstellen müssen, liegt der angeregte FRANCK-CONDON-Zustand S_1 energetisch höher als der Gleichgewichtszustand des angeregten Tryptophans S_1^r . Nach der Emission des Lichts befindet sich das Molekül zunächst in einem Grundzustand S_0 , der energetisch etwas oberhalb des Gleichgewichtsgrundzustands S_0^r liegt, da der Chromophor nun erneut das ursprüngliche Dipolmoment aufweist,

aber die polaren Lösungsmittelmoleküle dazu nicht mehr energetisch günstig ausgerichtet sind. Anschließend relaxiert das System in den Gleichgewichtsgrundzustand S_0^f (Abb. 3–4 a).

Insertieren die Peptide in eine Lipiddoppelschicht, so befindet sich das Tryptophan in einer apolaren Umgebung. Aufgrund der hydrophoben Membran, die lediglich einen geringen Wassergehalt aufweist, findet nur eine geringfügige Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle statt. Somit ist die Energie der Zustände S_1^f und S_1 nahezu gleich groß und der Chromophor gelangt über Lichtemission direkt in den Gleichgewichtsgrundzustand S_0^f Abb. 3–4 b. Aufgrund der Polaritätsänderung während der Insertion der Peptide in Lipidvesikel kommt es somit zu einer Blauverschiebung der Fluoreszenz ($F_2 > F_1$) (Galla, 1988; Winter and Noll, 1998).

Ein weiterer Effekt der Polaritätsänderung, der eine Beobachtung der Insertion mittels Fluoreszenz ermöglicht, ist der Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ des Tryptophans beim Übergang von einem polaren in ein apolares Medium. Ursache für die geringere Fluoreszenzquantenausbeute in polarer Umgebung sind strahlungslose Desaktivierungen, als Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz (Wallach and Zahler, 1966; Yonei et al., 1979).

3.2.3.2 Messbedingungen

Zur Untersuchung der Insertion der Peptide in Lipiddoppelschichten wurden die Spektren, die mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen wurden, in einem Wellenlängenbereich von 290 bis 450 nm aufgezeichnet. Die Fluoreszenzspektren wurden um die Streuung der Vesikel korrigiert, indem ein Spektrum der reinen Vesikelsuspensionen ohne Peptid aufgenommen und später von den eigentlichen Messungen abgezogen wurde. Des Weiteren wurde für die Auswertung die Verdünnung der Peptidkonzentration durch die Titration berücksichtigt.

Die Peptidinsertion in POPC-Lipidvesikel wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen durchgeführt. Für den ersten Ansatz wurden 170 μl einer wässrigen TMH-1-Lösung mit einer Konzentration von 6 μM schrittweise (bis 100 μl in 10 μl -Schritten, bis 300 μl in 20 μl -Schritten) mit einer Suspension von unilamellaren 100 nm POPC-Vesikeln der Konzentration 4.0 mM titriert (Lipid-zu-Peptidverhältnis $c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 0\text{-}1200\text{:}1$). Die Vesikel wurden nach der unter Kap. 3.1.1 beschriebenen Extrusionsmethode hergestellt. Für die wässrige Peptidlösung wurde eine

Stammlösung der Konzentration 0.2 mM in H₂O/DMSO im Verhältnis 8:2 mit Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) verdünnt. Um die Einstellung des Gleichgewichts zu gewährleisten, wurden die Proben zwischen den einzelnen Lipidzugaben jeweils 20 Minuten inkubiert bis die Tryptophan-Fluoreszenzintensität einen konstanten Wert angenommen hatte.

Für den zweiten Ansatz wurden gemischte Lipid-Peptidfilme aus POPC und dem jeweiligen Peptid, wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben, hergestellt. Dabei wurde die Peptidkonzentration konstant bei 6 µM für die nicht fluorinierten Peptide bzw. bei 7 µM für TMF-1 und TMF-2 gehalten. Das Lipid-zu-Peptidverhältnis wurde durch Variation der Lipidkonzentration im Bereich 0-1200:1 sukzessive erhöht. Für die Messungen wurden jeweils 200 µl der Vesikelsuspension vorgelegt.

Um die These zu stützen, dass die Peptide nur in fluide Membranen insertieren können (Kap. 1.3.2), wurden Messungen mit DPPC und TMH-1 bei Raumtemperatur durchgeführt, so dass die Lipiddoppelschicht in der Gelphase vorlag. Hierfür wurden 800 µl einer wässrigen Peptidlösung der Konzentration 3 µM vorgelegt und in 100 µl-Schritten mit 100 nm Vesikeln der Konzentration 0.9 mM titriert (Lipid-zu-Peptidverhältnis $c_{\text{DPPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 0-290:1$). Für die wässrige Peptidlösung wurde eine Stammlösung der Konzentration 22 µM in H₂O/DMSO im Verhältnis 8:2 mit Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7) verdünnt.

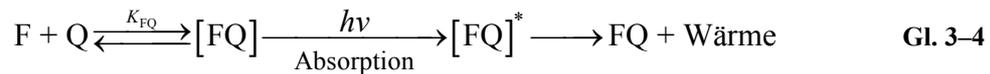
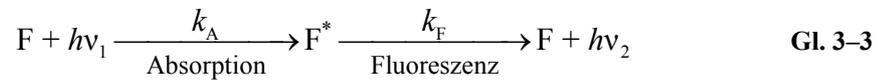
3.2.4 Löschexperimente mit DOXYL-Sonden

3.2.4.1 Prinzip des Fluoreszenzquenchings

Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ eines Fluorophors kann durch in der Lösung diffundierende Löschermoleküle, sogenannte Quencher (z.B. O₂, I⁻, NO, BrO₄⁻, Olefine, Schweratome, halogenierte Kohlenwasserstoffe), stark herabgesetzt werden. Dabei wird der Absorptionsprozess des Moleküls nicht beeinflusst, sondern die Molekülfluoreszenz dadurch gelöscht, dass Quencher-moleküle durch Spin-Bahn-Wechselwirkung einen (S₁→T₁)-Übergang (ISC) induzieren. Um die Energie des angeregten Zustands strahlungslos auf das Quencher-molekül übertragen zu können, müssen der Fluorophor F und der Quencher Q in Kontakt miteinander kommen. Je nachdem, ob die beiden Moleküle bei diesem Vorgang im Grundzustand einen Komplex [FQ] bilden oder nach dem Stoß zwischen einem angeregten Fluorophor

F^* und einem Quencher Q wieder voneinander weg diffundieren, unterscheidet man zwischen der statischen und der dynamischen Fluoreszenzlöschung.

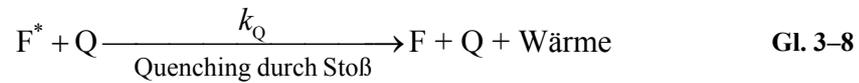
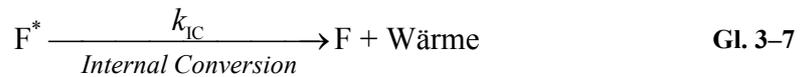
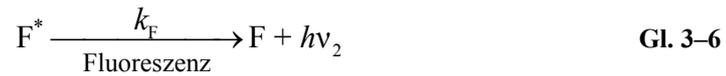
Für die statische Fluoreszenzlöschung durch Komplexbildung müssen folgende Konkurrenzprozesse berücksichtigt werden (Gl. 3–3 und Gl. 3–4):



Die zweite Reaktion ist verantwortlich für das Quenching der Fluoreszenz. Fluorophor F und Quencher Q bilden im Grundzustand einen Komplex [FQ], der nicht in der Lage ist zu fluoreszieren. Der angeregte Fluorophor-Quencher-Komplex $[FQ]^*$ geht strahlungslos und unter Abgabe von Wärme in den Grundzustand über. Durch die Ausbildung des Komplexes wird die Gesamtzahl, der für die Fluoreszenz zur Verfügung stehenden Fluorophore F, verringert und somit die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ mit steigender Quencherkonzentration c_Q herabgesetzt. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_F des Fluorophors wird hingegen nicht beeinflusst. Zur quantitativen Betrachtung wird angenommen, dass sich die Konzentration in An- und in Abwesenheit von Quencher c_F bzw. c_F^0 an Fluorophor proportional zur jeweiligen Fluoreszenzintensität in An- und in Abwesenheit von Quencher I bzw. I^0 und somit auch zur Fluoreszenzquantenausbeute ϕ bzw. ϕ^0 verhält. Mit Hilfe der Assoziationskonstanten K_{FQ} erhält man den in Gl. 3–5 dargestellten linearen Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Intensitäten und der Quencherkonzentration c_Q , der als STERN-VOLLMER-Gleichung bezeichnet wird.

$$\frac{I^0}{I} = 1 + K_{FQ} \cdot c_Q \quad \text{Gl. 3-5}$$

Für einen dynamischen Löschprozess, bei dem die Desaktivierung durch einen Stoß mit einem Quencher-molekül erfolgt (Kollisionslöschen), müssen die folgenden konkurrierenden Desaktivierungsprozesse berücksichtigt werden (Gl. 3–6, Gl. 3–7 und Gl. 3–8):



Für eine quantitative Beschreibung dieses Quenchingprozesses geht man ähnlich vor wie bei der statistischen Fluoreszenzlöschung. Es ergibt sich ein analoger Ausdruck für die STERN-VOLLMER-Gleichung, der den linearen Zusammenhang zwischen den Fluoreszenzintensitäten in An- und in Abwesenheit von Quencher und der Quencherkonzentration c_Q beschreibt (Gl. 3-9) und sich nur darin unterscheidet, dass für den dynamischen Quenchingprozess die Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit von Quencher τ_F^0 berücksichtigt werden muss.

$$\frac{I^0}{I} = 1 + K_Q \cdot \tau_F^0 \cdot c_Q \quad \text{Gl. 3-9}$$

Hierbei steht K_Q für die Gleichgewichtskonstante des Quenchingprozesses durch einen Stoß (Galla, 1988; Winter and Noll, 1998).

3.2.4.2 Quenchingexperimente mit DOXYL-stearinsäuren

Zur Lokalisierung von Peptiden in einer Lipiddoppelschicht kann die sogenannte *parallax*-Methode verwendet werden. Diese Technik ermöglicht die Berechnung des Abstands zwischen einem Fluorophor, in diesem Fall einem Tryptophan-Rest, und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht (Chung et al., 1992). Dabei wird die statistische Fluoreszenzlöschung des Fluorophors durch Quencher beobachtet, die kovalent an definierten Positionen der Alkylketten von Stearinsäuren gebunden wurden. In diesem Fall wurden Quenchingexperimente mit 5- und 16-DOXYL-stearinsäure durchgeführt, wobei es sich um DOXYL-Sonden handelt, die in Position fünf bzw. sechzehn ein Nitrosylradikal aufweisen (Abb. 3-5).

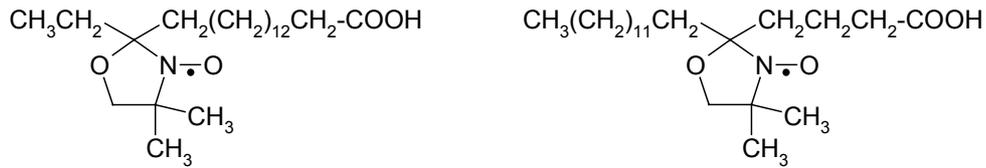


Abb. 3-5: Strukturformeln der beiden Quencher 5-DOXYL-stearinsäure (rechts) und 16-DOXYL-stearinsäure (links).

Insertiert das Peptid in Membranen, die variierende Mengen an DOXYL-Sonden enthalten, so wird die Tryptophan-Fluoreszenz der Peptide je nach Position der fluoreszierenden Aminosäure und Quencherkonzentration durch die Nitrosylradikale in Position fünf bzw. sechzehn in unterschiedlichem Ausmaß gelöscht (Kiss et al., 1999; Narayanaswami et al., 2000). Der entsprechende mathematische Zusammenhang ergibt sich aus einer zweidimensionalen Form der Perrin-Gleichung (Gl. 3-10) (Birks, 1970).

$$\ln \frac{I}{I^0} = - \frac{\pi \cdot (R_0^2 - X^2 - Z^2)}{70} \cdot \chi_{\text{DOXYL}} \tag{Gl. 3-10}$$

Hierbei steht χ_{DOXYL} für den Molenbruch des Quenchers und R_0 für den kritischen Quencherradius. Die Variable X beschreibt den lateralen Abstand zwischen Quencher und Fluorophor und Z den entsprechenden vertikalen Abstand (Abb. 3-6).

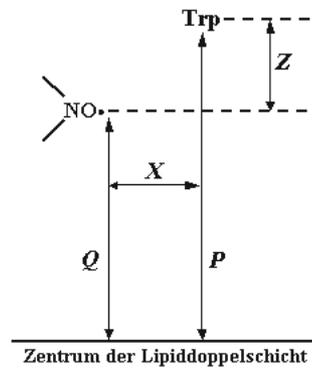


Abb. 3-6: Übersicht über die geometrischen Parameter für die Berechnung des Abstands zwischen dem Tryptophan-Rest und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht P .

Für die Auswertung nach der *parallax*-Methode wird angenommen, dass sowohl R_0 , als auch X , für ein bestimmtes Fluorophor-Quencher-Paar konstant bleiben. Trägt man den natürlichen Logarithmus des Verhältnisses der Intensität in An- und in Abwesenheit von Quencher I und I^0 in Abhängigkeit vom Molenbruch des Quenchers χ_{DOXYL} auf, so erhält man über die Steigungen der Geraden für die

beiden, an unterschiedlichen Stellen der Membran lokalisierten, Nitrosylradikalquencher verschiedene Werte für den Term $(R_0^2 - X^2 - Z_{5\text{-DS}}^2 \text{ bzw. } 16\text{-DS})$. Durch Subtraktion der beiden Terme für 5- und 16-DOXYL-stearinsäure und mit Hilfe der bekannten Abstände der Quenchemoleküle vom Zentrum der Lipiddoppelschicht $Q_{5\text{-DS}}$ und $Q_{16\text{-DS}}$ (Chattopadhyay and London, 1987) kann die Distanz P zwischen dem Fluorophor und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht mit der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$P = \frac{[Z_{5\text{-DS}}^2 - Z_{16\text{-DS}}^2 + Q_{16\text{-DS}}^2 - Q_{5\text{-DS}}^2]}{[2 \cdot (Q_{16\text{-DS}} - Q_{5\text{-DS}})]} \quad \text{Gl. 3-11}$$

3.2.4.3 Messbedingungen

Zur Lokalisierung des Tryptophanrests der Peptide innerhalb der Lipiddoppelschicht wurde die Tryptophan-Fluoreszenz in einem Wellenlängenbereich von 290 bis 450 nm untersucht. Die Fluoreszenzspektren wurden mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen und anschließend um die Streuung der Vesikel korrigiert, in dem ein Spektrum der reinen Vesikelsuspensionen ohne Peptid und ohne Quencher aufgenommen und später von den eigentlichen Messungen abgezogen wurde.

Genau wie die Peptidinsertion wurde auch die Probenpräparation für die Quenchingexperimente auf zwei unterschiedlichen Wegen durchgeführt. Für den ersten Ansatz wurden POPC-Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm und variierenden Mengen an 5- bzw. 16-DOXYL-stearinsäure nach der in Kap. 3.1.1 beschriebenen Methode hergestellt und anschließend mit Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) 1:1 verdünnt. Dabei betrug die resultierende POPC-Konzentration 0.7 mM und das Lipid-zu-Quencherverhältnis $c_{\text{POPC}}/c_{5/16\text{-DS}}$ wurde zwischen 0 und 50 variiert. Es wurden jeweils 400 μl der Lipid-Quencher-Suspension vorgelegt und mit 20 μl einer TMH-1-Lösung der Konzentration 46 μM in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ im Verhältnis 8:2 bzw. einer TMH-2-Lösung der Konzentration 50 μM in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ im Verhältnis 8:2 versetzt und gemischt (Lipid-zu-Peptidverhältnis $c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 290:1$ bzw. $c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-2}} = 260:1$). Um die Insertion der Peptide in die Vesikel zu gewährleisten, wurden die Proben nach der Peptidzugabe jeweils 20 Minuten inkubiert bis die Tryptophan-Fluoreszenzintensität einen konstanten Wert angenommen hatte.

Für den zweiten Ansatz wurden gemischte Lipid-Quencher-Peptidfilme aus POPC, der entsprechenden DOXYL-stearinsäure und dem jeweiligen Peptid (TMF-1 bzw. TMF-2), wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben, hergestellt. Dabei wurde die Peptidkonzentration in beiden Fällen konstant bei 5 μM gehalten. Die Lipidkonzentration betrug 3.0 mM und das Lipid-zu-Quencherverhältnis $c_{\text{POPC}}/c_{5/16\text{-DS}}$ wurde durch Variation der Quencherkonzentration im Bereich 0-25 sukzessive erhöht. Für die Messungen wurden jeweils 400 μl der Vesikelsuspension vorgelegt.

3.2.5 Reversibilität der Peptidinsertion

3.2.5.1 Beschreibung des Versuchs und Probenvorbereitung

Um die Reversibilität der Peptidinsertion zu untersuchen, d.h. inwieweit die Peptide nachdem sie einmal in die Lipiddoppelschicht insertiert sind, in einem Vesikel verbleiben oder aber zwischen unterschiedlichen Vesikeln wechseln, wurde die Methode von Wimley et al. herangezogen (Wimley and White, 2000). Es wurden vier verschiedene Vesikelpopulationen hergestellt: (1) Reine POPC Vesikel, (2) POPC Vesikel, die 8 Mol% an Quencher 5-DOXYL-stearinsäure enthielten, (3) POPC Vesikel mit insertiertem Peptid und (4) POPC Vesikel, die 8 Mol% an Quencher 5-DOXYL-stearinsäure und insertiertes Peptid enthielten. Die Peptide TMH-1 und TMH-2 wurden dabei zum einen vor der Präparation der Vesikel in den Film zugegeben und zum anderen in einer zweiten Messreihe nachträglich in die präparierten Vesikel insertiert, wie in Kap. 3.1.1 beschrieben. Im Fall der nachträglichen Zugabe der Peptide zu der Vesikelsuspension wurden die Suspensionen (3) und (4) nach der Peptidzugabe 1 h inkubiert, um die vollständige Insertion der Peptide zu gewährleisten. Anschließend wurden parallel zwei unterschiedliche Mischungen aus den vier verschiedenen Suspensionen hergestellt. Dabei enthielt eine Mischung die Suspensionen (1) und (4) und die andere die Suspensionen (2) und (3). Um auch hier wiederum eine Gleichgewichtseinstellung zu gewährleisten, wurden die Mischungen für jeweils 30 Minuten inkubiert, bevor die Fluoreszenzspektren aufgezeichnet wurden. Ein vollständiger und reversibler Austausch der Peptide zwischen den Vesikeln zeigt sich, wenn die Intensitäten der Tryptophan-Fluoreszenz der beiden Mischungen (1) + (4) und (2) + (3) etwa im Mittel der beiden Ausgangsintensitäten der Suspensionen (3) und (4) liegen.

3.2.5.2 Messbedingungen

Um die Reversibilität der Peptidinsertion zu untersuchen, wurden Fluoreszenzspektren mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm und in einem Wellenlängenbereich von 290 bis 450 nm aufgezeichnet. Zur Korrektur der Streuung durch die Vesikel wurde ein Spektrum der reinen Vesikelsuspensionen mit bzw. ohne Quencher aufgenommen und später vom eigentlichen Fluoreszenzspektrum abgezogen.

Für die Messreihe mit nachträglicher Insertion der Peptide in die Vesikel wurden POPC-Vesikel mit und ohne Quencher (Suspension (1) und (2)) und einem mittleren Durchmesser von 100 nm nach der in Kap. 3.1.1 beschriebenen Methode hergestellt. Die POPC-Konzentration betrug 1.3 mM und die Quencherkonzentration 0.2 mM. Zur Herstellung der Suspensionen (3) und (4) wurden je 200 µl der Suspensionen (1) und (2) mit 10 µl einer TMH-1-Lösung der Konzentration 91 µM in H₂O/DMSO (8:2) bzw. 10 µl einer TMH-2-Lösung der Konzentration 89 µM in H₂O/DMSO (8:2) versetzt. Nach erfolgter Insertion der Peptide wurden je 200 µl der vier hergestellten Suspensionen wie zuvor beschrieben miteinander gemischt und inkubiert (Lipid-zu-Peptidverhältnis $c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 575:1$ bzw. $c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-2}} = 590:1$). Für die Messungen wurden jeweils 400 µl der Mischungen vorgelegt.

Für die zweite Messreihe wurden Filme hergestellt (Kap. 3.1.1), die entsprechend der jeweiligen Suspension nur POPC, POPC und den Quencher 5-DOXYL-stearinsäure und die jeweiligen Analoga mit den Peptiden TMH-1 und TMH-2 enthielten. Dabei betrug die Peptidkonzentration sowohl für TMH-1 als auch für TMH-2 2 µM. Mittels einer POPC-Konzentration von 1.3 mM wurde ein Lipid-zu-Peptidverhältnis von $c_{\text{POPC}}/c_{\text{Peptid}} = 600:1$ eingestellt. Der Quencher wurde mit einer Konzentration von 0.1 mM (8 Mol%) eingesetzt. Für die Messungen wurden jeweils 190 µl der hergestellten Suspensionen vorgelegt.

3.2.6 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

3.2.6.1 Theoretische Grundlagen des Energie Transfers nach FÖRSTER

In Kap. 3.2.4 wurde beschrieben, dass die Fluoreszenz von Molekülen durch statisches oder dynamisches Quenching gelöscht werden kann. Während bei dieser Variante der Desaktivierung von angeregten Molekülen die Fluorophore und die

Quencher-moleküle in direkten Kontakt miteinander treten müssen, kann der sogenannte Energie Transfer nach FÖRSTER durch eine schwache Kopplung zwischen den elektronischen Orbitalen eines Donor- und eines Akzeptormoleküls über einen Abstandsbereich von bis zu 8 nm erfolgen. Bei diesem Vorgang wird zunächst ein Donormolekül angeregt und gelangt somit in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 . Bei entsprechender räumlicher Nähe zu einem Akzeptormolekül erfolgt die Desaktivierung des Donors nicht durch Abgabe der Energie in Form von Fluoreszenz, sondern durch Übertragung der Anregungsenergie auf einen Akzeptor. Dieser wird in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 angehoben und ist nun seinerseits in der Lage zu fluoreszieren ($S_1 \rightarrow S_0$). Das entsprechende JABLONSKI-Diagramm ist in Abb. 3–7 dargestellt (Winter and Noll, 1998).

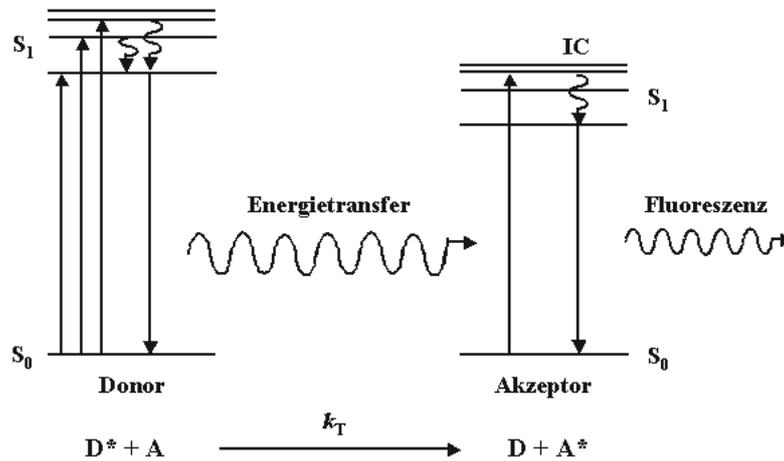


Abb. 3–7: JABLONSKI-Diagramm des Energie Transfers nach FÖRSTER.

Die zugehörigen theoretischen Zusammenhänge wurden bereits 1948 von T. Förster entwickelt (Förster, 1948). Dabei wurde gezeigt, dass ein Energie Transfer zwischen einem Donor- und einem Akzeptormolekül nur unter bestimmten Voraussetzungen erfolgen kann.

Nach Förster versteht man den Mechanismus der Energieübertragung als physikalisches Resonanzphänomen. Hierbei wird das Elektronensystem des Donors als mechanischer Oszillator angesehen, der seine Anregungsenergie analog dem Beispiel zweier gekoppelter Pendel auf einen zweiten Oszillator übertragen kann. Diese Kopplung ist allerdings nur möglich, wenn der elektronische Übergang des Akzeptors der Frequenz des Donors entspricht. Somit ist eine Überlappung zwischen dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und dem Emissionsspektrum des Donors

eine Voraussetzung für einen Energie Transfer zwischen den beiden Molekülen (Galla, 1988).

Einen weiteren Punkt stellt der Abstand zwischen Donor und Akzeptor dar, da die Energie Transfer-Effizienz mit der sechsten Potenz des Molekülabstands der beiden Fluorophore R abnimmt (Gl. 3–13). Der kritische Abstand R_0 wird als sogenannter FÖRSTER-Abstand bezeichnet, auf den im weiteren noch genauer eingegangen wird.

Neben einer ausreichend langen Fluoreszenzlebensdauer des Donors müssen darüber hinaus die Orientierungen der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor, die sich im allgemeinen unterscheiden, berücksichtigt werden. Ein Energie Transfer kann nur dann beobachtet werden, wenn die Übergangsdipolmomente eine geeignete Orientierung zueinander einnehmen. Mit Hilfe der daraus resultierenden Wechselwirkungsenergie zwischen den beiden Dipolen ergibt sich die Transfargeschwindigkeitskonstante k_T , die mit der sechsten Potenz des Abstands R zwischen Donor und Akzeptor abnimmt (Gl. 3–12).

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad \text{Gl. 3–12}$$

τ_D bezeichnet die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit von Akzeptor. Zur Bestimmung des Abstands R zwischen Donor und Akzeptor wird im allgemeinen die Energie Transfer-Effizienz E gemessen, die wie folgt definiert ist:

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad \text{Gl. 3–13}$$

Dabei versteht man unter dem FÖRSTER-Abstand R_0 den Abstand zwischen Donor und Akzeptor bei dem der Energie Transfer noch zu 50 % effizient ist (Winter and Noll, 1998). R_0 ergibt sich aus der Wechselwirkungsenergie zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten als:

$$R_0 = 9.78 \cdot 10^3 \left(\phi_D \kappa^2 n^4 J \right)^{\frac{1}{6}} \text{ \AA} \quad \text{Gl. 3–14}$$

Hierbei steht ϕ_D für die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors, n für den Brechungsindex der Lösung und J für das Überlappintegral, das ein Maß für die Überlappung zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donors und dem

Absorptionsspektrum des Akzeptors darstellt. κ^2 bezeichnet den Orientierungsfaktor, der die Anordnung der Übergangsdipolmomente beschreibt (Reddy et al., 1999).

Die Energie Transfer-Effizienz E kann mit Hilfe der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit I und in Abwesenheit I^0 von Akzeptor gemessen werden (Li et al., 1999).

$$E = 1 - \frac{I}{I^0} \quad \text{Gl. 3-15}$$

3.2.6.2 Untersuchung der Aggregation von Peptiden mittels FRET

Die Aggregation der Peptide TMH-1, TMH-2 und deren fluorinierter Analoga in Lipidvesikeln wurde mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) untersucht. Dabei wurden NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol) gelabelte Peptide als Donor und TAMRA (5(6)-Carboxytetramethylrhodamin) gelabelte Peptide als Akzeptor verwendet (Abb. 3–8). Für die Herstellung wurden die Peptide entweder mit 4-Fluor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol oder mit aktiviertem 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin über den N-Terminus gekoppelt. Die Aktivierung des Akzeptors erfolgte mit *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) in Anwesenheit von Diisopropylethylamin (DIEA) (Bilgicer and Kumar, 2004).

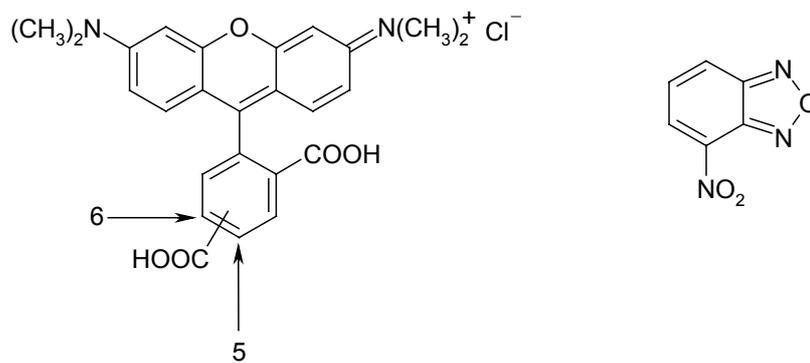


Abb. 3–8: Strukturformeln des Akzeptors TAMRA (links) und des Donors NBD (rechts).

Über die Messung der Änderung der NBD-Fluoreszenz als Funktion der Akzeptorkonzentration bei konstantem Lipid-zu-Peptidverhältnis kann die Ausbildung von Oligomeren und deren Größe für das jeweilige Lipid-zu-Peptidverhältnis ermittelt werden (Adair and Engelman, 1994; Chung et al., 1992; Li et al., 1999; London and Khorana, 1982; Reddy et al., 1999). Für die Auswertung der Messungen wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten des Donors in

Anwesenheit von TAMRA gelabelten Peptiden I und in Abwesenheit I^0 für unterschiedliche Lipid-zu-Peptidverhältnisse in Abhängigkeit vom Molenbruch des Akzeptors aufgezeichnet. Wenn die Peptide in der Lipiddoppelschicht miteinander aggregieren, wird erwartet, dass die Intensität der NBD-Fluoreszenz mit steigendem Molenbruch an TAMRA gelabelten Peptiden abnimmt. Kein Energie Transfer sollte beobachtet werden, wenn die Peptide monomer in der Membran vorliegen.

3.2.6.3 Messbedingungen

Zur Untersuchung der Aggregation der Peptide in Lipiddoppelschichten wurde der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) bei verschiedenen Lipid-zu-Peptidverhältnissen gemessen. Die Fluoreszenzspektren wurden mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm aufgezeichnet und in einem Wellenlängenbereich von 500 bis 700 nm aufgenommen. Die Fluoreszenzspektren wurden um die Streuung der Vesikel korrigiert, in dem ein Spektrum der reinen Vesikelsuspensionen ohne Peptid aufgenommen und später von den eigentlichen Messungen abgezogen wurde.

Für die Untersuchung der Aggregation von TMH-1 in POPC-Lipidvesikeln wurden die Peptide auf zwei unterschiedlichen Wegen in die Lipiddoppelschicht inseriert. Für den ersten Ansatz, der für alle vier Peptide verwendet wurde, wurden gemischte Lipid-Peptidfilme aus POPC und dem jeweiligen Peptid hergestellt, wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben. Die Konzentration an NBD gelabelten Peptiden wurde konstant auf 2.75 μM eingestellt und der Molenbruch an TAMRA gelabelten Peptiden χ_A zwischen 0 und 0.5 variiert. Die Gesamtpeptidkonzentration wurde hierbei unter Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant bei 5.5 μM gehalten, wodurch das Verhältnis der Molenbrüche χ_A/χ_D zwischen 0 und 1 verändert wurde. Durch Variation der Lipidkonzentration konnte der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer bei verschiedenen Lipid-zu-Peptidverhältnissen untersucht werden. Die Messreihen wurden bei Lipid-zu-Peptidverhältnissen von $c_{\text{POPC}}/c_{\text{Peptid}}$ 900:1 (4.95 mM POPC), 600:1 (3.30 mM POPC) und 300:1 (1.65 mM POPC) durchgeführt. Die Proben wurden in Wasser hergestellt und mit Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) verdünnt. Für die Messungen wurden jeweils 200 μl der Vesikelsuspension vorgelegt.

Für den zweiten Ansatz wurden zunächst POPC-Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm hergestellt (Kap. 3.1.1). Anschließend wurde TMH-1 in entsprechenden Mengen zugegeben und die Proben 1 h lang inkubiert, um die vollständige Insertion der Peptide zu gewährleisten. Für die Energie Transfer-Messungen wurde eine äquimolare Mischung von ungelabeltem und Donor gelabeltem TMH-1 (je 2.75 μM) in POPC-Vesikeln mit TAMRA gelabeltem TMH-1 titriert. Zu diesem Zweck wurden Aliquots (je 17 μl von 170 μl Gesamtvolumen) aus der Probe entnommen und durch das gleiche Volumen einer Lösung von TAMRA und NBD gelabelten Peptiden (je 2.75 μM) in POPC-Vesikeln ersetzt. Auf diesem Weg wurde die Konzentration an ungelabeltem Peptid in der Probe kontinuierlich verringert und durch Akzeptor gelabelte Peptide ersetzt, während die Konzentration an Donor gelabeltem Peptid ebenso wie die Gesamtpeptidkonzentration konstant gehalten wurde. Der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer wurde durch Variation der Lipidkonzentration bei verschiedenen Lipid-zu-Peptidverhältnissen untersucht. Die Messreihen wurden bei Lipid-zu-Peptidverhältnissen von $c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}}$ 900:1 (4.95 mM POPC), 600:1 (3.30 mM POPC) und 300:1 (1.65 mM POPC) durchgeführt. Die Proben wurden in Wasser hergestellt und mit Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) verdünnt.

3.2.7 Temperatur als Trigger für FRET

3.2.7.1 Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur einer Lipidmischung mittels Patman

Für die im folgenden beschriebenen Messungen wurden Lipidmischungen von DPPC und POPC im Verhältnis 6:4 verwendet. Um die Temperatur des Phasenübergangs T_m von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase (L_α) der Mischung zu bestimmen, wurde der Fluorophor Patman (Abb. 3–9) verwendet.

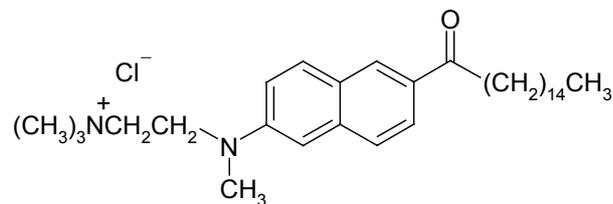


Abb. 3–9: Strukturformel des Fluorophors Patman.

Patman (6-Hexadecanoyl-2-(((2-(trimethylammonium)ethyl)methyl)amino)naphthalinchlorid) und der strukturell verwandte Fluorophor Prodan (6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalin) reagieren sehr sensitiv auf die Polarität der Umgebung. Werden die Fluorophore in Lipidmembranen eingelagert, so sind sie im Bereich der polaren Kopfgruppen der Phospholipide lokalisiert und weisen eine relativ große Stoke'sche Verschiebung auf, wenn die Phasenumwandlungstemperatur T_m durchlaufen wird (Hutterer et al., 1996; Massey et al., 1985; Weber and Farris, 1979). Die beobachtete Rotverschiebung der Fluoreszenz ist eine Folge der Änderung der Viskosität der Lipidmembran und kann verglichen werden mit dem Übergang des Fluorophors von einem unpolaren in ein polares Medium (siehe Abb. 3–4). Bei Temperaturen unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur verhindert die hohe Viskosität der Membran die Relaxation der Lösungsmittelmoleküle innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer. Oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur nimmt die Viskosität ab, die Lösungsmittelmoleküle sind frei beweglich und es kommt zu einer Verschiebung der Fluoreszenz zu größeren Wellenlängen (Lippert, 1957; Weber and Farris, 1979).

3.2.7.2 Untersuchung der temperaturabhängigen Ausbildung von Lipiddomänen mittels FRET

Mischungen zwei verschiedener Lipide bilden bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur der beiden Komponenten eine vollständig gemischte flüssig-kristalline Phase (L_α) aus, während es bei tieferen Temperaturen zur Phasenseparation in eine L_α und eine Gelphase kommen kann. Der Nachweis einer solchen Phasenseparation kann über Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer-Messungen erfolgen. Zu diesem Zweck werden zwei farbstoffgelabelte Lipide in die Vesikel integriert, die unterschiedliche Löslichkeiten in der Gelphase und der flüssig-kristallinen Phase einer Lipiddoppelschicht aufweisen. Für die durchgeführten Messungen wurden die kopfgruppengelabelten Lipide NBD-DPPE (N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) als Donor (Abb. 3–10) und N-Rh-DPPE (N-(Lissamin rhodamin B sulfonyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) als Akzeptor (Abb. 3–11) verwendet.

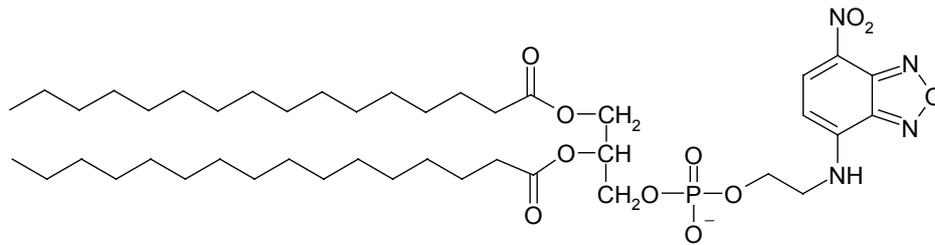


Abb. 3–10: Strukturformel des kopfgruppengelabelten Lipids NBD-DPPE.

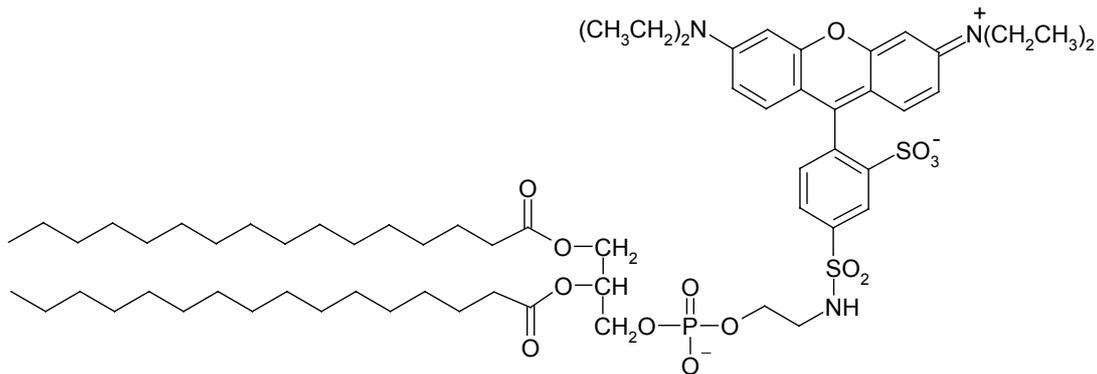


Abb. 3–11: Strukturformel des kopfgruppengelabelten Lipids N-Rh-DPPE.

Da der Donor NBD-DPPE eine geringere Affinität zur Gelphase aufweist, als der Akzeptor N-Rh-DPPE kann im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur T_m eine Abnahme des Energie Transfers beobachtet werden, die auf eine räumliche Trennung von Donor und Akzeptor hinweist (Leidy et al., 2001). In Temperaturbereichen, in denen die Lipidmischung eine vollständig gemischte flüssig-kristalline Phase ausbildet, sind die beiden gelabelten Proben über die gesamte Lipiddoppelschicht verteilt und können miteinander in Wechselwirkung treten, d.h. es kann ein Energie Transfer zwischen dem Donor- und dem Akzeptormolekül beobachtet werden.

3.2.7.3 Messbedingungen

Messungen mit Patman.

Zur Untersuchung der Phasenumwandlungstemperatur T_m einer DPPC/POPC-Mischung im Verhältnis 6:4 wurde das Fluoreszenzmaximum λ_{\max} des Fluorophors Patman über einen Temperaturbereich von 10 bis 50 °C mit einer Scanrate von 30 °C/h aufgezeichnet. Die Fluoreszenzspektren wurden in einem Bereich von 400 bis 600 nm und mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm aufgenommen.

Die 100 nm Vesikel bestehend aus DPPC und POPC in einem Verhältnis von 6:4 und dem Fluorophor Patman wurden, wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben, hergestellt. Dabei wurde der Lipidmischung vor dem Entfernen des Lösungsmittels der

Fluorophor in ethanolischer Lösung in einem Lipid-zu-Patman-Verhältnis von 100:1 zugesetzt. Für die Messungen wurden jeweils 400 μ l der Vesikelsuspension mit einer Gesamtkonzentration an DPPC und POPC von 1.3 mM vorgelegt.

FRET-Messungen mit NBD-DPPE und N-Rh-DPPE in DPPC/POPC-Mischungen.

Zur Untersuchung der Ausbildung von DPPC-haltigen Domänen in einer DPPC/POPC-Mischung im Verhältnis 6:4 wurde die Intensität der Akzeptorfluoreszenz über einen Temperaturbereich von 20 bis 50 °C bzw. 50 bis 20 °C mit einer Scanrate von 30 °C/h aufgezeichnet. Die Probe wurde bei 463 nm angeregt und die Emission bei 595 nm in Abhängigkeit von der Zeit über 1 h aufgenommen.

Um Aufschluss über die Temperaturabhängigkeit des Fluorophors zu bekommen, wurde darüber hinaus eine Probe vermessen, die nur Akzeptor gelabelte Lipide in einer DPPC/POPC-Mischung (6:4) enthielt. Hierbei wurde das N-Rh-DPPE bei 560 nm angeregt und die Intensität der Akzeptorfluoreszenz bei 595 nm im Temperaturbereich von 20 bis 50 °C aufgezeichnet.

Die Vesikel bestehend aus DPPC und POPC in einem Verhältnis von 6:4, dem Donor NBD-DPPE und dem Akzeptor N-Rh-DPPE wurden hergestellt wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben. Dabei wurden der PC-Mischung vor dem Entfernen des Lösungsmittels je 0.25 Mol% an Donor und Akzeptor in ethanolischer Lösung zugesetzt. Die Probe, die zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des einzelnen Fluorophors diente, wurde mit 0.25 Mol% an N-Rh-DPPE in einer DPPC/POPC-Mischung (6:4) hergestellt. Für die Messungen wurden jeweils 200 μ l der Vesikelsuspension mit einer Gesamtlipidkonzentration von 5.0 mM vorgelegt.

FRET-Messungen mit NBD-TMH-1 und TAMRA-TMH-1 in DPPC/POPC-Mischungen.

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit von FRET-Messungen mit NBD-TMH-1 und TAMRA-TMH-1 wurde die Intensität der Donorfluoreszenz bei $\lambda = 530$ nm über einen Temperaturbereich von 20 bis 50 °C mit einer Scanrate von 30 °C/h untersucht. Die Fluoreszenzspektren wurden in einem Bereich von 500 bis 700 nm und mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm aufgenommen.

Die Vesikel bestehend aus DPPC und POPC in einem Verhältnis von 6:4, dem Donor NBD-TMH-1, dem Akzeptor TAMRA-TMH-1 und dem ungelabelten Peptid

TMH-1 wurden hergestellt wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben. Dabei wurde eine Gesamtlipidkonzentration von 3.30 mM und Peptidkonzentrationen von 2.75 μM für NBD-TMH-1, 2.48 μM für TAMRA-TMH-1 und 0.27 μM für TMH-1 verwendet, um ein Lipid-zu-Peptidverhältnis von 600:1 einzustellen. Zur Kontrolle der Temperaturabhängigkeit des Donors wurden zusätzlich DPPC/POPC-Vesikel hergestellt, in denen der Akzeptor durch ungelabeltes Peptid ersetzt wurde. Die Proben wurden in Wasser hergestellt und mit Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5) verdünnt. Für die Messungen wurden jeweils 200 μl der Vesikelsuspension vorgelegt.

3.3 CD-Spektroskopie

3.3.1 Theoretische Grundlagen der CD-Spektroskopie

Circulardichroismus.

Bei der Circulardichroismus- oder kurz CD-Spektroskopie, die zu den chiroptischen Messmethoden gehört, handelt es sich um eine Variante der Absorptionsspektroskopie im UV- bzw. VIS-Bereich. Voraussetzung für die CD-spektroskopische Untersuchung einer Substanz ist das Vorliegen von optischer Aktivität in der Probe, die zu einer unterschiedlichen Wechselwirkung mit den beiden zirkular polarisierten Komponenten von linear polarisiertem Licht führt. Dabei werden das links bzw. rechts zirkular polarisierte Licht, aus dem eine linear polarisierte Welle aufgebaut ist, unterschiedlich stark von der Probe absorbiert.

Linear polarisiertes Licht weist einen elektrischen Feldvektor \vec{E} auf, der nur in einer Ebene senkrecht zu Ausbreitungsrichtung schwingt. Der elektrische Feldvektor \vec{E} kann in die beiden Komponenten \vec{E}_R und \vec{E}_L unterteilt werden, die rechts bzw. links zirkular um die Ausbreitungsrichtung rotieren. Beide Vektoren weisen die gleichen Drehfrequenzen und Beträge auf und ergeben über Vektoraddition den Feldvektor \vec{E} des linear polarisierten Lichts.

Aus der unterschiedlichen Absorption der beiden Komponenten des linear polarisierten Lichts durch optisch aktive Substanzen resultieren auch unterschiedliche Extinktionskoeffizienten ε_L bzw. ε_R für das links bzw. rechts zirkular polarisierte Licht. Der Unterschied $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ zwischen den beiden

Extinktionskoeffizienten stellt die eigentliche Messgröße in der CD-Spektroskopie dar. In der Praxis wird allerdings im allgemeinen aus historischen Gründen die sogenannte Elliptizität θ_λ gemessen, die wie folgt definiert ist:

$$\tan \theta_\lambda = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L} \quad \text{Gl. 3-16}$$

Der Index λ steht für die Wellenlängenabhängigkeit der Elliptizität. $I_{L,R}$ ist die Intensität des links bzw. rechts zirkular polarisierten Lichts nach erfolgter Absorption. Über das Lambert-Beersche Gesetz (Gl. 3-2) erhält man für kleine θ_λ näherungsweise:

$$\theta_\lambda = \ln 10 \cdot \frac{180^\circ}{4\pi} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 3-17}$$

Dabei steht c für die Konzentration der Probe in mol/l und d für die Schichtdicke der Küvette in cm. Durch Normierung der Elliptizität auf die Konzentration und die Schichtdicke der Küvette erhält man die spezifische Elliptizität $[\theta]_\lambda$, die in der Einheit Grad·cm²/dmol angegeben wird.

In einem CD-Spektrum wird die spezifische Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ aufgetragen. Je nachdem, ob die Elliptizität positive oder negative Werte einnimmt spricht man vom sogenannten positiven oder negativen COTTON-Effekt (Galla, 1988; Jasco, 1994; Winter and Noll, 1998).

Linear und zirkular polarisiertes Licht.

Im Rahmen der experimentellen Bestimmung der Elliptizität muss zunächst linear polarisiertes Licht erzeugt werden. Dies wird im allgemeinen mittels eines Polarisationsfilters erreicht, der aus einem Material besteht, das für nur eine Orientierung des Lichts durchlässig ist. Hierfür werden häufig Kunststofffolien verwendet, deren Polymermoleküle parallel zueinander angeordnet und in Form von submikroskopischen dichroitischen Kristallen organisiert sind. Dabei sind die Moleküle in der Lage Licht, dessen Polarisationssebene parallel zur Molekülachse orientiert ist, besser zu absorbieren, als Licht, dessen Polarisationssebene senkrecht zur Molekülachse ausgerichtet ist. Mittels eines $\lambda/4$ -Plättchens aus doppelbrechendem Material (z.B. Kaliumdihydrogenphosphat, Quarz, Glimmer), das parallel zur optischen Achse geschnitten ist, kann das linear polarisierte Licht in

zirkular polarisiertes Licht umgeformt werden. Tritt ein Lichtstrahl senkrecht zur optischen Achse in das Plättchen ein, so kommt es zwar zu keiner Doppelbrechung, aber der ordentliche und der außerordentliche Strahl stehen senkrecht aufeinander. Aufgrund der höheren Lichtgeschwindigkeit läuft der außerordentliche Strahl dem Ordentlichen voraus. Der Gangunterschied zwischen den beiden Komponenten kann mittels der Dicke des Plättchens auf $\lambda/4$ eingestellt werden. Wird nun linear polarisiertes Licht eingestrahlt, dessen E-Feld-Vektor um 45° bzw. -45° geneigt ist zwischen der schnellen und der langsamen Achse, so wird die Welle in zwei linear polarisierte Komponenten E_1 und E_2 aufgespalten, deren Phasen um den Betrag $\lambda/4$ gegeneinander verschoben sind und deren \vec{E} -Feldvektoren senkrecht aufeinander stehen. Die Kombination beider Komponenten führt je nachdem welcher Winkel für die Polarisationssebene des einfallenden Strahls eingestellt wird zu rechts (45°) bzw. links (-45°) polarisiertem Licht (Abb. 3–12).

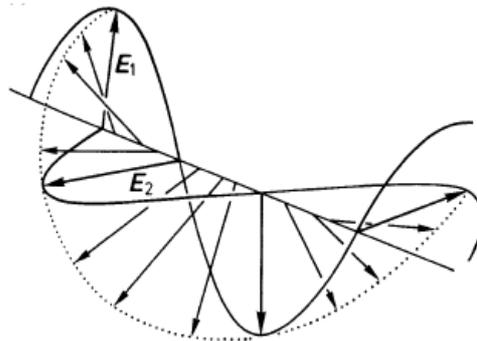


Abb. 3–12: Links zirkular polarisiertes Licht als Ergebnis der Kombination von zwei linear polarisierten Komponenten mit einem Phasenunterschied von $\lambda/4$ und senkrecht aufeinander stehenden \vec{E} -Feldvektoren (Winter and Noll, 1998).

Alternativ werden in modernen Geräten sogenannte Pockels- oder Kerr-Zellen verwendet, die sich den Effekt zunutze machen, dass Kristalle wie Ammonium- oder Kaliumdihydrogenphosphat ihre doppelbrechenden Eigenschaften unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes ändern. Durch Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes an den jeweiligen Kristall können so links und rechts zirkular polarisiertes Licht mit einer Wechselfrequenz im Bereich von einigen kHz erhalten werden. Die von der Probe durchgelassene Intensität wird von einem Photomultiplier aufgenommen und mittels eines Computers in die entsprechenden Elliptizitäten umgerechnet (Abb. 3–13) (Galla, 1988; Winter and Noll, 1998).

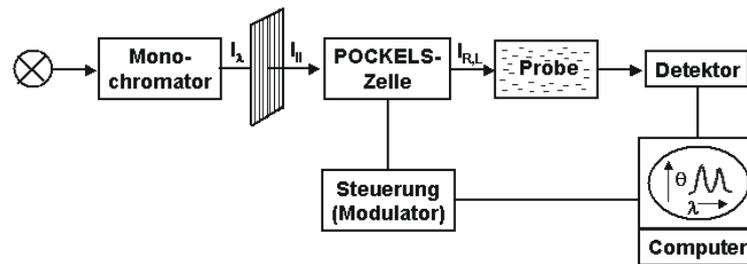


Abb. 3–13: Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers.

Optische Aktivität.

Zur Erklärung des Phänomens der optischen Aktivität wird häufig ein Vergleich zwischen der optisch inaktiven Komponente Coronen und den beiden optisch aktiven Enantiomeren des Hexahelicens herangezogen (Abb. 3–14).

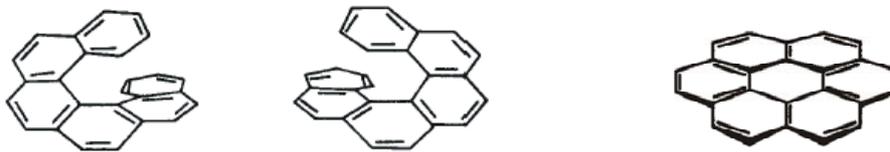


Abb. 3–14: Strukturformeln der beiden Enantiomere des Hexahelicens (links) und des achiralen Coronens (rechts) (Winter and Noll, 1998).

Durch die helikale Struktur der beiden Enantiomere des Hexahelicens wird bei Absorption von elektromagnetischer Strahlung und der damit verbundenen Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Feldvektor der Moleküle und der π -Elektronenhülle ein oszillierender elektrischer Dipol μ_{el} entlang der Helix induziert. Es resultieren ein helikaler Stromfluss und ein elektrisches Dipolmoment in Richtung der Helixachse. Darüber hinaus wird durch den Stromfluss senkrecht dazu ein magnetisches Dipolmoment μ_{magn} induziert, dass ebenfalls eine Komponente parallel zur Helixachse aufweist (Abb. 3–15).

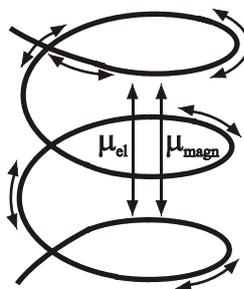


Abb. 3–15: Darstellung der helikalen Ladungsverschiebung im Hexahelicen und der beiden kollinearen Übergangsdipolmomente.

Quantenmechanische Rechnungen zeigen, dass ein Molekül nur dann optische Aktivität aufweist, wenn das elektrische und das magnetische Dipolmoment parallel zueinander orientiert sind. Im Fall von zwei senkrecht aufeinander stehenden Komponenten, wie im Beispiel des Coronens, ist das Molekül optisch inaktiv. Definitionsgemäß kann also festgehalten werden, dass ein Molekül immer dann optische Aktivität aufweist, wenn es bei einem elektronischen Übergang zu einer helikalen Ladungsverschiebung kommt. Ein weiteres Beispiel für Chiralität in Molekülen sind sogenannte asymmetrische C-Atome mit vier unterschiedlichen Substituenten. Hierbei erzeugen die vier Reste ein asymmetrisches statisches Feld, wodurch die Ladungsverschiebung durch Absorption einen helikalen Anteil aufweist (Galla, 1988; Winter and Noll, 1998).

3.3.2 Untersuchung der Sekundärstrukturen von Proteinen

Die CD-Spektroskopie kann für die Untersuchung von zahlreichen Biomolekülen verwendet werden. Voraussetzung hierfür ist, wie im Kapitel zuvor erläutert, das Vorliegen von optischer Aktivität in der Probe. Hierbei muss unterschieden werden zwischen Chromophoren, die von sich aus chiral sind und Chromophoren, die sich in einer asymmetrischen Mikroumgebung befinden und aus diesem Grund eine induzierte optische Aktivität aufweisen. Zu den Molekülen, die bereits strukturbedingt optische Aktivität zeigen, gehören im Bereich der Biomoleküle u.a. alle in der Natur vorkommenden Aminosäuren außer Glycin, da diese ein chirales α -C-Atom tragen. Eine induzierte optische Aktivität wird z.B. häufig durch Sekundärstrukturen in Proteinen hervorgerufen. So zeigen die Carbonylgruppen in den Peptidbindungen einer α -Helix nicht nur optische Aktivität aufgrund ihrer Bindung an die chiralen α -C-Atome, sondern zusätzlich eine induzierte optische Aktivität durch die Kopplung der Anregung mit benachbarten Peptidbindungen. Die Kopplung von Chromophoren führt dazu, dass die optische Aktivität von Molekülen als Monitor für die Sekundärstruktur von Biomolekülen verwendet werden kann. Aus diesem Grund stellt die CD-Spektroskopie eine empfindliche Methode zur Strukturanalyse von Proteinen und Peptiden dar. Aufgrund der beschriebenen Kopplung von Chromophoren und der zusätzlichen Beeinflussung der optischen Aktivität durch Seitenkettenchromophore oder prosthetische Gruppen in den Proteinen oder Peptiden können den verschiedenen Sekundärstrukturen α -Helix, β -

Faltblatt und Zufallsknäuel CD-Spektren mit charakteristischen Maxima und Minima zugeordnet werden (Abb. 3–16) (Galla, 1988; Greenfield et al., 1967; Greenfield and Fasman, 1969; Winter and Noll, 1998).

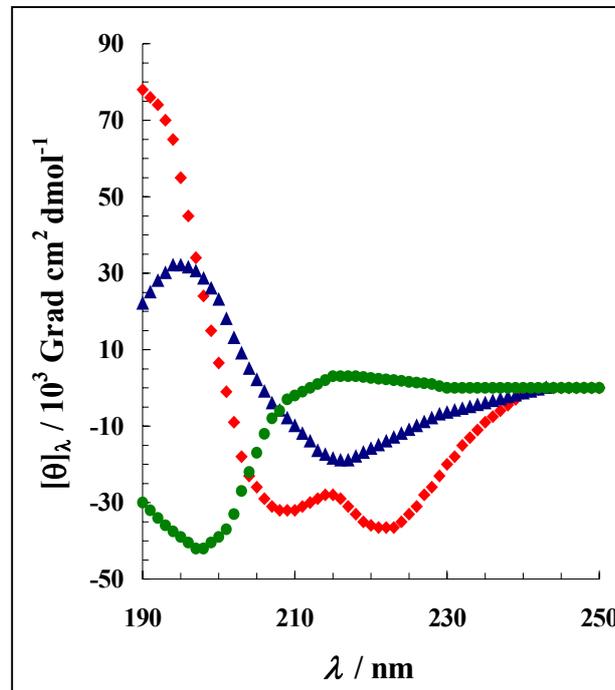


Abb. 3–16: CD-Spektren von Poly-L-Lysin in drei unterschiedlichen Konformationen: \blacklozenge 100 % α -Helix, \blacktriangle β -Faltblatt, \bullet Zufallsknäuel (Greenfield et al., 1967; Greenfield and Fasman, 1969).

Wie in Abb. 3–16 sichtbar wird, weisen Proteine und Peptide mit einer vorwiegend α -helikalen Sekundärstruktur zwei charakteristische Minima bei 208 nm und 222 nm auf. Mit Hilfe der Elliptizität bei 222 nm, normiert auf die Anzahl an Aminosäuren im Molekül, ist es möglich die α -Helizität eines Proteins abzuschätzen. Unter der Annahme, dass eine 100 %ige α -Helix eine Elliptizität von $-33000 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$ bei 222 nm aufweist, ergibt sich die Helizität eines unbekanntes Moleküls, das keine β -Faltblatt-Anteile enthält, als:

$$\alpha\text{-helikaler Gehalt} = \frac{\theta_{222}^{\text{gem}}}{-36000 \cdot N_{\text{AS}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3-18}$$

Dabei steht $\theta_{222}^{\text{gem}}$ für die Elliptizität des zu untersuchenden Proteins oder Peptids in $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$ und N_{AS} für die Anzahl der Aminosäuren im Molekül (Lumb et al., 1994; O'Shea et al., 1989; www.udel.edu/~dzubeckcdspec.html). Neben dieser Abschätzung ist es heute möglich mit Hilfe zahlreicher Auswerteprogramme

genauere Aussagen über die prozentualen Anteile an α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel in der Sekundärstruktur eines Moleküls zu machen. Viele dieser Algorithmen, wie beispielsweise der in dieser Arbeit verwendete K2d-Algorithmus, vergleichen die Daten des zu untersuchenden CD-Spektrums mit gespeicherten CD-Datensätzen von Molekülen, deren genaue Sekundärstruktur bekannt ist (Andrade et al., 1993; Merelo et al., 1994).

3.3.3 Messbedingungen

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur der Peptide TMH-1 und TMH-2 in unterschiedlichen Medien wurden die CD-Spektren im Bereich von 190 bis 250 nm mittels des CD-Spektrometers J-714 (Jasco, Gross-Umstadt) aufgezeichnet. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur und mit einer Schichtdicke von 0.1 cm durchgeführt. Die weiteren Einstellungen am Gerät sind in Tab. 3–2 zusammengefasst.

Tab. 3–2: Einstellungen am CD-Spektrometer.

Daten-Modus	Mol. Elliptizität
Ch2-Modus	HT
Auflösung	1 nm
Bandweite	1.0 nm
Sensitivität	50 mdeg
Resonanz	2 s
Geschwindigkeit	50 nm/min
Akkumulation	10

Für die Messungen wurden Lösungen von TMH-1 und TMH-2 in H₂O, 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) und POPC-Vesikeln in wässriger Lösung hergestellt.

Da die hydrophoben Peptide in wässriger Lösung dazu neigen Aggregate auszubilden (Kap. 4.2.4), mussten die zu untersuchenden Proben zunächst 1:1 mit 6 M Guanidinium-Hydrochlorid verdünnt werden, um die Peptide monomer in Lösung zu bringen und so eine Verfälschung der Gesamtkonzentration zu vermeiden (Lumb and Kim, 1995a). Die Konzentrationen der Peptidlösungen in H₂O wurden UV-spektroskopisch ermittelt (Kap. 3.1.3). Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Peptide konnten sowohl für das TMH-1 als auch für das TMH-2 maximale Konzentrationen von 30 μ M erreicht werden.

TFE induziert die Bildung helikaler Sekundärstrukturen und stabilisiert Peptidhelices (Sönnichsen, 1992). Die Proben in TFE wurden verwendet, um die maximal mögliche α -Helizität der Peptide zu bestimmen. Für die Messungen wurden Lösungen mit einer Konzentration von 73 μM im Falle des TMH-1 und 66 μM im Falle des TMH-2 verwendet.

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur der Peptide in POPC-Vesikeln wurden gemischte Lipid-Peptidfilme mit einem Lipid-zu-Peptidverhältnis $c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1/2}}$ von 100:1 hergestellt (Kap. 3.1.1). Die resultierende Peptidkonzentration in den 100 nm Vesikeln betrug sowohl für das TMH-1 als auch für das TMH-2 25 μM .

3.4 ATR-FT-IR-Spektroskopie

3.4.1 Theoretische Grundlagen der FT-IR-Spektroskopie

Die Infrarot- oder kurz IR-Spektroskopie zählt zu den ältesten und am weitesten verbreiteten spektroskopischen Untersuchungsmethoden für Festkörper. Man unterscheidet im infraroten Spektralbereich drei Teilbereiche. Im fernen Infrarot (3 bis 400 cm^{-1}) können Gitterschwingungen detektiert werden. Das mittlere Infrarot (400 bis 4000 cm^{-1}) wird in erster Linie durch Grundschwingungen charakterisiert, die auf intramolekulare Bewegungen zurückzuführen sind und daher häufig für analytische Zwecke genutzt werden. Im nahen Infrarot (4000 bis 12500 cm^{-1}) werden hauptsächlich Oberschwingungen beobachtet. Generell kann festgehalten werden, dass nur solche Moleküle Infrarot-Aktivität zeigen, die ein permanentes elektrisches Dipolmoment μ_{el} aufweisen bzw. Moleküle, deren Dipolmoment sich während der Schwingung ändert (Gl. 3–19).

$$\partial\bar{\mu}_{\text{el}}/\partial r \neq 0 \quad \text{Gl. 3–19}$$

In der Praxis wird im allgemeinen die Transmission T oder die Extinktion E in Abhängigkeit von der Wellenzahl $\bar{\nu}$ gemessen, die wie folgt definiert sind (Gl. 3–2, Gl. 3–20, Gl. 3–21 und Gl. 3–22) (Winter and Noll, 1998):

$$T = I/I^0 \cdot 100 \quad \text{Gl. 3–20}$$

$$E = \lg(100/T) \quad \text{Gl. 3–21}$$

$$\bar{\nu} = 1/\lambda \quad \text{Gl. 3–22}$$

Ein entscheidender Fortschritt in der modernen IR-Spektroskopie ist durch die Entwicklung der FOURIER-Transform-IR- oder kurz FT-IR-Spektroskopie gelungen. Zur Erläuterung dieser Methode betrachten wir zunächst zwei sich überlagernde Wellen mit verschiedener Frequenz (Abb.3–17 a). Die Addition der beiden Wellen ergibt eine Schwebung, das sogenannte Interferogramm. Dabei entspricht die Frequenz der einhüllenden Welle der Differenz der Frequenzen der beiden einzelnen Wellen (Abb.3–17 b) (Galla, 1988).

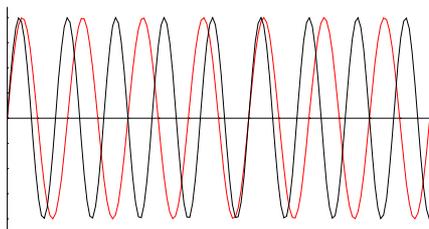


Abb.3–17a: Darstellung von zwei überlagerten Sinuswellen mit unterschiedlicher Frequenz.

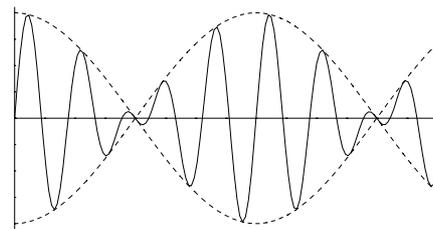


Abb.3-17b: Darstellung des aus der Addition der Einzelwellen entstandenen Interferogramms und der daraus resultierenden einhüllenden Welle.

Durch die zeitabhängige Aufnahme der Amplitudenänderung ist es möglich die Schwebungsfrequenz und somit auch die Differenz zwischen den Frequenzen der beiden sich überlagernden Wellen zu berechnen. Dies geschieht über eine sogenannte FOURIER-Transformation, mit deren Hilfe eine komplexe Wellenform in die einzelnen Sinusfunktionen zerlegt und die Frequenzen der einzelnen Wellen bestimmt werden können. Diese Tatsache kann ebenso auf kompliziertere Systeme übertragen werden, bei denen viele Wellen auf einmal überlagert werden, die jeweils durch ihre Amplitude und die Frequenz in Abhängigkeit von der Zeit definiert sind. Die beschriebene Interferenzmethode bildet die Grundlage der FT-IR-Spektroskopie. Dabei wird die zu untersuchende Probe mit einem kontinuierlichen Spektrum, das den gesamten Frequenzbereich der Lichtquelle abdeckt, bestrahlt. Praktisch wird diese Methode mit Hilfe des in Abb. 3–18 dargestellten Michelson-Interferometer umgesetzt (Galla, 1988).

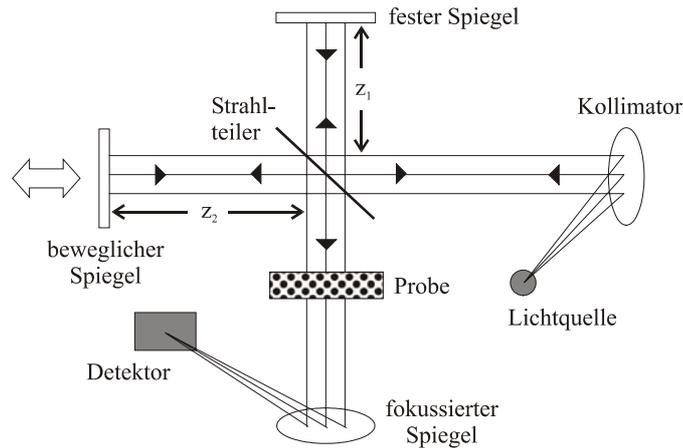


Abb. 3–18: Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers.

Die Lichtquelle emittiert einen divergierenden Strahl, der am Kollimator zunächst in ein paralleles Strahlenbündel umgewandelt wird und am Strahlteiler in zwei Teilstrahlen mit, im Idealfall, gleicher Intensität zerlegt wird. Während der eine Teilstrahl den Strahlteiler passiert und nach Zurücklegen der Wegstrecke $z_2 = z_1 + l$ auf einen beweglichen Spiegel trifft, wird der andere Teilstrahl reflektiert und trifft auf einen festen Spiegel im Abstand z_1 . Anschließend werden beide Teilstrahlen an den jeweiligen Spiegeln reflektiert und interferieren im Strahlteiler. Von dort aus gelangt ein resultierender Teilstrahl über die zu untersuchende Probe zum Detektor und der andere fällt zurück auf die Lichtquelle. Betrachtet man eine Welle mit der Wellenlänge λ , dann haben die beiden Teilstrahlen die am festen bzw. am beweglichen Spiegel reflektiert wurden die Wegstrecken $2z_1$ und $2(z_1 + l)$ zurückgelegt, wenn sie den Strahlteiler erreichen. Die Differenz dieser beiden Wegstrecken $2l$ wird als optische Wegdifferenz δ bezeichnet, die je nach Stellung des beweglichen Spiegels variiert werden kann. Die Größe der optischen Wegdifferenz gibt vor, ob die beiden Teilstrahlen konstruktiv ($\delta = 0$) oder destruktiv ($\delta = \lambda/2$) miteinander im Strahlteiler interferieren. Bei einer konstruktiven Interferenz gelangt die gesamte von der Lichtquelle emittierte Strahlung über die Probe zum Detektor, im Falle einer destruktiven Interferenz sind die Teilstrahlen exakt außer Phase und die Intensität wird ausgelöscht.

Durch die Verwendung einer Lichtquelle mit kontinuierlichem Spektrum $I(\bar{\nu})$ erhält man aus der Überlagerung der Interferogramme jeder einzelnen Frequenz in

Abhängigkeit von der Zeit des Spiegelvorschubs das vollständige Interferogramm. Mittels einer Cosinus-FOURIER-Transformtion des gemessenen Interferogramms $I(\delta)$ kann daraus das tatsächlich gemessene Frequenzspektrum $B(\bar{\nu})$ bestimmt werden (Gl. 3–23).

$$B(\bar{\nu}) = 2 \int_{-\infty}^{\infty} I(\delta) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\bar{\nu} \quad \text{Gl. 3–23}$$

Befindet sich nun eine absorbierende Probe im Strahlengang, so fehlen charakteristische Frequenzen, die in Form von Peaks im umgewandelten Absorptionsspektrum sichtbar werden. D.h. in der FT-IR-Spektroskopie wird statt eines optischen Monochromators eine mathematische Filterung der polychromatischen Interferogramm-Funktion vorgenommen. Der Vorteil der FT-IR-Spektroskopie liegt also u.a. in der Tatsache, dass nicht mehr kontinuierlich der gesamte Wellenlängenbereich vermessen werden muss, sondern das gesamte Spektrum simultan aufgenommen werden kann, wodurch die Dauer der Messungen erheblich verkürzt wird. Darüber hinaus kommt es zu einer deutlichen Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, da anders als in dispersiven Spektrometern, für die FT-IR-Spektroskopie keine Blenden oder Spalte verwendet werden, die den Energiedurchsatz einschränken.

Problematisch gestalten sich Messungen an stark absorbierenden Proben, da die Intensität der durchgelassenen Strahlung häufig zu gering ist, um detektiert werden zu können. Zu diesem Zweck eignet sich die *Attenuated Total Reflection*- oder kurz ATR-FT-IR-Spektroskopie, die 1961 von Fahrenfort entwickelt wurde (Fahrenfort, 1961; Galla, 1988; Winter and Noll, 1998).

3.4.2 Untersuchung der räumlichen Orientierung von Peptiden in Multischichten mittels ATR-FT-IR-Spektroskopie

Ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Lipiddoppelschichten ist die räumliche Orientierung der Monomere oder Oligomere innerhalb der Membran. Hierfür eignet sich die Methode der ATR-FT-IR-Spektroskopie (Frey and Tamm, 1991; Fringeli and Günthard, 1981; Goormatigh and Ruyschaert, 1990; Tamm and Tatulian, 1997). Dabei wird das Probenmaterial als dünne Schicht auf einen IR-durchlässigen Kristall aus

Germanium, Silizium oder Zinkselenid aufgebracht. Aufgrund der großen Brechzahl des Probenträgers (n_2) gegenüber der aufgetragenen Probe (n_1), kommt es bei Überschreiten eines kritischen Einfallswinkels zu einer Totalreflexion und der IR-Strahl durchläuft den Kristall mit 20-30 Reflexionen.

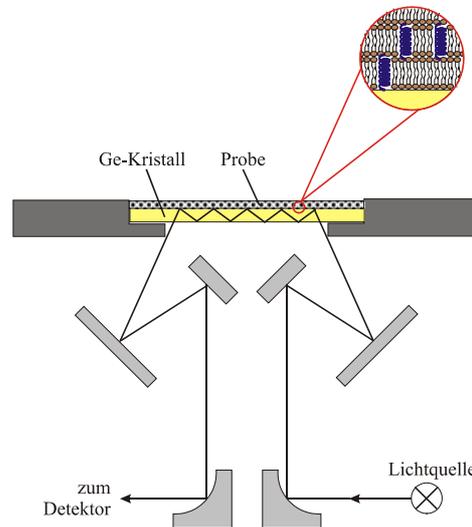


Abb. 3–19: Schematischer Aufbau einer horizontalen ATR-Einheit mit einer Probe aus Multischichten mit inserierten Peptiden.

Das reflektierte Licht geht mit der gleichen Frequenz wie das einfallende Licht in das optisch schwächere Medium, das an die Grenzfläche anschließt, über. Die Eindringtiefe d_p hängt von den beiden Brechungsindices n_1 und n_2 der beiden Medien, der Wellenlänge λ und dem Einfallswinkel ϕ des eingestrahnten Lichts ab (Gl. 3–24) (Tamm and Tatulian, 1997).

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi\sqrt{\left[\sin^2\phi - \left(n_2/n_1\right)^2\right]}} \quad \text{Gl. 3–24}$$

Proben, wie z.B. Membranen mit inserierten Peptiden, absorbieren die elektromagnetische Strahlung und reduzieren somit die Intensität des reflektierten Lichts. Der resultierende Strahl trifft auf einen Detektor und liefert das Transmissionsspektrum der Probe (Abb. 3–19) (Winter and Noll, 1998).

Ein nicht-lineares Molekül mit N Atomen weist $3N-6$ Normalschwingungen auf. Aus diesem Grund sind die IR-Spektren von Biomolekülen sehr komplex (Fraser and MacRae, 1973). Bei der Untersuchung der Orientierung von Peptiden in Multischichten macht man sich die Tatsache zunutze, dass es drei Absorptionsbanden von besonderer Bedeutung gibt. Dabei handelt es sich um die

Amid A-Bande bei ca. 3300 cm^{-1} (NH-Streckschwingung), die Amid II-Bande zwischen 1510 und 1580 cm^{-1} (NH-Beugeschwingung) und die Amid I-Bande zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} (CO-Streckschwingung). Diese Schwingungen gehören zum Grundgerüst der Polypeptidkette und sind daher sehr intensiv und nicht unabhängig voneinander. Da sowohl die CO- als auch die NH-Gruppen an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in α -helikalen bzw. β -Faltblatt-Strukturen beteiligt sind, stellt das Peptidrückgrat eine Reihe von gekoppelten Oszillatoren dar. Dementsprechend hängen Frequenzlage und Bandenform von der Sekundärstruktur des Polypeptids ab (Axelsen et al., 1995; Fraser and MacRae, 1973; Galla, 1988; Winter and Noll, 1998). Die räumliche Orientierung eines solchen Biomoleküls kann mit Hilfe von polarisierten IR-Spektren ermittelt werden, bei denen eine Messung mit parallel und eine Messung mit senkrecht polarisiertem Licht durchgeführt wird. Je nachdem wie die Polypeptide in der Membran angeordnet sind, wird die Strahlung des parallel bzw. senkrecht polarisierten Lichts stärker oder schwächer absorbiert (Abb. 3–20).

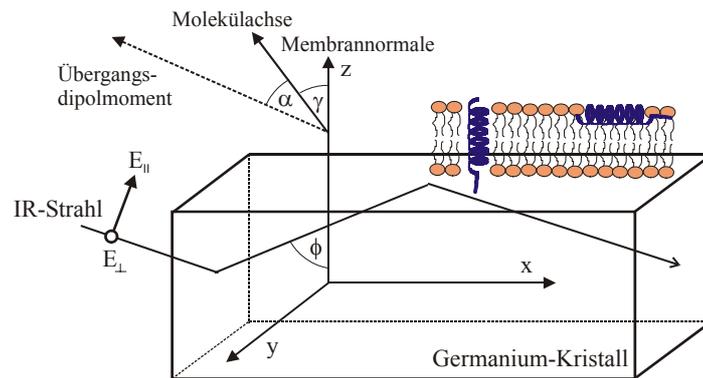


Abb. 3–20: Koordinaten- und Winkelkonventionen. Die x-y-Ebene ist parallel zur Oberfläche des Germanium-Kristalls ausgerichtet und die x-z-Ebene parallel zur Einfallsebene des IR-Strahls. ϕ stellt den Einfallswinkel des eingestrahlt Lichts dar, γ den Winkel zwischen der Molekülachse und der Membrannormalen (z-Achse). α beschreibt den Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment und der Molekülachse.

Die genaue räumliche Orientierung der Moleküle kann über das dichroitische Verhältnis R^{ATR} berechnet werden,

$$R^{\text{ATR}} = \frac{A_{\parallel}}{A_{\perp}} = \frac{\int A_{\parallel}(\nu) d\nu}{\int A_{\perp}(\nu) d\nu} = \frac{E_x^2 k_x + E_z^2 k_z}{E_y^2 k_y} \quad \text{Gl. 3–25}$$

wobei $E_{x,y,z}$ für die Amplitude des elektrischen Feldes der evaneszenten Welle und $k_{x,y,z}$ für die Komponenten der integrierten Absorptionskoeffizienten stehen (Tamm and Tatulian, 1997). Unter der Annahme, dass die Eindringtiefe d_p bei Multilayern sehr viel kleiner ist, als die Schichtdicke der Probe, ergeben sich die Komponenten $E_{x,y,z}$ wie folgt (Fringeli and Günthard, 1981):

$$E_x = \frac{2 \cos \phi \sqrt{(\sin^2 \phi - n_{21}^2)}}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{[(1 + n_{21}^2) \sin^2 \phi - n_{21}^2]}} \quad \text{Gl. 3-26}$$

$$E_y = \frac{2 \cos \phi}{\sqrt{(1 - n_{21}^2)}} \quad \text{Gl. 3-27}$$

$$E_z = \frac{2 \sin \phi \cos \phi}{\sqrt{(1 - n_{21}^2)} \sqrt{[(1 + n_{21}^2) \sin^2 \phi - n_{21}^2]}} \quad \text{Gl. 3-28}$$

Dabei steht ϕ , wie schon zuvor, für den Einfallswinkel des eingestrahlteten Lichts und n_{21} für den Quotienten aus den Brechungsindices für den Germanium-Kristall ($n_1 = 4.0$) und die Membran ($n_2 = 1.43$). Da in der Praxis Fluktuationen in der Orientierung von Peptiden in der Membran auftreten, tragen eine Vielzahl von Orientierungen zum dichroitischen Verhältnis bei. Aus diesem Grund gibt man in der Membranspektroskopie normalerweise den sogenannten Ordnungsparameter S_0 an, der als eine Funktion der Verteilung der Orientierungen der Moleküle in der Probe verstanden wird (Gl. 3-29).

$$S_0 = \frac{1}{f_h} \frac{2(E_x^2 - R^{\text{ATR}} E_y^2 + E_z^2)}{(3 \cos^2 \alpha - 1)(E_x^2 - R^{\text{ATR}} E_y^2 + 2E_z^2)} \quad \text{Gl. 3-29}$$

Dabei steht α für den Winkel zwischen der Molekülachse und dem Übergangsdipolmoment der Schwingung (Abb. 3-20) und f_h für den α -helikalen Gehalt des untersuchten Peptids (Han et al., 1999). Mit Hilfe von Gl. 3-30 ist es dann möglich über den erhaltenen Ordnungsparameter S_0 den Winkel γ zwischen der Oberflächennormalen und der Molekülachse zu berechnen (Abb. 3-20), der eine Aussage über die Orientierung des Peptids in der Membran zulässt (Tamm and Tatulian, 1997).

$$S_{\theta} = \left(\frac{3 \cos^2 \gamma - 1}{2} \right) \quad \text{Gl. 3-30}$$

3.4.3 Messbedingungen

Für die Proben wurden POPC-Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm hergestellt. Hierbei wurden die Peptide TMH-1 und TMH-2 zum einen vor der Vesikelpräparation und zum anderen in die bereits präparierten Vesikel insertiert (Kap. 3.1.1). Das Lipid-zu-Peptidverhältnis betrug für alle Messungen $c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1/2}}$ 1:100 mit Peptidkonzentrationen von 37 μM für das TMH-1 und 44 μM für das TMH-2. Um Multi-Lipiddoppelschichten mit orientierten Peptiden herzustellen wurden dreimal je 100 μl der wässrigen Lipid-Peptidsuspension auf den ATR-Kristall der ATR-Einheit MVP ($\phi = 45^\circ$, Harrick, USA) aufgetragen und 10 h getrocknet.

Die Spektren wurden unter Stickstoffatmosphäre mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} im Bereich von 4000 bis 800 cm^{-1} auf einem IFS88-FT-IR-Spektrometer der Firma Bruker (Ettlingen) aufgenommen. Das Spektrometer war mit einem stickstoffgekühlten MCT-Detektor (D316/8) der Firma InfraRed Associates Inc. (Florida, USA) und einem Polarisator (P03) der Firma InfraSpecs (Filderstadt) ausgestattet. Die Spektren wurden über 1000 Scans gemittelt und jeweils mit parallel und senkrecht polarisiertem Licht bezogen auf die Germanium-Oberfläche aufgezeichnet. Als Apodisationsfunktion wurde ein Blackman-Harris 3-Term mit einem *zerofiling*-Faktor von 2 verwendet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese der Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden nach dem Vorbild der 33 Aminosäuren umfassenden *coiled coil*-Domäne des GCN4-Zippers von Kumar et al. synthetisiert und zur Verfügung gestellt (Bilgicer and Kumar, 2004). Dabei wurden die hydrophilen durch hydrophobe Aminosäuren ersetzt, um die Lipidlöslichkeit der Moleküle zu gewährleisten.

Synthese der Peptide TMH-1 und TMH-2.

Die Synthese der Peptide TMH-1 und TMH-2 (Abb. 4–1) erfolgte manuell über *t*-BOC-Chemie an einem 4-Methylbenzhydrylamin-Harz (MBHA). Die Formylschutzgruppe am Tryptophan wurde entfernt indem das Harz für 4 h bei 0 °C mit einer Mischung von Piperidin und *N,N*-Dimethylformamid (1:10) behandelt wurde. Die Abspaltung vom Harz erfolgte bei 0 °C für 1.5 h mittels einer Mischung von Flusssäure (HF) und Anisol (9:1). Die Rohprodukte wurden entsalzt und anschließend mittels HPLC auf einer C18-Säule aufgereinigt, wobei ein linearer Gradient von Wasser/Isopropanol/Acetonitril bei 50 °C gefahren wurde. Die Charakterisierung erfolgte über eine massenspektroskopische Analyse. In Abb. 4–1 sind die Sequenzen der beiden Peptide dargestellt.



Abb. 4–1: Peptidsequenzen der Peptide TMH-1 (oben) und TMH-2 (unten). Das Buchstabensymbol B steht für die Aminosäure β -Alanin.

Synthese der Peptide TMF-1 und TMF-2.

Für die Untersuchungen zur Phasenseparation hochfluorinierter Substanzen und der Stabilisierung von Aggregaten, deren Peptide fluorhaltige Aminosäuren enthalten, wurden die beiden Analoga TMF-1 und TMF-2 (Abb. 4–2) unter denselben

Bedingungen synthetisiert, wie bereits für die nicht fluorinierten Peptide beschrieben. Zur Darstellung dieser Komponenten wurden lediglich die grün gekennzeichneten Leucin-Reste durch 5, 5, 5, 5', 5', 5'-Hexafluoroleucin (Abb. 1–5) ersetzt. Die Kupplungszeiten wurden im Fall der modifizierten Aminosäure auf ein Minimum von 2 h erhöht.



Abb. 4–2: Peptidsequenzen der Peptide TMF-1 (oben) und TMF-2 (unten). Bei den grün gekennzeichneten Leucin-Resten handelt es sich um die fluorinierte Aminosäure 5, 5, 5, 5', 5', 5'-Hexafluoroleucin.

Synthese der TAMRA- und NBD-gelabelten Peptide.

Für die Herstellung der NBD-gelabelten Komponenten wurde ein Teil der am Harz gebundenen Peptide in Gegenwart von *N, N*-Diisopropylethylamin (DIEA) mit 4-Fluor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) gekuppelt. Die Strukturformel des Fluorophors ist in Abb. 3–8 dargestellt.

Durch die Reaktion von aktiviertem 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA, Abb. 3–8) mit harzgebundenem Peptid wurden die TAMRA-gelabelten Komponenten erhalten. Die Aktivierung des Fluorophors erfolgte mittels *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) in Anwesenheit von DIEA.

4.2 Charakterisierung der Lipid-Peptid-Wechselwirkung

4.2.1 Visualisierung der Oligomerisierung der Peptide mittels SDS-Gelelektrophorese

Bevor das Verhalten der Peptide in Anwesenheit von Lipidvesikeln untersucht wurde, sollte zunächst das Aggregationsverhalten der Moleküle in Detergenzmicellen analysiert werden. Nach Kumar et al. sind die in dieser Arbeit verwendeten Peptide in der Lage in SDS-Micellen zu insertieren und Oligomere auszubilden (Bilgicer and Kumar, 2004). Diese Tatsache sollte mit Hilfe einer SDS-

Gelelektrophorese untersucht werden. In Abb. 4–3 ist das SDS-Gel dargestellt, das für die Peptide TMH-1, TMH-2, TMF-1 und TMF-2 erhalten wurde, wenn diese in einer 1 %igen SDS-Lösung aufgenommen und auf das Gel aufgetragen wurden. Da die Massen der untersuchten Proben im Zusammenhang mit der Laufstrecke stehen, konnte mit Hilfe des Gels eine Aussage über die Größe der ausgebildeten Oligomere gemacht werden.

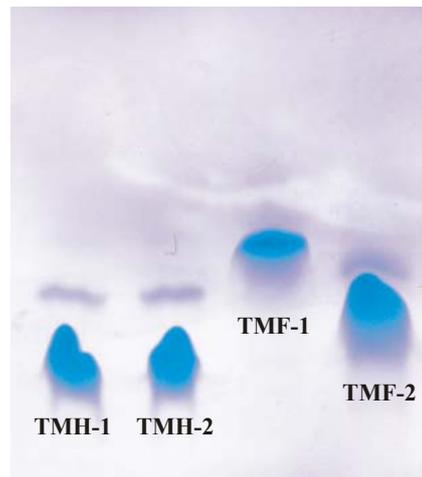


Abb. 4–3: Aufnahme des SDS-Gels der Peptide TMH-1, TMH-2, TMF-1 und TMF-2.

Es konnte veranschaulicht werden, dass die fluorinierten Peptide tendenziell größere Aggregate ausbilden, als die nicht fluorinierten Analoga, wobei TMF-1 einen höheren Aggregationszustand als TMF-2 aufwies. Die Proben, die TMH-1 und TMH-2 enthielten, zeigten im Gel in etwa identische Laufstrecken, wodurch auf ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten der beiden Moleküle geschlossen wurde. Während der Vergleich mit der Literatur Übereinstimmungen in den Ergebnissen für die fluorinierten Peptide und TMH-1 aufzeigen konnte, lieferte TMH-2 abweichende Resultate. Kumar et al. postulierten aufgrund einer kürzeren Laufstrecke ein geringeres Aggregationsverhalten des Peptids TMH-2 gegenüber den anderen Komponenten (Bilgicer and Kumar, 2004). Die Unterschiede in den Gelen könnten darauf zurückgeführt werden, dass für die Experimente verschiedene Synthesefractionen verwendet wurden, die unterschiedlichen Aufreinigungsschritten unterzogen wurden.

4.2.2 Insertion der Peptide in Lipiddoppelschichten

4.2.2.1 Fluoreszenzintensität und λ_{\max} in Abhängigkeit des Lipid-zu-Peptidverhältnisses

Alle vier Peptide weisen in Position vier der Sequenz einen Tryptophan-Rest auf (Abb. 4–1 und Abb. 4–2), der zahlreiche Fluoreszenzuntersuchungen ermöglicht und so die Charakterisierung der Wechselwirkungen mit Membranen erlaubt. In Abb. 4–4 ist exemplarisch für eine Peptidlösung von TMH-1 in H₂O/DMSO (8:2) das Emissionsspektrum des Tryptophans dargestellt, das mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm erhalten wurde. Die Fluoreszenzintensität weist in dem verwendeten Lösungsmittelgemisch ein Maximum bei 356 nm auf.

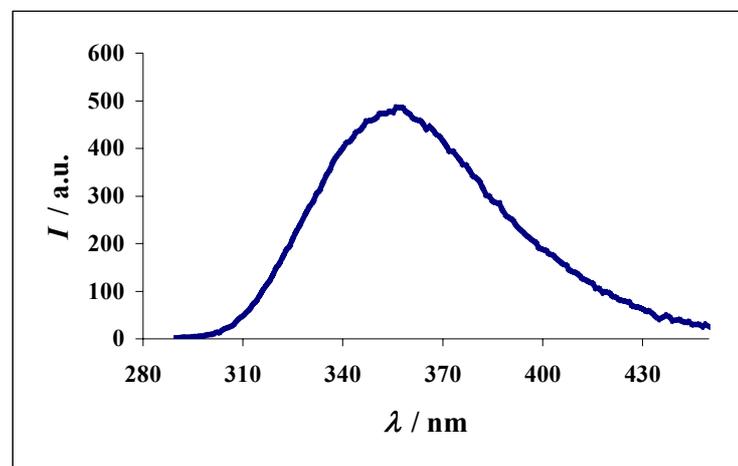


Abb. 4–4: Emissionsspektrum der Tryptophan-Fluoreszenz einer Lösung von TMH-1 in H₂O/DMSO (8:2) bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm.

Mittels der Tryptophan-Fluoreszenz der Peptide in Anwesenheit von unilamellaren Vesikeln sollte untersucht werden, ob die Peptide in Lipiddoppelschichten insertieren. Bei einer Insertion gelangt der Tryptophan-Rest von einem polaren wässrigen Medium in die hydrophobe Umgebung der Membran. Aufgrund des geringen Wassergehalts im Inneren der Lipiddoppelschicht kommt es, anders als in einem hydrophilen Medium, in der ansonsten unpolaren Umgebung nur zu einer geringfügigen Stabilisierung des angeregten Zustands, wodurch eine Blauverschiebung der Fluoreszenz (hypsochromer Effekt) beobachtet werden kann (Bong et al., 2000; Galla, 1988; Wimley and White, 2000). Gleichzeitig bewirkt die hydrophobere Umgebung eine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute, wodurch

ein Anstieg in der Fluoreszenzintensität festgestellt wird (Wallach and Zahler, 1966; Yonei et al., 1979).

Insertion von TMH-1 in POPC-Vesikel.

Bei der Titration einer wässrigen Lösung von TMH-1 mit POPC-Vesikeln konnte eine Zunahme der Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz I und eine gleichzeitige Blauverschiebung des Maximums aufgezeichnet werden. Die Auftragung der, um die Verdünnung korrigierten, Fluoreszenzintensität (Abb. 4–5) und der Änderung der Wellenlänge des Fluoreszenzintensitätsmaximums $\Delta\lambda_{\max}$ (Abb. 4–6) in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis lieferte in beiden Fällen einen sigmoiden Kurvenverlauf.

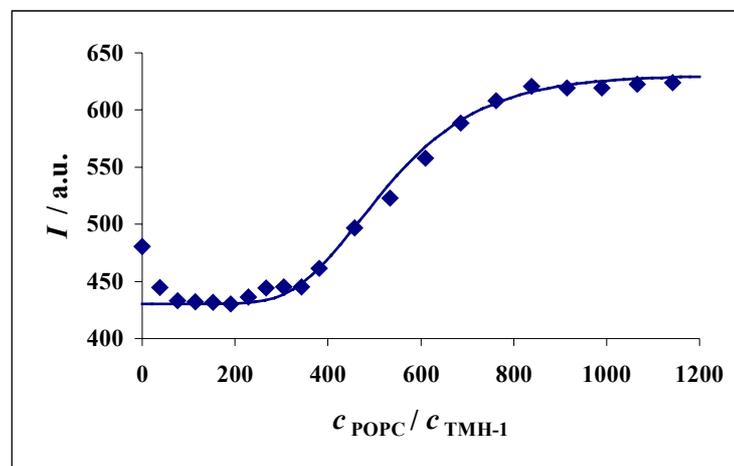


Abb. 4–5: Sigmoider Kurvenverlauf der korrigierten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis für TMH-1 (◆). Die durchgezogene Linie (–) stellt das Ergebnis einer Anpassung der Daten mittels eines Boltzmann-Fits dar.

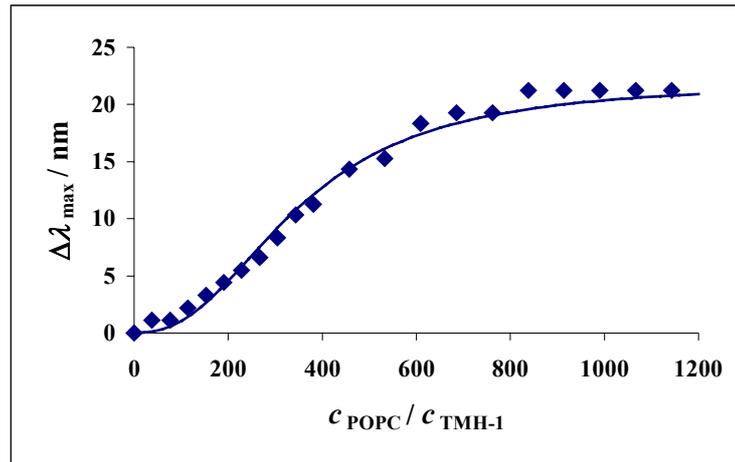


Abb. 4-6: Sigmoider Kurvenverlauf der Änderung der Wellenlänge des Fluoreszenzintensitätsmaximums in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis für TMH-1 (◆). Die durchgezogene Linie (—) stellt das Ergebnis einer Anpassung der Daten mittels eines Boltzmann-Fits dar. Das Intensitätsmaximum der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-1 in wässriger Lösung beträgt 356 nm.

Wie aus den dargestellten Auftragungen deutlich wird, resultierten sowohl die Zunahme der Fluoreszenzintensität, als auch die Änderung des Intensitätsmaximums mit steigender Lipidkonzentration in einer Sättigung. Diese wurde im Falle des Intensitätsanstiegs bei einem Lipid-zu-Peptidverhältnis von 800:1 bzw. im Falle der Verschiebung des Maximums bei etwa 600:1 erreicht. Dabei ergab sich für TMH-1 bei einer nachträglichen Insertion in Lipidvesikel eine maximale Blauverschiebung von 21 nm und ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Variation des Lipid-zu-Peptidverhältnisses von 0 bis 1200:1. Die Ergebnisse zeigen, dass das Peptid TMH-1 in der Lage ist in die Lipiddoppelschicht zu insertieren.

Wurde TMH-1 schon vor der Präparation der unilamellaren POPC-Vesikel in die Lipidfilme eingebaut, so konnte auch in diesem Fall ein Anstieg in der Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz I (Abb. 4-7) und eine zunehmende Verschiebung der Wellenlänge des Intensitätsmaximums $\Delta\lambda_{\text{max}}$ in den kurzwelligen Bereich (Abb. 4-8) mit zunehmenden Lipid-zu-Peptidverhältnis beobachtet werden. Anders als bei der nachträglichen Zugabe der Vesikelsuspension zu den Peptiden konnte hierbei gleich zu Beginn der Titration ein linearer Anstieg der Fluoreszenzintensität und der Änderung von λ_{max} in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis registriert werden, der mit steigender POPC-Konzentration in eine Sättigung verlief.

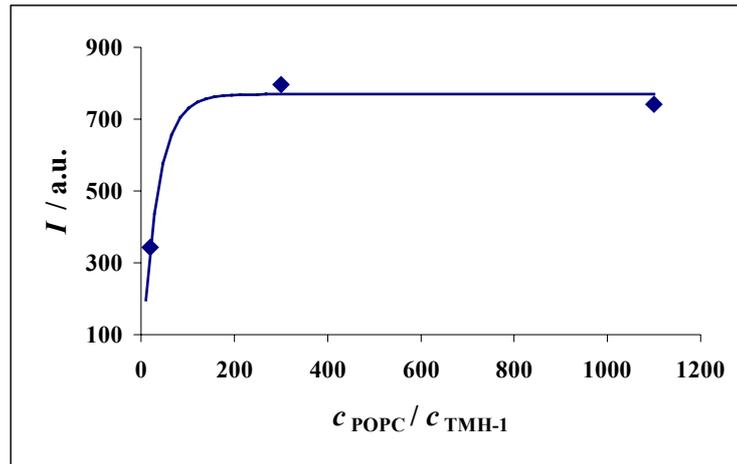


Abb. 4-7: Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis für TMH-1 (♦). Die Anpassung der Daten (—) zeigt mit zunehmendem Lipid-zu-Peptidverhältnis einen steigenden Verlauf.

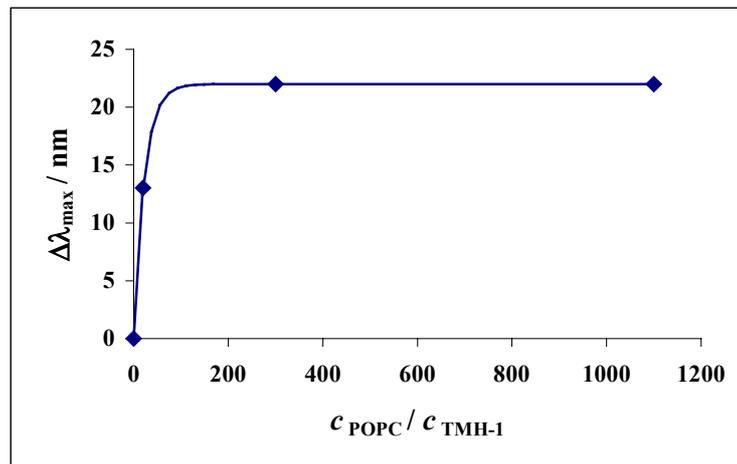


Abb. 4-8: Änderung der Wellenlänge des Fluoreszenzintensitätsmaximums in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis für TMH-1 (♦). Die Anpassung der Daten (—) zeigt mit zunehmendem Lipid-zu-Peptidverhältnis einen steigenden Verlauf. Das Intensitätsmaximum der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-1 in wässriger Lösung beträgt 356 nm.

Sowohl die Blauverschiebung des Maximums, als auch die Zunahme der Fluoreszenzintensität wiesen eine Sättigung im Bereich eines Lipid-zu-Peptidverhältnisses von 250:1 auf. Es konnte ein großer Sprung in der Fluoreszenzintensität und eine maximale Verschiebung des Maximums von 22 nm aufgezeichnet werden. Die Daten belegen die Insertion von TMH-1 in die Membran und die Einstellung einer maximalen Peptidkonzentration in der Lipidphase. Dies resultierte aus der Tatsache, dass oberhalb eines Lipid-zu-Peptidverhältnisses von

250:1 eine Erhöhung des POPC-Gehalts zu keinem weiteren Anstieg der Intensität bzw. der Verschiebung des Maximums führte.

Insertion von TMH-1 in DPPC-Vesikel.

Für die vorangegangenen Messungen wurden POPC-Doppelschichten verwendet, die bei Raumtemperatur im flüssig-kristallinen Zustand vorliegen ($T_m = -2\text{ °C}$) (www.avantilipids.com). Um festzustellen, ob die Peptide in der Lage sind in Membranen zu insertieren, die in der Gelphase vorliegen, wurde eine wässrige Lösung von TMH-1 bei Raumtemperatur mit DPPC-Vesikeln ($T_m = 41\text{ °C}$) titriert (www.avantilipids.com). Es konnte beobachtet werden, dass sich unter Berücksichtigung der Verdünnung während der Zugabe der Lipidlösung weder die Fluoreszenzintensität änderte, noch ein hypsochromer Effekt für die Wellenlänge des Intensitätsmaximums auftrat. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Insertion der Peptide in Lipiddoppelschichten nur dann erfolgen kann, wenn die Membran in der fluiden Phase vorliegt.

Insertion von TMH-2 in POPC-Vesikel.

Analog zum TMH-1 wurde eine wässrige Lösung von TMH-2 mit POPC-Vesikeln titriert. Es konnte keine signifikante Zunahme in der Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz und keine Verschiebung der Wellenlänge des Intensitätsmaximums registriert werden. Deshalb wurde versucht, TMH-2 vor der Präparation der Vesikel in Form von gemischten Lipid-Peptidfilmen in die Lipiddoppelschichten zu insertieren. Es konnten bei dieser Art der Präparation ähnliche Kurvenverläufe, wie sie für die Insertion des TMH-1 beobachtet wurden, für die beiden zu untersuchenden Parameter erhalten werden (Abb. 4–9 und Abb. 4–10).

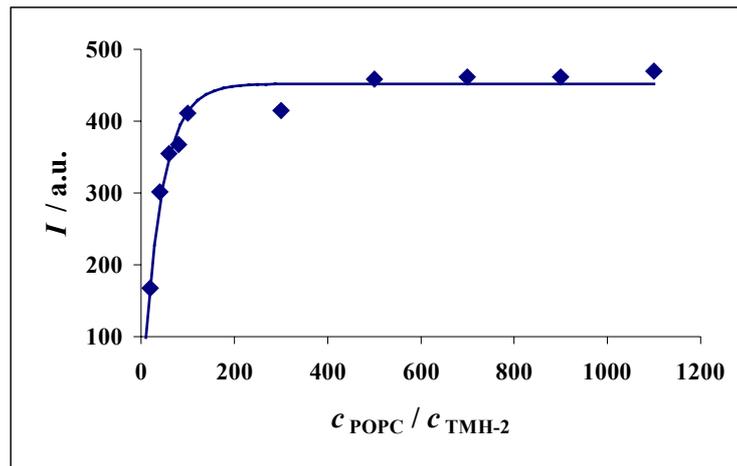


Abb. 4-9: Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis für TMH-2 (♦). Die Anpassung der Daten (–) zeigt mit zunehmender POPC-Konzentration einen steigenden Verlauf.

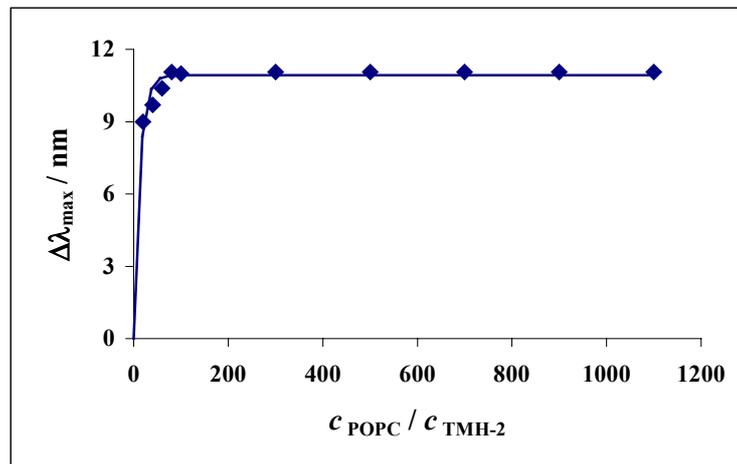


Abb. 4-10: Änderung der Wellenlänge des Fluoreszenzintensitätsmaximums in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis für TMH-2 (♦). Die Anpassung der Daten (–) zeigt mit zunehmender POPC-Konzentration einen steigenden Verlauf. Das Intensitätsmaximum der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-2 in wässriger Lösung beträgt 351 nm.

Im Bereich eines Lipid-zu-Peptidverhältnisses von 0 bis 1100:1 konnte ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität und eine Blauverschiebung der Fluoreszenz um 11 nm beobachtet werden. Die Daten belegen, dass auch TMH-2 in Lipiddoppelschichten inseriert vorliegt, so fern die Peptide bereits vor der Präparation der Vesikelsuspension in Lipidfilme eingebracht wurden.

Insertion von TMF-1 und TMF-2 in POPC-Vesikel.

Aufgrund der steigenden Hydrophobizität der Peptide TMF-1 und TMF-2 im Vergleich zu ihren nicht fluorinierten Analoga wurde, genau wie für TMH-2, versucht die beiden Peptide ohne vorherige Präparation der POPC-Vesikel in Lipiddoppelschichten zu insertieren, in dem gemischte Lipid-Peptidfilme hergestellt wurden. Für drei unterschiedliche Lipid-zu-Peptidverhältnisse konnte sowohl für TMF-1 (Abb. 4–11), als auch für TMF-2 (Abb. 4–12) mit steigender POPC-Konzentration ein Anstieg in der Fluoreszenzintensität I verzeichnet werden, der auf eine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute schließen ließ. Beide Messreihen zeigten einen kontinuierlich ansteigenden Kurvenverlauf.

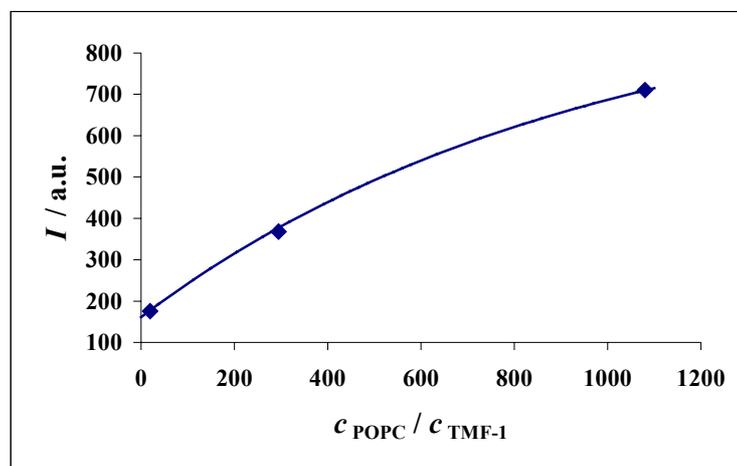


Abb. 4–11: Zunahme der Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz bei steigendem Lipid-zu-Peptidverhältnis für TMF-1 (◆). Die Anpassung der Daten (–) zeigt mit zunehmender POPC-Konzentration einen steigenden Verlauf.

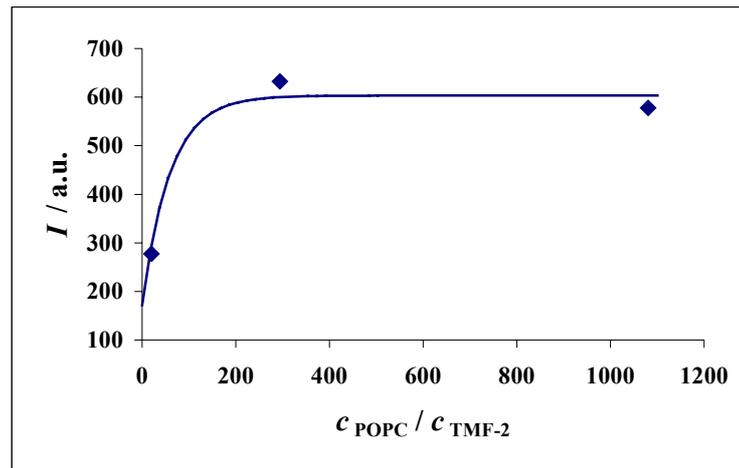


Abb. 4–12: Zunahme der Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz bei steigendem Lipid-zu-Peptidverhältnis für TMF-2 (◆). Die Anpassung der Daten (–) zeigt mit zunehmender POPC-Konzentration einen steigenden Verlauf.

Anders als für das TMH-1 und das TMH-2 zeigten die beiden fluorinierten Peptide jedoch eine bathochrome Verschiebung der Wellenlänge des Intensitätsmaximums λ_{max} mit steigendem Lipid-zu-Peptidverhältnis. Durch die Erhöhung der POPC-Konzentration wurde für TMF-1 ein Anstieg der Wellenlänge des Maximums von 333 auf 338 nm (Abb. 4–13) und für TMF-2 von 335 auf 338 nm (Abb. 4–14) beobachtet. Im Bereich der Sättigung zeigten demnach beide Peptide ein Intensitätsmaximum von 338 nm. Es konnte keine Aussage über die Änderung des Intensitätsmaximums $\Delta\lambda_{\text{max}}$ bezogen auf den Wert in Abwesenheit von Lipid gemacht werden, da eine Bestimmung der Wellenlänge des Maximums in wässriger Lösung aufgrund der schlechten Löslichkeit der beiden fluorinierten Peptide nicht möglich war.

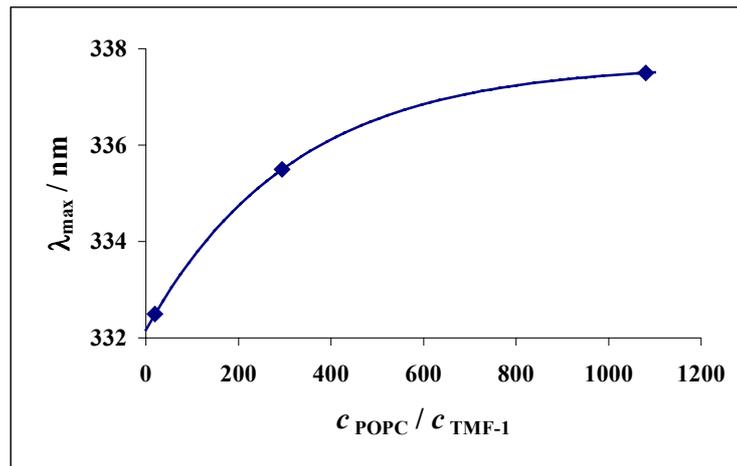


Abb. 4-13: Bathochrome Verschiebung der Tryptophan-Fluoreszenz von TMF-1 mit steigendem Lipid-zu-Peptidverhältnis (\blacklozenge). Die Anpassung der Daten ($-$) zeigt mit zunehmender POPC-Konzentration einen steigenden Verlauf.

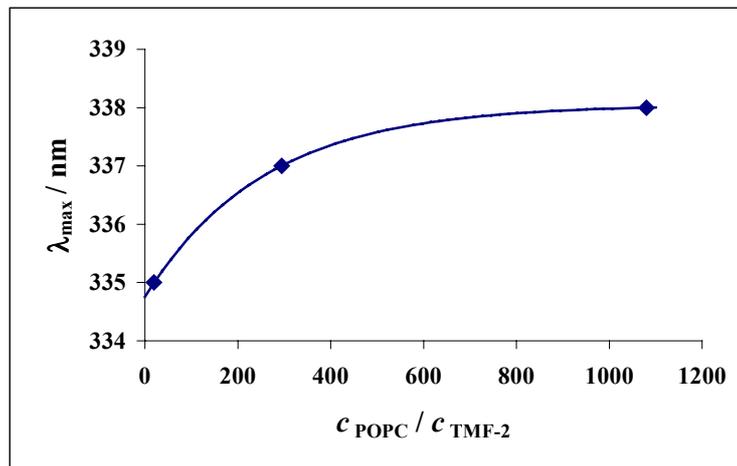


Abb. 4-14: Bathochrome Verschiebung der Tryptophan-Fluoreszenz von TMF-2 mit steigendem Lipid-zu-Peptidverhältnis (\blacklozenge). Die Anpassung der Daten ($-$) zeigt mit zunehmender POPC-Konzentration einen steigenden Verlauf.

4.2.2.2 Untersuchungen zur Reversibilität der Peptidinsertion

4.2.2.2.1 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Vesikelsuspension

Zur Untersuchung der Reversibilität der Peptidinsertion für die verschiedenen Peptide und die unterschiedlichen Präparationsmethoden wurden vier verschiedene, zum Teil quencherhaltige, Vesikelsuspensionen mit und ohne Peptid hergestellt und untersucht.

Für die beiden Moleküle TMH-1 und TMH-2 wurde die Reversibilität der Peptidinsertion sowohl für die nachträgliche Insertion der Peptide in POPC-Vesikel (Abb. 4–15 und Abb. 4–16) untersucht, als auch für den Einbau der Moleküle in Lipidfilme und anschließende Herstellung von unilamellaren POPC-Vesikeln (Abb. 4–17 und Abb. 4–18). Die Spektren zeigten für beide Präparationsmethoden eine maximale Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz in Abwesenheit von Quencher und minimale Intensität, wenn die Vesikel mit dem Quencher 5-DOXYL-stearinsäure versehen wurden. Für die Mischungen 1 und 2, bestehend aus den Vesikelfractionen mit inseriertem Peptid mit (Suspension 4) und ohne Quencher (Suspension 3) und den Vesikelfractionen ohne Peptid mit (Suspension 2) und ohne Quencher (Suspension 1) (Abb. 4–15), ergaben sich bei beiden Präparationsmethoden jeweils fast identische Intensitäten, die in etwa dem Mittel der Ausgangsintensitäten der einzelnen Vesikelfractionen in An- und in Abwesenheit von Quencher entsprachen. In Abb. 4–15 sind die erhaltenen Daten der Reversibilitätsmessungen am Beispiel des nachträglich inserierten TMH-1 als Fluoreszenzspektren und zur Verdeutlichung in Form einer schematischen Darstellung der erhaltenen Vesikelsuspensionen abgebildet.

Reversibilität der Peptidinsertion bei nachträglicher Insertion der Peptide in Vesikel.

Die Abb. 4–15 und Abb. 4–16 zeigen die Ergebnisse zur Untersuchung der Reversibilität der Insertion von TMH-1 und TMH-2 bei einer nachträglichen Insertion der Peptide in POPC-Vesikel.

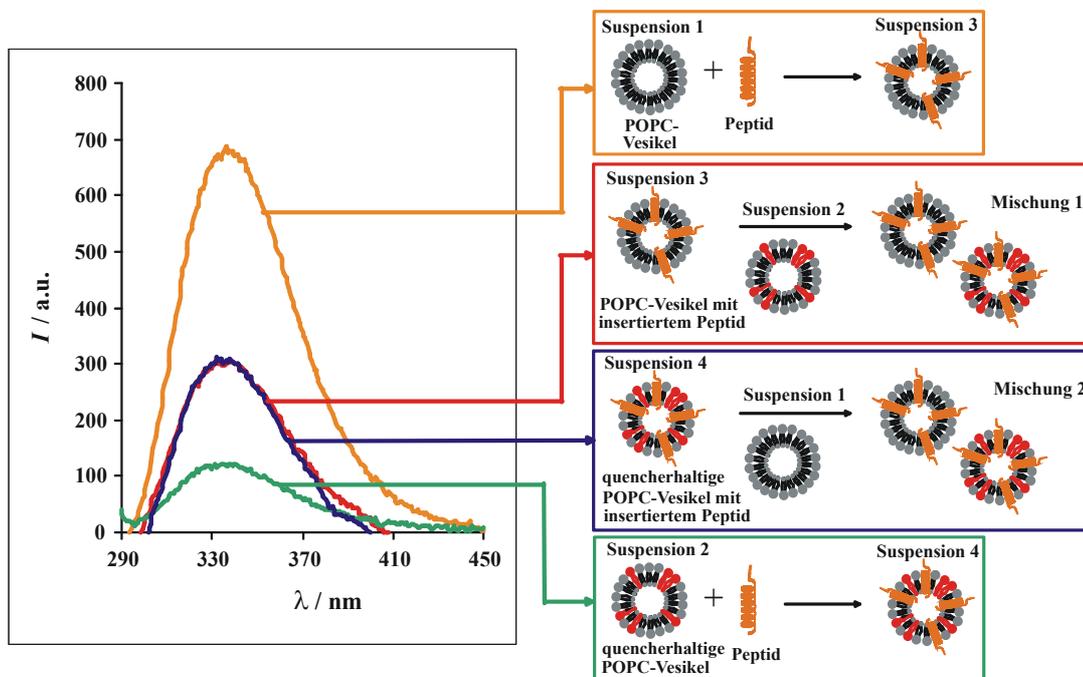


Abb. 4–15: Verlauf der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-1 in unterschiedlichen Vesikelsuspensionen ((-) Suspension 3, (-) Suspension 4, (-) Mischung 1, (-) Mischung 2) bei einer nachträglichen Insertion der Peptide in unilamellare POPC-Vesikel (links). Schematische Darstellung der resultierenden Vesikelsuspensionen (rechts).

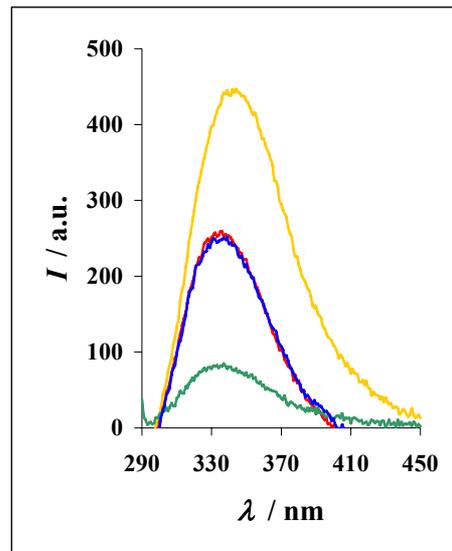


Abb. 4–16: Verlauf der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-2 in unterschiedlichen Vesikelsuspensionen ((–) Suspension 3, (–) Suspension 4, (–) Mischung 1, (–) Mischung 2) bei einer nachträglichen Insertion der Peptide in unilamellare POPC-Vesikel.

Reversibilität der Peptidinsertion bei Einbau der Peptide in Lipidfilme ohne vorherige Vesikelpräparation.

Die Abb. 4–17 und Abb. 4–18 zeigen die Ergebnisse zur Untersuchung der Reversibilität der Insertion von TMH-1 und TMH-2 bei Einbau der Peptide in Lipidfilme.

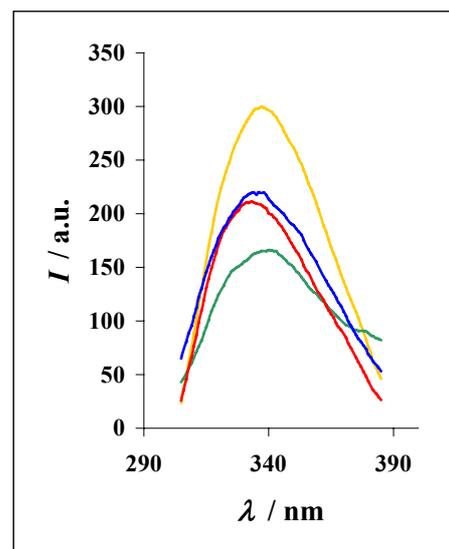


Abb. 4–17: Verlauf der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-1 in unterschiedlichen Vesikelsuspensionen ((–) Suspension 3, (–) Suspension 4, (–) Mischung 1, (–) Mischung 2) bei Einbau der Peptide in Lipidfilme ohne vorherige Vesikelpräparation.

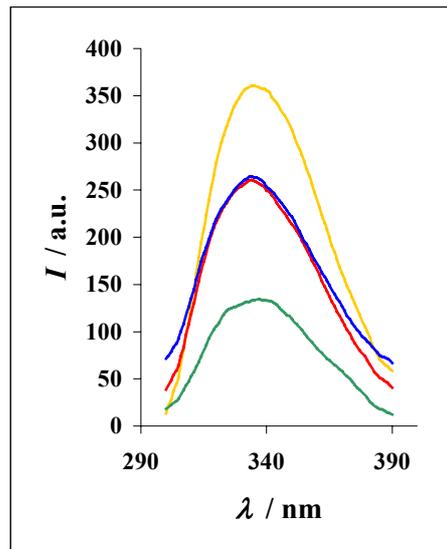


Abb. 4–18: Verlauf der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-2 in unterschiedlichen Vesikelsuspensionen ((–) Suspension 3, (–) Suspension 4, (–) Mischung 1, (–) Mischung 2) bei Einbau der Peptide in Lipidfilme ohne vorherige Vesikelpräparation.

Die verschiedenen Messungen für TMH-1 und TMH-2 zeigten für die unterschiedlichen Präparationsmethoden vergleichbare Ergebnisse. Die beobachtete maximale Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz in Abwesenheit von Quencher, konnte darauf zurückgeführt werden, dass die Tryptophan-Fluoreszenz nicht gelöscht wurde, während die minimale Intensität, wenn die Vesikel mit dem Quencher 5-DOXYL-stearinsäure versehen wurden, dadurch verursacht wurde, dass die Fluoreszenzintensität durch das Nitrosylradikal in Position fünf herabgesetzt wurde. Die Mischungen 1 und 2 lieferten jeweils fast identische Intensitäten, die in etwa dem Mittel der Ausgangsintensitäten der einzelnen Vesikelfractionen in An- und in Abwesenheit von Quencher entsprachen. Da die Peptide immer nur in einer der beiden Suspensionen, die miteinander gemischt wurden, in die Vesikel inseriert vorlagen, konnte aufgrund der Intensitätsänderung geschlossen werden, dass die Peptide in der Lage waren ihre Position zwischen den Vesikeln der unterschiedlichen Suspensionen zu wechseln. D.h. die Messungen belegen, dass sowohl TMH-1, als auch TMH-2 für beide Präparationsmethoden reversibel in die Lipiddoppelschichten inserieren und ein Austausch der Peptide zwischen den verschiedenen Vesikelpopulationen möglich ist.

4.2.2.2 Zeitliche Abhängigkeit der Reversibilität

Für die verschiedenen Messreihen fiel auf, dass je nach Art der Probenpräparation charakteristische Zeitabhängigkeiten auftraten. Wurden die Peptide bereits vor der Vesikelherstellung in Lipidfilme eingebaut, so konnte sofort nach der Präparation der unilamellaren Vesikel eine konstante Tryptophan-Fluoreszenz gemessen werden. Auch für Mischungen von Vesikelsuspensionen, die auf diese Weise präpariert wurden, ließen sich schon nach sehr kurzer Zeit eine Einstellung des Gleichgewichtszustands der Peptide zwischen wässriger und Lipidphase und somit eine konstante Tryptophan-Fluoreszenzintensität beobachten.

Deutlich länger dauerte es bis zur Aufnahme konstanter Fluoreszenzspektren, wenn die Peptide nachträglich in die Vesikel insertiert wurden. Sowohl bei der Zugabe der Peptide zu den unterschiedlichen Suspensionen, als auch bei der anschließenden Herstellung der Mischungen, traten innerhalb der ersten 20 Minuten große Schwankungen (bis zu 30 %) in der Fluoreszenzintensität auf, bis sich ein entsprechendes Gleichgewicht der Peptide zwischen wässriger und Lipidphase eingestellt hatte.

4.2.3 Lokalisierung des Tryptophan-Rests in der Membran

4.2.3.1 Fluoreszenzintensität in Anwesenheit der Quencher 5- und 16-DOXYL-stearinsäure

Mit Hilfe von Löschexperimenten sollte die Position des Tryptophan-Rests der Peptide in der Membran lokalisiert werden. Über Messungen mit den beiden Quenchern 5- und 16-DOXYL-stearinsäure konnte mittels der *parallax*-Methode der Abstand zwischen dem Tryptophan-Rest des jeweiligen Peptids und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht berechnet werden (Chung et al., 1992).

Quenchingexperimente mit TMH-1 und TMH-2.

Für die Quenchingexperimente wurden Vesikelsuspensionen mit variierenden Mengen an 5- bzw. 16-DOXYL-stearinsäure hergestellt und mit konstanten Mengen an Peptid versetzt. Sowohl für TMH-1, als auch für TMH-2 fiel auf, dass die Tryptophan-Fluoreszenz mit steigendem Gehalt an DOXYL-Quenchern stärker gelöscht wurde. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenz durch das Nitrosylradikal in Position fünf für beide Peptide in höherem Maße herabgesetzt wurde, als durch den Quencher in Position sechzehn. Diese Tatsache spiegelte sich in

den unterschiedlichen Steigungen der beiden Geraden wider, die für die beiden Quencher mit Hilfe einer Auftragung entsprechend der STERN-VOLLMER-Gleichung (Gl. 3–5) erhalten wurden. Dabei zeigte das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Ab- und in Anwesenheit von Quencher I^0/I in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration c_Q für die Peptide TMH-1 (Abb. 4–19) und TMH-2 (Abb. 4–20) eine deutlich größere Steigung für die 5-DOXYL-stearinsäure im Vergleich zum Quencher mit einem Nitrosylradikal in Position sechzehn.

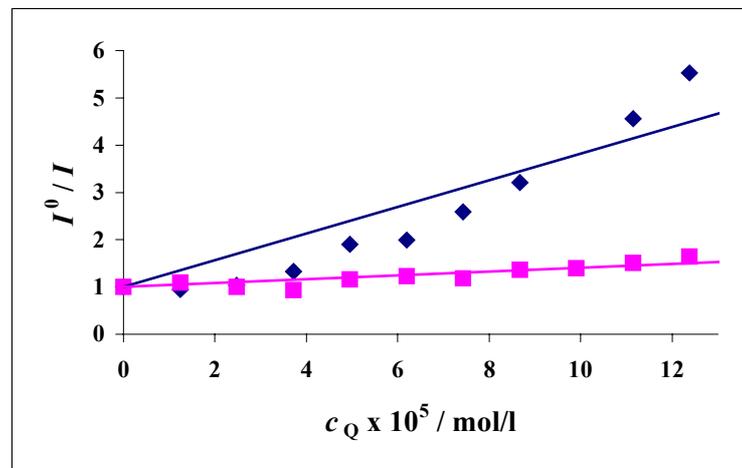


Abb. 4–19: Darstellung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten des Peptids TMH-1 in An- und in Abwesenheit der Quencher 5-DOXYL-stearinsäure (\blacklozenge) bzw. 16-DOXYL-stearinsäure (\blacksquare) in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer linearen Kurvenanpassung mit der Steigung $0.28 \cdot 10^{-5} \text{ l/mol}$ für den Quencher in Position fünf ($-$) und $0.04 \cdot 10^{-5} \text{ l/mol}$ für den Quencher in Position sechzehn ($-$).

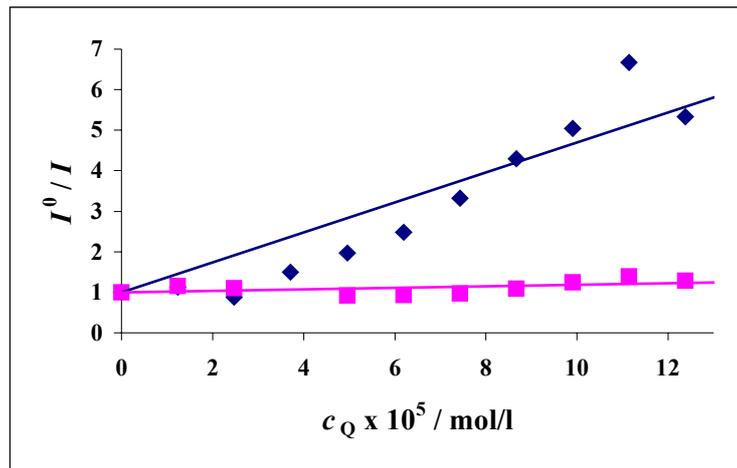


Abb. 4–20: Darstellung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten des Peptids TMH-2 in An- und in Abwesenheit der Quencher 5- DOXYL-stearinsäure (\blacklozenge) bzw. 16-DOXYL-stearinsäure (\blacksquare) in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer linearen Kurvenanpassung mit der Steigung $0.37 \cdot 10^{-5} \text{ l/mol}$ für den Quencher in Position fünf (–) und $0.02 \cdot 10^{-5} \text{ l/mol}$ für den Quencher in Position sechszehn (–).

Über die Steigungen der Geraden ergaben sich nach der STERN-VOLLMER-Gleichung (Gl. 3–5) die Assoziationskonstanten mit $K_{\text{FQ}}^{5\text{-DS}} = 2.8 \cdot 10^{-6} \text{ l/mol}$ und $K_{\text{FQ}}^{16\text{-DS}} = 0.4 \cdot 10^{-6} \text{ l/mol}$ für TMH-1 und mit $K_{\text{FQ}}^{5\text{-DS}} = 3.7 \cdot 10^{-6} \text{ l/mol}$ und $K_{\text{FQ}}^{16\text{-DS}} = 0.2 \cdot 10^{-6} \text{ l/mol}$ für TMH-2. Die Tryptophan-Fluoreszenz wurde für beide Peptide durch die 5-DOXYL-stearinsäure stärker gelöscht, als durch den Quencher in Position sechszehn. Diese Tatsache wurde bestätigt durch die höheren Werten der Assoziationskonstanten für die Löschesperimente mit 5-DOXYL-stearinsäure verglichen mit den Ergebnissen, die mit Hilfe der 16-DOXYL-stearinsäure erhalten wurden. Die Ergebnisse zeigen demnach, dass die Tryptophan-Reste beider Peptide innerhalb der Lipiddoppelschicht näher am Nitrosylradikal in Position fünf lokalisiert sind.

Neben der Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration an Quencher konnte darüber hinaus eine Blauverschiebung des Intensitätsmaximums λ_{max} beobachtet werden. Abb. 4–21 und Abb. 4–22 zeigt die Abnahme von λ_{max} in Abhängigkeit der Quencherkonzentration c_Q .

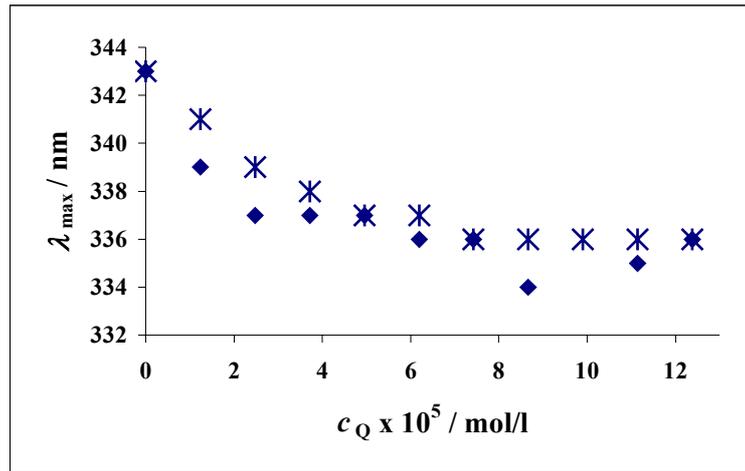


Abb. 4-21: Blauverschiebung des Intensitätsmaximums der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-1 in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration der beiden Löscherkmoleküle 5- (◆) und 16-DOXYL-stearinsäure (*).

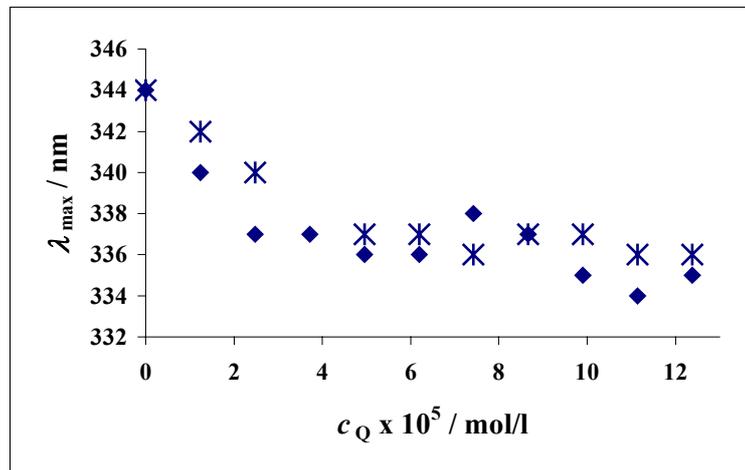


Abb. 4-22: Blauverschiebung des Intensitätsmaximums der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMH-2 in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration der beiden Löscherkmoleküle 5- (◆) und 16-DOXYL-stearinsäure (*).

Quenchingexperimente mit TMF-1 und TMF-2.

Analog den Quenchingexperimenten der beiden nicht fluorinierten Peptiden, wurde das Verhalten der Tryptophan-Fluoreszenz in Anwesenheit variierender Mengen von 5- bzw. 16-DOXYL-stearinsäure in POPC-Vesikeln für TMF-1 und TMF-2 untersucht. Auch die beiden fluorinierten Peptide zeigten eine leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität des Tryptophans mit steigender Quencherkonzentration. Die schwache Zunahme des Verhältnisses I^0/I entsprach bezogen auf die Steigung, in etwa dem Löschen der Fluoreszenz der beiden Peptide TMH-1 und TMH-2 durch 16-DOXYL-stearinsäure. Anders als für die beiden nicht fluorinierten Analoga

konnte im Rahmen der Messgenauigkeit kein Unterschied in den Steigungen der beiden Geraden festgestellt werden, die für die beiden DOXYL-Quencher mit Hilfe der STERN-VOLLMER-Auftragung erhalten wurden (Abb. 4–23 und Abb. 4–24).

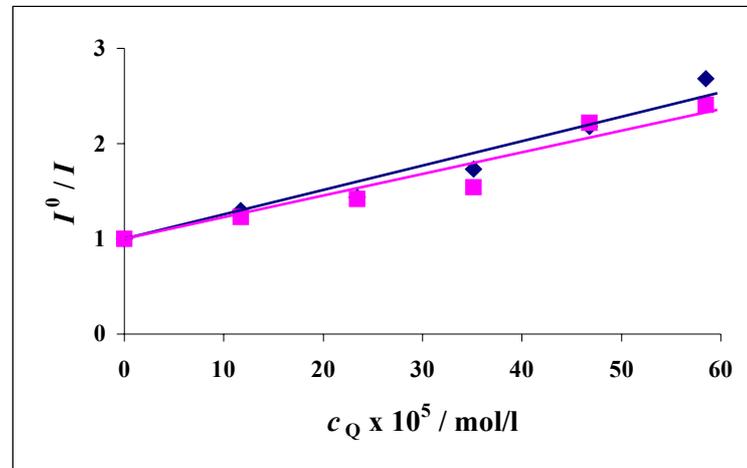


Abb. 4–23: Darstellung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten des Peptids TMF-1 in An- und in Abwesenheit der Quencher 5-DOXYL-stearinsäure (\blacklozenge) bzw. 16-DOXYL-stearinsäure (\blacksquare) in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer linearen Kurvenanpassung mit der Steigung $0.03 \cdot 10^{-5} \text{ l/mol}$ für den Quencher in Position fünf (–) und $0.02 \cdot 10^{-5} \text{ l/mol}$ für den Quencher in Position sechszehn (–).

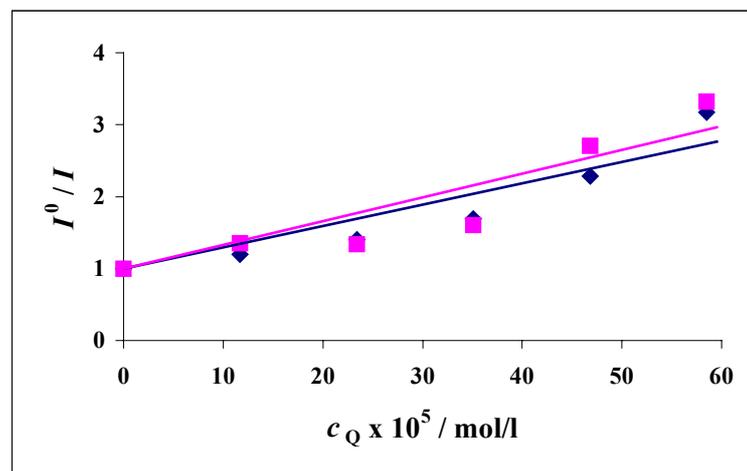


Abb. 4–24: Darstellung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten des Peptids TMF-2 in An- und in Abwesenheit der Quencher 5-DOXYL-stearinsäure (\blacklozenge) bzw. 16-DOXYL-stearinsäure (\blacksquare) in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer linearen Kurvenanpassung, die sowohl für den Quencher in Position fünf (–) als auch für den Quencher in Position sechszehn (–) eine Steigung von $0.03 \cdot 10^{-5} \text{ l/mol}$ aufweist.

Die Assoziationskonstanten, die analog den nicht fluorinierten Peptiden nach der STERN-VOLLMER-Gleichung (Gl. 3–5) aus der Auftragung bestimmt wurden, ergaben für TMF-1 $K_{\text{FQ}}^{5\text{-DS}} = 0.3 \cdot 10^{-6}$ l/mol bzw. $K_{\text{FQ}}^{16\text{-DS}} = 0.2 \cdot 10^{-6}$ l/mol und für TMF-2 $K_{\text{FQ}}^{5\text{-DS}} = 0.3 \cdot 10^{-6}$ l/mol bzw. $K_{\text{FQ}}^{16\text{-DS}} = 0.3 \cdot 10^{-6}$ l/mol. Da für die Peptide für beide DOXYL-stearinsäuren ähnliche Werte für die Assoziationskonstanten erhalten wurden, ist keine Aussage darüber möglich, ob die Tryptophan-Reste der fluorinierten Peptide innerhalb der Membran näher an den Quenchern in Position fünf oder in Position sechzehn lokalisiert sind.

Auch für die beiden fluorinierten Peptide konnte ein Einfluss der Quencherkonzentration auf das Maximum der Tryptophan-Fluoreszenz beobachtet werden. Abb. 4–25 und Abb. 4–26 veranschaulichen die Rotverschiebung des Intensitätsmaximums λ_{max} mit steigender Konzentration an 5- bzw. 16-DOXYL-stearinsäure für die Peptide TMF-1 und TMF-2.

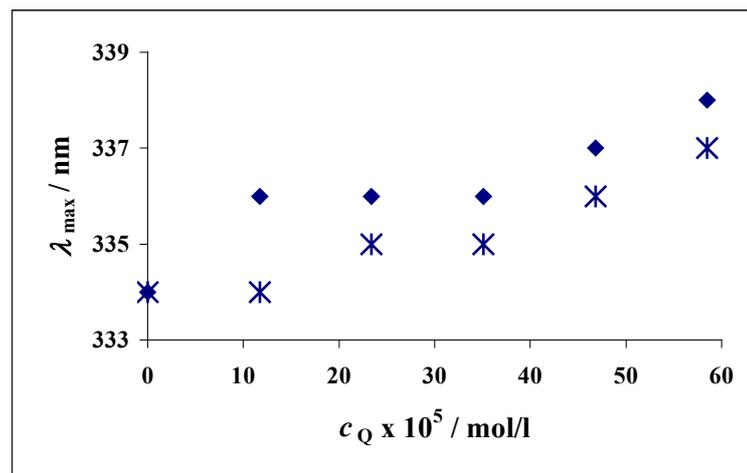


Abb. 4–25: Rotverschiebung des Intensitätsmaximums der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMF-1 in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration der beiden Löschermoleküle 5- (♦) und 16-DOXYL-stearinsäure (*).

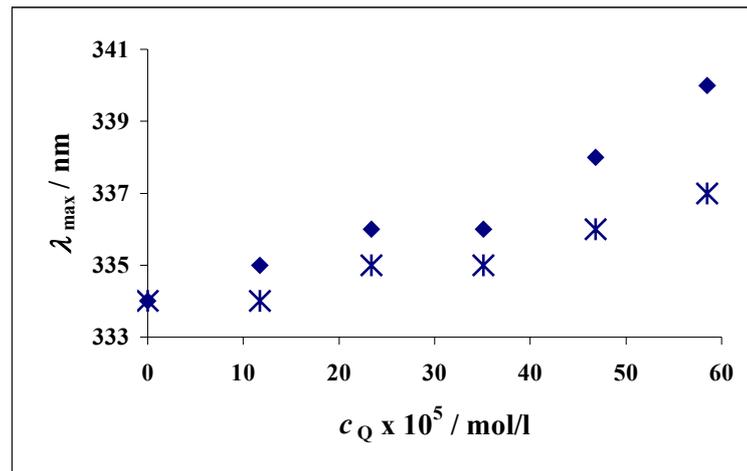


Abb. 4-26: Rotverschiebung des Intensitätsmaximums der Tryptophan-Fluoreszenz des Peptids TMF-2 in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration der beiden Löscher-moleküle 5- (\blacklozenge) und 16-DOXYL-stearinsäure ($*$).

4.2.3.2 Berechnung des Abstands zwischen dem Tryptophan-Rest und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht nach Perrin

Mit Hilfe der Ergebnisse aus den Quenchingexperimenten ist es möglich über die *parallax*-Methode den Abstand zwischen den Tryptophan-Resten der Peptide und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht zu berechnen (Chung et al., 1992). Der entsprechende mathematische Zusammenhang ist dabei über die Perrin-Gleichung gegeben (Gl. 3–10).

Abstandsbestimmung für die Peptide TMH-1 und TMH-2.

Für die Auswertung wurde der natürliche Logarithmus aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der Peptide TMH-1 (Abb. 4-27) und TMH-2 (Abb. 4-28) in

Ab- und in Anwesenheit der DOXYL-stearinsäuren $\ln\left(\frac{I}{I^0}\right)$ gegen den Molenbruch

des entsprechenden Quenchers χ_{DOXYL} aufgetragen.

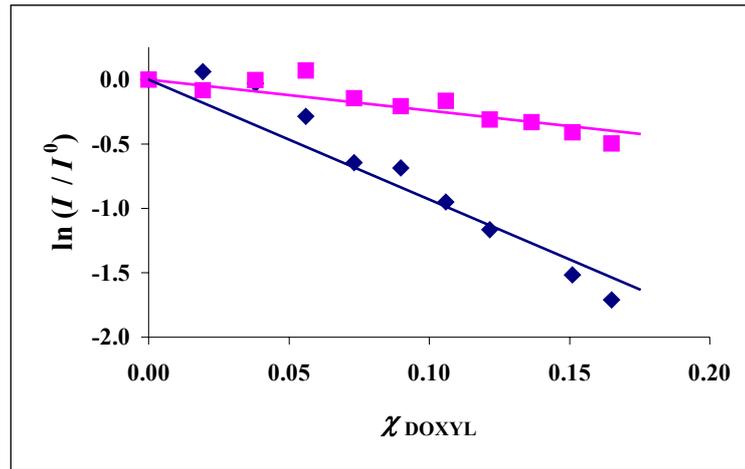


Abb. 4-27: Darstellung des natürlichen Logarithmus der Fluoreszenzintensitäten des Peptids TMH-1 in An- und in Abwesenheit der Quencher 5-DOXYL-stearinsäure (◆) bzw. 16-DOXYL-stearinsäure (■) in Abhängigkeit vom Molenbruch des Quenchers. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer linearen Kurvenanpassung nach der Perrin-Gleichung (Gl. 3-10) mit der Steigung -9.3 für den Quencher in Position fünf (—) und -2.4 für den Quencher in Position sechzehn (—).

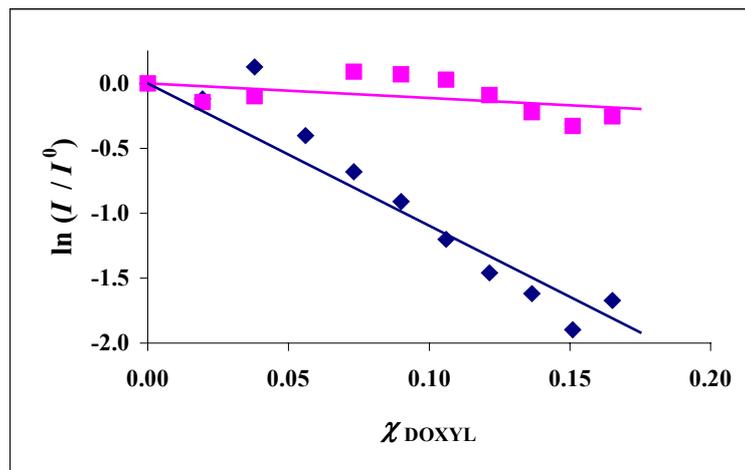


Abb. 4-28: Darstellung des natürlichen Logarithmus der Fluoreszenzintensitäten des Peptids TMH-2 in An- und in Abwesenheit der Quencher 5-DOXYL-stearinsäure (◆) bzw. 16-DOXYL-stearinsäure (■) in Abhängigkeit vom Molenbruch des Quenchers. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer linearen Kurvenanpassung nach der Perrin-Gleichung (Gl. 3-10) mit der Steigung -11.0 für den Quencher in Position fünf (—) und -1.1 für den Quencher in Position sechzehn (—).

Aus den Steigungen, die für die beiden Quencher erhalten wurden, konnten die Abstände zwischen den Tryptophan-Resten und den Nitrosylradikalen $Z_{5\text{-DS}}$ und $Z_{16\text{-DS}}$ für die beiden Peptide berechnet werden. Mit diesen Daten und den

literaturbekannten Werten für die Distanz zwischen den Quenchern und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht Q_{5-DS} und Q_{16-DS} war es möglich, sowohl für TMH-1 als auch für TMH-2 den Abstand zwischen dem Tryptophan-Rest und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht P zu berechnen (Abb. 3–6) (Chattopadhyay and London, 1987). Mit Hilfe von Gl. 3–11 und den in Tab. 4–1 dargestellten Parametern ergaben sich für den Abstand P Werte von 1.5 nm für TMH-1 bzw. 1.9 nm für TMH-2.

Tab. 4–1: Parameter zur Berechnung des Abstands zwischen dem Tryptophan-Rest und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht. Dabei stehen Z_{5-DS} bzw. Z_{16-DS} für den berechneten Abstand zwischen dem Tryptophan-Rest und dem Nitrosylradikal und Q_{5-DS} bzw. Q_{16-DS} für die Distanz zwischen dem Quencher und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht.

	TMH-1	TMH-2
$Z_{5-DS}^2 / \text{Å}^2$	- 207	- 244
$Z_{16-DS}^2 / \text{Å}^2$	- 54	- 25
$Q_{5-DS} / \text{Å}$	12.2	12.2
$Q_{16-DS} / \text{Å}$	2.5	2.5

TMF-1 und TMF-2.

Die Quenchingexperimente für die Peptide TMF-1 und TMF-2 haben gezeigt, dass die Tryptophan-Fluoreszenz durch die Nitrosylradikale in Position fünf bzw. sechzehn nur in geringem Maße herabgesetzt wurde und keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der Fluoreszenzlöschung der beiden DOXYL-Quencher lieferten. Die Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und den Quenchern waren sowohl für TMF-1 als auch für TMF-2 nicht ausgeprägt genug, um weitere Berechnungen mittels der *parallax*-Methode durchzuführen.

4.2.4 Bestimmung der Sekundärstruktur der Peptide mittels CD-Spektroskopie

4.2.4.1 CD-Spektren

Mittels der CD-Spektroskopie sollte festgestellt werden, ob die Peptide TMH-1 und TMH-2 in Membranen den erwarteten α -helikalen Aufbau zeigen. Darüber hinaus sollte die Sekundärstruktur der Peptide in wässriger Lösung untersucht werden und

mittels 2,2,2-Trifluorethanol der maximal mögliche α -helikale Gehalt der beiden Peptide bestimmt werden.

Abb. 4–29 und Abb. 4–30 zeigen die CD-Spektren der Peptide TMH-1 und TMH-2 in Wasser. Es wurde erwartet, dass die Peptide in wässriger Lösung als Zufallsknäuel vorliegen und erst durch die Wechselwirkung mit einer Lipidmembran in eine α -helikale Konformation übergehen. Stattdessen wurde der für eine α -helikale Sekundärstruktur typische Kurvenverlauf gefunden, der für beide Peptide zwei charakteristische Minima bei 208 nm und 222 nm und ein Maximum bei 190 nm für TMH-1 bzw. 194 nm für TMH-2 aufweist.

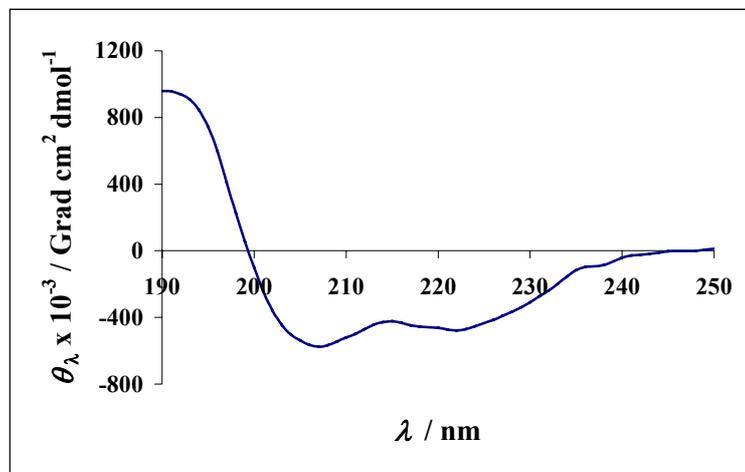


Abb. 4–29: CD-Spektrum des Peptids TMH-1 in Wasser.

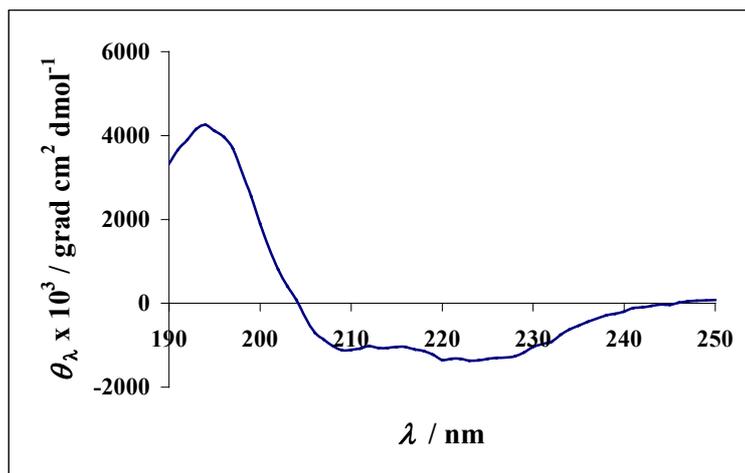


Abb. 4–30: CD-Spektrum des Peptids TMH-2 in Wasser.

Ein ähnliches Bild zeigte sich für die CD-Spektren, die erhalten wurden, wenn die Peptide in POPC-Vesikel mit einem Lipid-zu-Peptidverhältnis von 100:1 inseriert wurden (Abb. 4–31). Neben dem klar erkennbaren Doppelminimum (208 nm und

222 nm) erschienen die Maxima im Vergleich zu den CD-Spektren in Wasser leicht verschoben bei 196 nm für TMH-1 bzw. 195 nm für TMH-2.

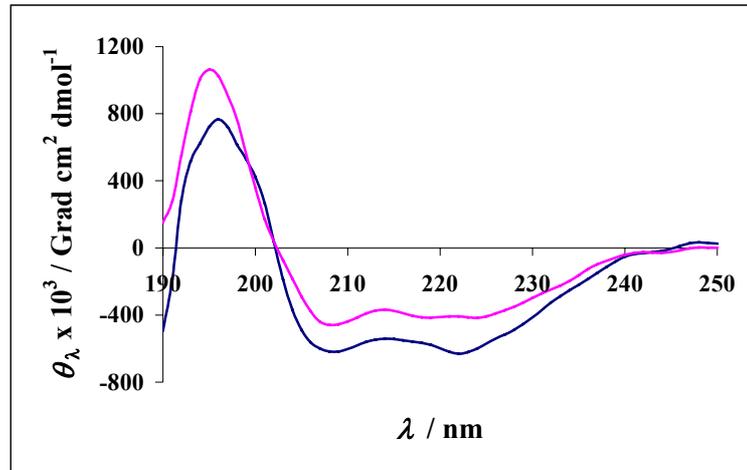


Abb. 4-31: CD-Spektren der Peptide TMH-1 (—) und TMH-2 (—) in POPC-Vesikeln bei einem Lipid-zu-Peptidverhältnis von $c_{\text{POPC}}/c_{\text{Peptid}} = 100:1$.

In Abb. 4-32 sind die Kurvenverläufe dargestellt, die für die Peptide TMH-1 und TMH-2 in 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) erhalten wurden. Aus der Literatur ist bekannt, dass TFE die Ausbildung α -helikaler Strukturen induziert und die Helices stabilisiert (Luo and Baldwin, 1997; Sönnichsen, 1992). Dies konnte anhand der Minima bei 208 nm und 222 nm bestätigt werden. Ein Vergleich der CD-Spektren, die für die Peptide in POPC (Abb. 4-31) und TFE (Abb. 4-32) aufgezeichnet wurden, zeigt, dass im Falle des fluorierten Alkohols die Minima zu größeren negativen Elliptizitäten verschoben erschienen und somit einen höheren α -helikalen Gehalt aufwiesen. Das Maximum lag für beide Peptide bei 191 nm.

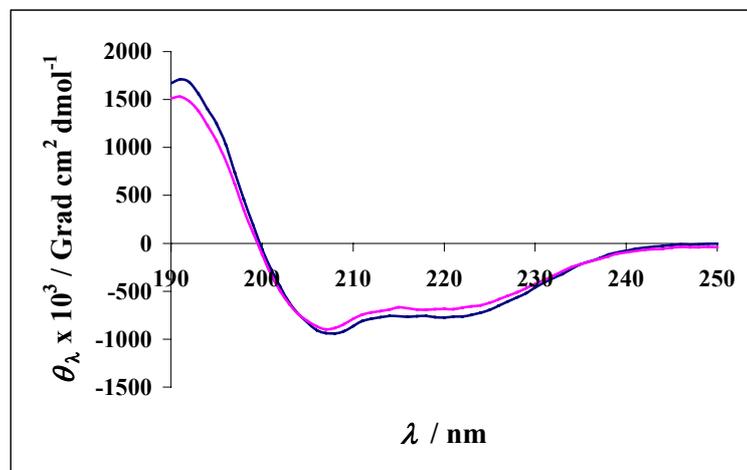


Abb. 4-32: CD-Spektren der Peptide TMH-1 (—) und TMH-2 (—) in 2,2,2-Trifluorethanol.

4.2.4.2 Elliptizitäten und α -helikaler Gehalt

Mit Hilfe der Elliptizitäten bei 222 nm $\theta_{222}^{\text{gem}}$ aus den dargestellten Spektren und Gl. 3–18 ist es möglich den α -helikalen Gehalt der beiden Peptide in den verschiedenen Lösungsmitteln zu berechnen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4–2 für das Peptid TMH-1 und in Tab. 4–3 für das Peptid TMH-2 dargestellt:

Tab. 4–2: Elliptizitätswerte $\theta_{222}^{\text{gem}}$ und berechneter α -helikaler Gehalt des Peptids TMH-1 in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

	$\theta_{222}^{\text{gem}}$	α -helikaler Gehalt
H ₂ O	- 484	(51 ± 2) %
POPC	- 636	(67 ± 3) %
TFE	- 763	(80 ± 2) %

Tab. 4–3: Elliptizitätswerte $\theta_{222}^{\text{gem}}$ und berechneter α -helikaler Gehalt des Peptids TMH-2 in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

	$\theta_{222}^{\text{gem}}$	α -helikaler Gehalt
POPC	- 402	(42 ± 3) %
TFE	- 672	(70 ± 2) %

Die Auswertung der CD-Spektren lieferte steigende Elliptizitätswerte von Wasser über POPC bis hin zu TFE und insgesamt etwas höhere Elliptizitäten für das Peptid TMH-1 verglichen mit TMH-2. Dabei wurde auf eine Berechnung des α -helikalen Gehalts von TMH-2 in Wasser verzichtet, da im Rahmen der Messgenauigkeit keine zufriedenstellende Konzentrationsbestimmung für das Peptid möglich war. Aufgrund der Aggregatbildung der Peptide in Wasser (siehe Diskussion, Kap. 4.2.6) mussten diese zunächst 1:1 mit Guanidiniumchlorid (GndHCl) verdünnt werden, um die Peptidoligomere in Monomere zu überführen. Im Falle des TMH-2 kam es bei diesem Vorgang zu einer sofortigen Ausfällung des Peptids, so dass eine UV-spektroskopische Bestimmung der Konzentration nicht möglich war.

4.2.5 Untersuchung der räumlichen Orientierung der Peptide in der Membran

4.2.5.1 ATR-FT-IR-Spektren

Die ATR-FT-IR-Spektroskopie stellt eine Methode zur Untersuchung der räumlichen Orientierung von Peptiden in Lipiddoppelschichten dar (Frey and Tamm, 1991; Fringeli and Günthard, 1981; Goormatigh and Ruyschaert, 1990; Tamm and Tatulian, 1997). Über polarisierte IR-Spektren, bei denen eine Messung mit parallel und eine Messung mit senkrecht polarisiertem Licht aufgezeichnet wird, kann eine Aussage über die Orientierung der Peptide bezogen auf die Membrannormale gemacht werden. Abb. 4–33 und Abb. 4–34 zeigen beispielhaft die IR-Spektren für das Peptid TMH-1 in POPC-Multischichten, die für senkrecht und für parallel polarisiertes Licht erhalten wurden. In Tab. 4–4 sind die beobachteten Schwingungen und deren Frequenzen zusammengefasst (Kim et al., 1998).

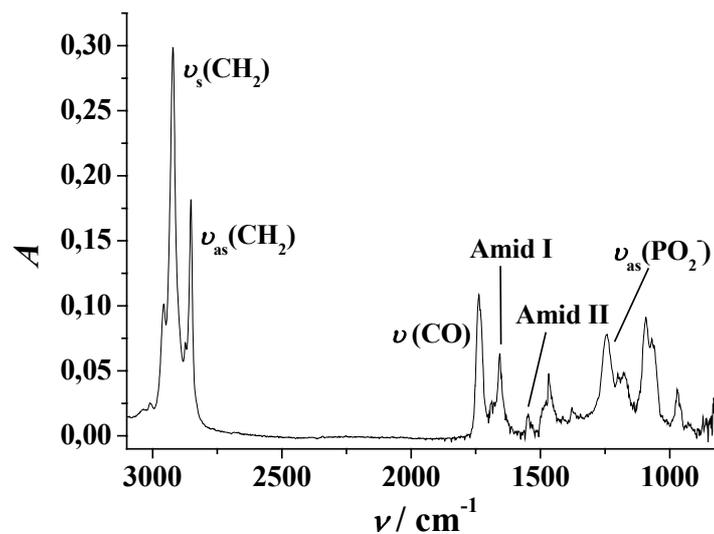


Abb. 4–33: ATR-FT-IR-Spektrum des Peptids TMH-1 in POPC-Multischichten aufgezeichnet mit parallel polarisiertem Licht.

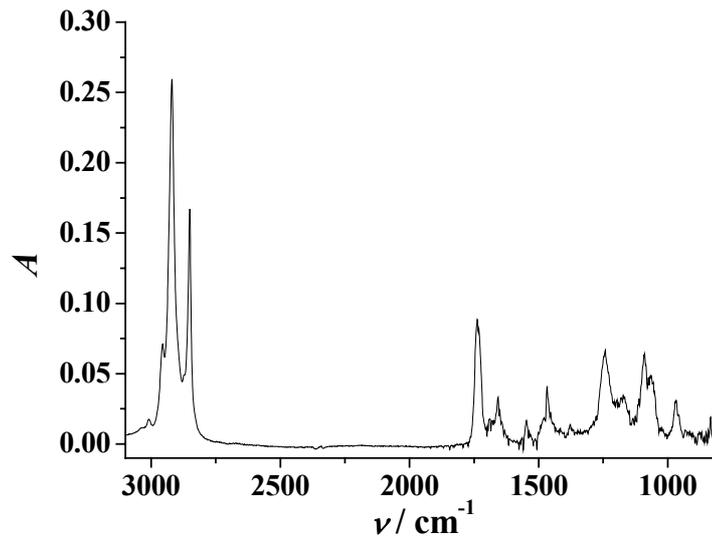


Abb. 4–34: ATR-FT-IR-Spektrum des Peptids TMH-1 in POPC-Multischichten aufgezeichnet mit senkrecht polarisiertem Licht.

Tab. 4–4: Zusammenfassung der relevanten IR-Schwingungen in einem Film von TMH-1 bzw. TMH-2 in luftgetrockneten POPC-Multischichten.

Frequenz ν/cm^{-1}	Bezeichnung	Schwingung
2922	$\nu_s(\text{CH}_2)$	symmetrische CH_2 -Streckschwingung der Kohlenwasserstoffketten der Lipide
2852	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	asymmetrische CH_2 -Streckschwingung der Kohlenwasserstoffketten der Lipide
1739	$\nu(\text{CO})$	CO-Streckschwingung der Fettsäureester der Lipide
1654	Amid I	CO-Streckschwingung der Amidbindung der Peptide
1539	Amid II	NH-Beugeschwingung und CN-Streckschwingung der Amidbindung
1245	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	asymmetrische Streckschwingung der PO_2^- -Doppelbindung der Lipide

Durch die α -helikale Sekundärstruktur und die räumliche Anordnung des Peptids in der Membran wird die Strahlung des senkrecht bzw. parallel polarisierten Lichts unterschiedlich stark absorbiert. Dies kann sehr gut anhand eines Vergleichs der Amid I- und der Amid II-Banden verdeutlicht werden, die für die beiden unterschiedlichen Polarisierungen erhalten wurden (Abb. 4–35) (Tamm and Tatulian, 1997).

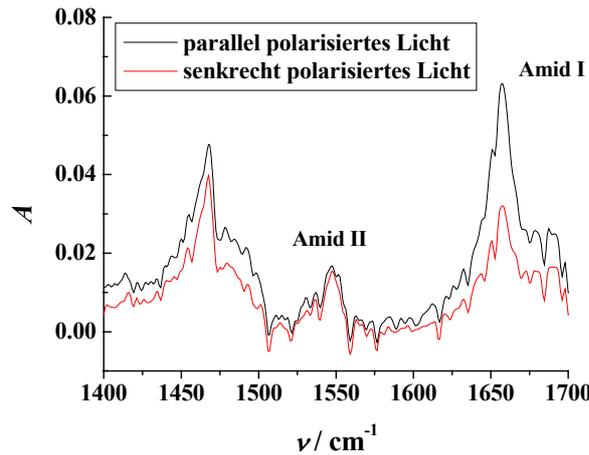


Abb. 4-35: Vergrößerte Ausschnitte der Amid I- und Amid II-Bande aus den ATR-FT-IR-Spektren des Peptids TMH-1 in POPC-Multischichten aufgezeichnet mit senkrecht (—) bzw. parallel (—) polarisiertem Licht.

Zur Auswertung der Daten wurden die beiden CH_2 -Streckschwingungen $\nu_s(\text{CH}_2)$ und $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, die CO-Streckschwingung $\nu(\text{CO})$ und die Amid I-Bande verwendet. Dabei dienten die drei Erstgenannten als Kontrolldaten für die literaturbekannte Orientierung von Lipidmolekülen auf dem Germanium-Kristall, wohingegen die Amid I-Bande für die Berechnung der räumlichen Anordnung der Peptide bezogen auf die Membrannormale verwendet wurde. Die Amid II-Bande wurde aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht berücksichtigt.

4.2.5.2 Bestimmung der räumlichen Orientierung der Peptide in der Membran

Zur Untersuchung der räumlichen Anordnung der Peptide in den Multischichten wurde die Fläche der Absorptionsbanden der drei relevanten Schwingungen, die jeweils mit senkrecht und parallel polarisiertem Licht erhalten wurden, über Integration bestimmt. Mit Hilfe der Flächen konnte anschließend das dichroitische Verhältnis R_{ATR} (Gl. 3-25) berechnet werden. Über die Gl. 3-26, Gl. 3-27, Gl. 3-28, Gl. 3-29 und Gl. 3-30 war es möglich den Ordnungsparameter S_0 und den Winkel γ zu ermitteln, der den Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Molekülachse des Peptids bzw. der Lipide beschreibt und somit eine Aussage über die Orientierung der Moleküle zulässt. Für die Berechnung wurde der Winkel α zwischen der Molekülachse und dem Übergangsdipolmoment der Schwingung benötigt. Hierfür wurden literaturbekannte Werte verwendet, die in Tab. 4-5

zusammengefasst sind (Frey and Tamm, 1991; Fringeli and Günthard, 1981; Tamm and Tatulian, 1997).

Tab. 4-5: Für die Auswertung verwendete Werte des Winkels α .

	α
CH ₂	90°
CO	90°
Amid I	39°

Tab. 4-6 und Tab. 4-7 zeigen die zusammengefassten Ergebnisse der ATR-FT-IR-Analysen für die Peptide TMH-1 und TMH-2, die zum einen für Proben erhalten wurden, bei denen die Peptide nachträglich in die Vesikel insertiert wurden (Index a) und zum anderen für Proben, bei denen die Peptide bereits vor der Präparation der Vesikel in Form von gemischten Lipid-Peptidfilmen (Index b) enthalten waren.

Tab. 4-6: Zusammengefasste Ergebnisse der ATR-FT-IR-Messungen an TMH-1. Die Peptide wurden zum einen nachträglich in die Vesikel insertiert (Index a) und zum anderen vor der Vesikelpräparation in Form von gemischten Lipid-Peptidfilmen in die Lipidmultischichten eingebracht (Index b).

	R_{ATR}^a	S_{θ}^a	$\gamma^a / ^\circ$	R_{ATR}^b	S_{θ}^b	$\gamma^b / ^\circ$
CH ₂	1.19 ± 0.04	0.62 - 0.04 + 0.04	30.4 + 1.7 - 1.8	1.17 ± 0.04	0.64 - 0.04 + 0.04	29.5 + 1.8 - 1.9
CO	1.19 ± 0.02	0.62 - 0.02 + 0.02	30.4 + 0.9 - 0.9	1.21 ± 0.02	0.60 - 0.02 + 0.02	31.3 + 0.8 - 0.9
Amid I	1.96 ± 0.05	- 0.04 + 0.14 - 0.05	56.4 - 2.1 + 2.3	1.95 ± 0.05	- 0.05 + 0.05 - 0.05	56.9 - 2.2 + 2.2

Tab. 4–7: Zusammengefasste Ergebnisse der ATR-FT-IR-Messungen an TMH-2. Die Peptide wurden zum einen nachträglich in die Vesikel inseriert (Index a) und zum anderen vor der Vesikelpräparation in Form von gemischten Lipid-Peptidfilmen in die Lipidmultischichten eingebracht (Index b).

	$R_{\text{ATR}}^{\text{a}}$	S_{θ}^{a}	$\gamma^{\text{a}} / ^{\circ}$	$R_{\text{ATR}}^{\text{b}}$	S_{θ}^{b}	$\gamma^{\text{b}} / ^{\circ}$
CH ₂	1.20 ± 0.03	0.61 - 0.03 + 0.03	30.8 + 1.3 - 1.3	1.21 ± 0.04	0.60 - 0.04 + 0.04	31.2 + 1.7 - 1.7
CO	1.22 ± 0.02	0.59 - 0.02 + 0.02	31.7 + 0.8 - 0.9	1.22 ± 0.02	0.59 - 0.02 + 0.02	31.7 + 0.8 - 0.9
Amid I	1.78 ± 0.06	- 0.24 + 0.07 - 0.07	65.4 - 3.3 + 3.9	1.87 ± 0.05	- 0.14 + 0.05 - 0.06	60.6 - 2.4 + 2.6

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die ATR-Messungen für beide Arten der Probenpräparationen nahezu keinen Unterschied in den Ergebnissen für das jeweilige Peptid zeigten. Für die CH₂-Streckschwingungen der Lipide ergaben sich für die verschiedenen Messungen im Mittel Werte von 30° und für die CO-Streckschwingung Werte von 31° für den Winkel γ . D.h. die Molekülachse der Lipide war nicht senkrecht zur Kristalloberfläche orientiert ($\gamma = 0$), sondern nahm eine leicht geneigte Anordnung ein. Die Amid I-Bande ergab im Mittel Winkel von 57° für das TMH-1 und 63° für das TMH-2. Diese Ergebnisse liegen im Rahmen der Messgenauigkeit im Bereich des *magic angle* von 54.7° (Frey and Tamm, 1991). Dieser Winkel gibt vor, dass die Peptide eine Zufallsorientierung in der Lipiddoppelschicht und somit alle möglichen Winkeleinstellungen einnehmen.

4.2.6 Diskussion

Ziel der Untersuchungen war es die Interaktion der Peptide TMH-1, TMH-2, TMF-1 und TMF-2 mit Lipidvesikeln zu analysieren.

Die Experimente zum Verhalten der Tryptophan-Fluoreszenz zeigen, dass TMH-1 sowohl für eine nachträgliche Insertion des Peptids in POPC-Vesikel als auch für ein Einbringen der Peptide in die Lipidfilme ohne vorherige Vesikelpräparation in Lipiddoppelschichten inseriert. Dies kann aufgrund der beobachteten Zunahme der Fluoreszenzintensität und der Blauverschiebung der Fluoreszenz (hypsochromer Effekt) mit steigendem Lipid-zu-Peptidverhältnis gefolgert werden. In der Literatur finden sich Beispiele für Moleküle, die ein ähnliches Verhalten zeigen. Surewicz et

al. konnten eine Verschiebung des Intensitätsmaximums in den kurzwelligen Spektralbereich und einen Anstieg in der Fluoreszenzquantenausbeute für eine Insertion von Pentagastrin in DMPC-Vesikel beobachten (Cowgill, 1967; Surewicz and Epan, 1984). Ähnliches gilt für das Verhalten der Tryptophan-Fluoreszenz des 21 Aminosäuren umfassenden N-terminalen α -helikalen Teilstücks des Flock House Virus, wenn dieses mit POPC-Vesikeln titriert wird (Bong et al., 2000).

Für TMH-2 kann nur dann eine Erhöhung der Intensität und eine Verschiebung des Maximums in den kurzwelligen Spektralbereich beobachtet werden, wenn die Peptide vor der Präparation der Vesikel in die Lipidfilme inseriert werden. Der Grund für das Scheitern der nachträglichen Insertion von TMH-2 in POPC-Vesikel könnte im höheren Aggregationszustand und in der höheren Hydrophobizität des Peptids im Vergleich zum TMH-1 liegen. Die Untersuchungen mittels der CD-Spektroskopie zeigen, dass sowohl TMH-1 als auch TMH-2 in wässriger Lösung, anders als erwartet, nicht als Zufallsknäuel vorliegen, sondern α -helikale Sekundärstrukturen aufweisen. Nach Wimley et al. zeigen hydrophobe Peptide in wässriger Lösung häufig eine Tendenz zur Ausbildung von Oligomeren, wobei zwei oder mehr α -Helizes miteinander aggregieren und ein steigender α -helikaler Gehalt mit zunehmender Peptidkonzentration in den CD-Spektren beobachtet werden kann. Auf diesem Weg können die Moleküle ihre hydrophobe Oberfläche reduzieren und gleichzeitig die Wasserlöslichkeit erhöhen (Wimley and White, 2000). Ein weiteres Beispiel für die Ausbildung von Aggregaten in wässriger Lösung zur Minimierung der dem Wasser zugänglichen Oberfläche und um ein Ausfallen des Moleküls zu verhindern, ist das Melittin, das α -helikale Tetramere in konzentrierten Lösungen ausbildet (Terwilliger and Eisenberg, 1982). Parker et al. beobachteten eine Oligomerisierung von Colicin A in wässriger Lösung, wobei die hydrophoben Helizes, die normalerweise im Inneren von Lipiddoppelschichten vorliegen, durch Aggregation mit hydrophileren Helizes gegen das polare Lösungsmittel abgeschirmt werden (Parker et al., 1992). Gibt man nun Vesikel zu einer wässrigen Lösung von TMH-1 und TMH-2, die in Form von Aggregaten vorliegen, hängt eine mögliche Insertion von der freien Energie ab. Je nachdem, ob die Assoziation der Peptide mit der Membran oder eine Ausbildung von Oligomeren in der wässrigen Phase begünstigt ist, findet eine Insertion in die Lipiddoppelschicht statt oder nicht (Wimley and White, 2000). Da TMH-2 eine höhere Hydrophobizität aufweist als

TMH-1, nimmt die Tendenz des Peptids, Aggregate in wässriger Lösung auszubilden, zu. Diese Aussage wird durch die Intensitätsmaxima der Tryptophan-Fluoreszenz der beiden Peptide in wässriger Lösung bestätigt. Während das λ_{\max} von 356 nm im Falle des TMH-1 für eine Lokalisierung des Tryptophan-Rests in einer polaren wässrigen Umgebung spricht, weist das Intensitätsmaximum von 351 nm im Falle des TMH-2 auf eine etwas hydrophobere Umgebung hin. Dies könnte durch die Ausbildung von Aggregaten der Peptide gewährleistet werden, die den Tryptophan-Rest zumindest teilweise vom polaren Lösungsmittel abschirmen. D.h. anders als für das TMH-1 ist der Beitrag zur freien Energie des Peptids, der bei einer Insertion in die Membran erhalten wird, zu gering verglichen mit dem Energiegewinn durch die Ausbildung von Oligomeren in der wässrigen Phase. Durch Einbau der Peptide in Lipidfilme und anschließende Vesikelpräparation kann dieses Problem umgangen werden, da die Peptide bereits beim Quellen der Filme inseriert in den Lipidmultischichten vorliegen. Dies liefert gleichzeitig die Erklärung, warum für die beiden verschiedenen Präparationsmethoden unterschiedliche Kurvenverläufe der Fluoreszenzintensität und der Änderung der Wellenlänge des Fluoreszenzintensitätsmaximums $\Delta\lambda_{\max}$ in An- und in Abwesenheit von Lipid in Abhängigkeit vom Lipid-zu-Peptidverhältnis beobachtet werden. Im Falle der nachträglichen Insertion der TMH-1-Moleküle in die Lipiddoppelschicht spiegelt der sigmoide Kurvenverlauf die anfängliche Konkurrenzreaktion zwischen den Peptidaggregaten in der wässrigen Phase und der Insertion von monomeren Peptiden in die hydrophobe Umgebung der Lipiddoppelschicht wider (Abb. 4–36).

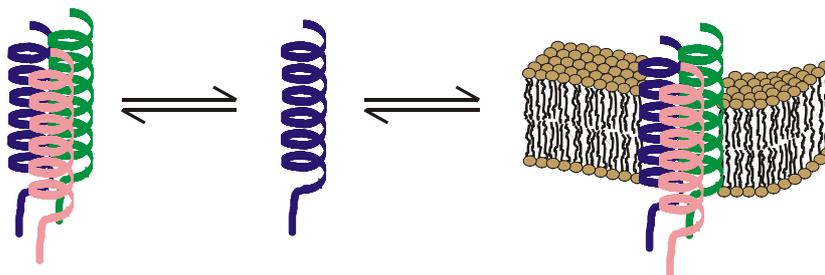


Abb. 4–36: Darstellung des Insertionsgleichgewichts. Die Peptide bilden in der wässrigen Phase Aggregate aus, die bei Zugabe von Vesikeln im Gleichgewicht mit den monomeren Peptiden stehen, die in der Lage sind in die Lipiddoppelschicht zu inserieren.

Je mehr Lipid zugegeben wird, desto weiter verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der Lipidphase, wobei nach wie vor ein bestimmter Anteil an Peptid in Form von Aggregaten in der wässrigen Phase verbleibt. Diese Tatsache wird durch

die anschließenden FRET-Messungen zur Aggregation der Peptide bestätigt (Kap. 4.3). Im Falle des TMH-2 wird, wie schon zuvor erwähnt, aufgrund der höheren Hydrophobizität des Peptids mehr freie Energie gewonnen, wenn die Moleküle in der wässrigen Lösung oligomerisieren, als bei einem Übergang der Peptide in die Membran. Der lineare Anstieg der Fluoreszenzintensität und der Verschiebung des Maximums in den kürzerwelligen Spektralbereich, der bei kleinen Lipid-zu-Peptidverhältnissen auftritt, wenn die Peptide vor der Vesikelpräparation in die Lipidfilme eingebaut werden, zeigt, dass sich die Tryptophan-Reste bereits vor der Präparation der unilamellaren Vesikel im hydrophoben Bereich der Lipiddoppelschicht aufhalten. Nach der Extrusion der Vesikel findet keine erneute Gleichgewichtseinstellung mehr statt, da die Peptide sich bereits in einem thermodynamisch günstigen Zustand befinden.

Des Weiteren kann gezeigt werden, dass TMH-1 bei Raumtemperatur nicht in der Lage ist in DPPC-Vesikel zu insertieren. Die Lipiddoppelschicht befindet sich, aufgrund der Phasenumwandlungstemperatur von reinem DPPC von 41 °C, in der Gelphase (www.avantilipids.com). Aufgrund der starren Membran können die Peptide nicht in die Lipiddoppelschicht insertieren, wodurch weder ein Anstieg der Fluoreszenzintensität, noch eine Änderung in der Wellenlänge des Intensitätsmaximums beobachtet werden kann.

Ein etwas anderes Bild zeigen die Ergebnisse der Insertionsmessungen zu TMF-1 und TMF-2. Erwartungsgemäß kann für beide Peptide ein Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmendem Lipid-zu-Peptidverhältnis beobachtet werden, der auf eine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute schließen lässt. Gleichzeitig wird aber, statt des erwarteten hypsochromen Effekts, eine rotverschobene Fluoreszenz mit steigendem Lipid-zu-Peptidverhältnis gemessen. Aufgrund der hohen Hydrophobizität der Peptide (Bilgicer et al., 2001a) und der sehr starken Wasserstoff-Fluor-Wechselwirkungen wird vermutet, dass die fluorinierten Peptide insbesondere bei kleinen Lipid-zu-Peptidverhältnissen tendenziell größere Aggregate ausbilden als TMH-1 und TMH-2. Die Untersuchung der Umgebung der Tryptophan-Reste innerhalb dieser Aggregate erfolgte mit Hilfe von Löschexperimenten. Die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität des Tryptophans mit steigender Quencherkonzentration für die beiden fluorinierten Peptide zeigt für beide DOXYL-stearinsäuren lediglich einen leichten Anstieg des

Intensitätsverhältnisses I^0/I , der in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die Löschung der Fluoreszenz der beiden nicht fluorinierten Peptide durch die 16-DOXYL-stearinsäure. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Tryptophan-Reste des TMF-1 und des TMF-2 im Gleichgewichtszustand bei einem Lipid-zu-Peptidverhältnis von 600:1 nur geringfügig gelöscht werden, da diese sich in das Innere der Peptidaggregate orientieren. Durch die Abschirmung der Fluorophore sind die Nitrosylradikale nicht in der Lage mit ihnen in Wechselwirkung zu treten. Aus der Literatur ist bekannt, dass dieses Phänomen häufig bei Proteinen (Flowers et al., 2003; Naeem et al., 2004; Qi and Grabowski, 1998), aber auch bei kleineren Peptiden (Kayser et al., 2004) auftritt, deren Tryptophan-Reste an unzugänglichen Stellen im Inneren von Aggregaten oder der entsprechenden Tertiärstruktur von Proteinen lokalisiert sind. Ein typisches Beispiel hierfür wird von Flowers et al. gegeben, die beschreiben, dass der Tryptophan-Rest in Position 48 der DnaB Helikase von *E. coli* im Inneren der Tertiärstruktur des Proteins lokalisiert ist, wodurch ein Löschen der Fluoreszenz verhindert wird (Flowers et al., 2003). Qi et al. konnten zeigen, dass die Tryptophan-Fluoreszenz in der β -Glucosidase durch DOXYL-palmitinsäuren mit Nitrosylradikalen in unterschiedlichen Positionen aufgrund der Orientierung der Fluorophore ins Innere der Tertiärstruktur nur geringfügig herabgesetzt werden konnte, wenn die Proteine in Ei-PC inseriert vorlagen (Qi and Grabowski, 1998). Neben der Orientierung der Tryptophan-Reste, kann mit Hilfe der Löschemperimente darüber hinaus eine Aussage über die Polarität der Umgebung der Fluorophore, die im Inneren der Peptidoligomere lokalisiert sind, getroffen werden. Ercelen et al. beobachteten für die Penicillin Acylase eine Änderung des Fluoreszenzmaximums mit steigender Quencherkonzentration und stellten fest, dass demnach die verschiedenen Tryptophan-Reste des Proteins, die sich innerhalb der Lipiddoppelschicht aufhalten, in unterschiedlichen Umgebungen lokalisiert sind (Ercelen et al., 2001). Dies resultiert aus der Tatsache, dass Reste, die sich an der Membran zugewandten Seite befinden, wie schon zuvor angesprochen, in deutlich höherem Maße gelöscht werden können, als diejenigen, die in das Innere der Peptidaggregate orientiert sind. Liegen demnach Aggregate in der Membran vor, die in Umgebungen unterschiedlicher Polarität orientiert sind, dann ergibt sich das Emissionsspektrum als Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenz-Spektren und das Intensitätsmaximum als ein gemittelter Wert über alle Reste. Wird nun ein

Löschermolekül zugegeben, so wird zunächst die Fluoreszenz der Tryptophan-Reste herabgesetzt, die sich an der leichter zugänglichen Außenseite der Aggregate befinden und es resultiert eine Verschiebung des Intensitätsmaximums. Je nachdem, ob sich die Fluorophore verglichen mit der Lipiddoppelschicht im Inneren der Aggregate in einer polarerer oder in einer hydrophoberen Umgebung befinden, kann eine Rot- oder eine Blauverschiebung der Fluoreszenz beobachtet werden (Ercelen et al., 2001). Daher resultiert aus der Verschiebung des Intensitätsmaximums zu größeren Wellenlängen, die für die Peptide TMF-1 und TMF-2 gemessen wird, dass sich die Tryptophan-Reste verglichen mit der Lipiddoppelschicht im Inneren der Peptidoligomere in einer polarerer Umgebung aufhalten müssen. Aufgrund dieser Tatsache und einem λ_{max} von 333 nm (TMF-1) bzw. 335 nm (TMF-2) bei einem Lipid-zu-Peptidverhältnis von 20:1 ist zu erwarten, dass die fluorinierten Peptide selbst bei geringen POPC-Konzentrationen bereits vollständig in die Membran inseriert sind. Es wird vermutet, dass zunächst sehr große Oligomere ausgebildet werden, die nicht dem Zustand eines Monomer-Trimer-Gleichgewichts (TMF-1) bzw. eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts (TMF-2) entsprechen (Dimer- bzw. Trimerbildung, vgl. Kap. 4.3). Die großen Aggregate weisen Tryptophan-Reste auf, die sich sowohl in den Bereich der hydrophoben Lipiddoppelschicht als auch ins Innere der Aggregate orientieren. Bei kontinuierlicher Erhöhung der Lipidkonzentration stellt sich schließlich ein Monomer-Trimer- bzw. Monomer-Dimer-Gleichgewicht ein, bei dem die Tryptophan-Reste im hydrophileren, inneren Bereich der Oligomere lokalisiert sind, wodurch die Wellenlänge des Intensitätsmaximums ansteigt.

Mit Hilfe der Reversibilitätsmessungen kann für die nicht fluorinierten Peptide für beide Methoden der Probenpräparation gezeigt werden, dass die Insertion der Peptide in die Lipiddoppelschicht vollständig reversibel verläuft. D.h. die Peptide befinden sich in einem ständigen Gleichgewicht zwischen der wässrigen und der Lipidphase. Ganz ähnliche Ergebnisse konnten von Wimley et al. erhalten werden. Die Gruppe untersuchte die Insertion des α -helikalen Transmembranpeptids TMX-1 in Lipidvesikel. Während bei der Verwendung von POPC-Vesikeln eine vollständig reversible Insertion beobachtet wurde, war das Peptid nach Insertion in POPG-Vesikel nicht in der Lage die Membran zu verlassen (Wimley and White, 2000).

Der Grund für die unterschiedliche Dauer bis zur Einstellung eines Gleichgewichtszustands, der für die beiden verschiedenen Arten der Probenpräparation beobachtet wird, wurde im vorangegangenen Absatz bereits erläutert. Die Ausbildung von Peptidaggregaten in der wässrigen Phase bei einer nachträglichen Insertion der Peptide in die Lipiddoppelschicht verzögert die Gleichgewichtseinstellung.

Mittels der angesprochenen Quenchingexperimente sollte der Tryptophan-Rest der verschiedenen Peptide innerhalb der Lipiddoppelschicht lokalisiert werden. Sowohl für das TMH-1 als auch für das TMH-2 kann berechnet werden, dass die Tryptophan-Reste mit einem Abstand von 1.5 nm (TMH-1) bzw. 1.9 nm (TMH-2) zum Zentrum der Membran im Bereich der polaren Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht lokalisiert sind (Janshoff and Steinem, 2000). Die Ergebnisse der Quenchingexperimente können allerdings keine Aussage über die genaue räumliche Orientierung der gesamten Peptidhelix in der Membran liefern. Um zu untersuchen, welche Orientierung die Peptide in der Lipiddoppelschicht einnehmen, müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

Darüber hinaus ist es jedoch möglich, wie bereits zuvor beschrieben, mit Hilfe der Quenchingexperimente die Umgebung der Tryptophan-Reste, die im Inneren der Peptidoligomere lokalisiert sind, zu untersuchen. Da die Fluoreszenz der Fluorophore, die an der für die Nitrosylradikale besser zugänglichen Membranseite orientiert sind, stärker herabgesetzt wird, als die Intensität der Tryptophan-Reste, die im Inneren der Oligomere lokalisiert sind, kommt es zu einer Verschiebung des Maximums mit steigender Quencherkonzentration (Ercelen et al., 2001; Flowers et al., 2003; Qi and Grabowski, 1998). Aus der Blauverschiebung der Fluoreszenz, die für die Peptide TMH-1 und TMH-2 gemessen wird, kann gefolgert werden, dass sich die Tryptophan-Reste verglichen mit der Lipiddoppelschicht im Inneren der Peptidoligomere in einer hydrophoberen Umgebung aufhalten müssen. Die Ergebnisse der fluorinierten Peptide weisen hingegen eine Rotverschiebung des Maximums mit steigender Quencherkonzentration auf, die für eine hydrophilere Umgebung im Inneren der Oligomere spricht.

Die Fluoreszenzintensität der Tryptophan-Reste der beiden fluorinierten Peptide zeigt mit steigender Quencherkonzentration, wie bereits angesprochen, nur einen

leichten Anstieg des Intensitätsverhältnisses I^0/I , da diese sich ins Innere der Peptidaggregate orientieren (Flowers et al., 2003; Kayser et al., 2004; Naeem et al., 2004; Qi and Grabowski, 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse ist keine weitere Auswertung der Daten mittels der *parallax*-Methode möglich. Somit kann mit Hilfe der Quenchingexperimente keine Aussage über den Abstand des Tryptophan-Rests der Peptide TMF-1 und TMF-2 zum Zentrum der Lipiddoppelschicht gemacht werden.

Die Untersuchungen mittels der CD-Spektroskopie haben gezeigt, dass die beiden nicht fluorinierten Peptide TMH-1 mit 67 % und TMH-2 mit 42 % einen hohen α -helikalen Gehalt innerhalb ihrer Sekundärstruktur aufweisen, wenn die Peptide in Lipiddoppelschichten insertieren. Damit zeigen die Peptide die erforderlichen Eigenschaften, um in Membranen *coiled coil*-Strukturen auszubilden (Stryer, 1996). Die Zunahme der Helizitäten auf 80 % für das TMH-1 bzw. 70 % im Falle des TMH-2 in TFE im Gegensatz zu den gefundenen Werten in POPC, lassen sich auf die helixstabilisierende Wirkung des fluorierten Lösungsmittels zurückführen (Luo and Baldwin, 1997; Sönnichsen, 1992). Ein höherer α -helikaler Gehalt in TFE ist aufgrund der fünf positiv geladenen Lysinreste am C-terminalen Ende der Peptide nicht möglich. Die Ergebnisse stimmen gut mit theoretischen Berechnungen überein, die mit Hilfe eines Programms für die Vorhersage von Sekundärstrukturen von Peptiden durchgeführt wurden (www.cmpfarm.ucsf.edu/cgi-bin/nnpredict.pl). Hierbei wurden Helizitäten von 76 % für das TMH-1 und 79 % für TMH-2 erhalten. In Wasser deuten die CD-Spektren, anders als erwartet, auf kein reines Zufallsknäuel hin, sondern weisen einen deutlichen α -helikalen Gehalt auf (51 % für das TMH-1). In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für Peptide oder Proteine, die in wässriger Lösung zunächst ein Zufallsknäuel bilden und durch anschließende Insertion in Membranen in eine α -helikale Sekundärstruktur übergehen. Melittin weist in verdünnten wässrigen Lösungen die Sekundärstruktur eines Zufallsknäuels auf, die bei Zugabe von neutralen Phospholipiden zu einer Helix mit einem α -helikalen Gehalt von 80 % umgewandelt wird (Seelig, 2004). Auch die cytoplasmatische helikale Domäne des Rhodopsins oder das Peptid PGLa, das zur Familie des Magainin gehört, zeigen einen Wechsel von einem Zufallsknäuel zu einer Sekundärstruktur mit hohem α -helikalem Gehalt, wenn die Moleküle von

einem wässrigen Medium in den hydrophoben Bereich einer Membran übergehen (Choi et al., 2002; Wieprecht et al., 2000). Die Tatsache, dass die Peptide TMH-1 und TMH-2 bereits in wässriger Lösung α -helikale Sekundärstrukturen ausbilden, kann darauf zurückgeführt werden, dass die Peptide aufgrund der hohen Hydrophobizität zur Stabilisierung der Moleküle Aggregate ausbilden (Wimley and White, 2000). Für TMH-2 in Wasser wird auf eine Berechnung des α -helikalen Gehalts verzichtet, da die Konzentration der monomer vorliegenden Peptide nicht genau genug bestimmt werden konnte. Hierfür musste die Peptidlösung 1:1 mit Guanidiniumchlorid (GndHCl) verdünnt werden, um die Peptidoligomere in Monomere zu überführen. Aufgrund der Hydrophobizität des TMH-2 kommt es bei diesem Vorgang jedoch zu einer sofortigen Ausfällung des Peptids.

Die Ergebnisse der ATR-FT-IR-Aufnahmen liefern gemittelt über die Messungen für die Lipide dichroitische Verhältnisse von 1.19 ± 0.02 für die CH_2 -Schwingung und 1.21 ± 0.02 für die CO-Schwingung. Der Ordnungsparameter weist Werte von 0.62 ± 0.02 für die CH_2 -Schwingung und 0.60 ± 0.02 für die CO-Schwingung auf. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Daten aus der Literatur überein. Kim et al. haben gezeigt, dass getrocknete DMPC-Multischichten mit insertierten Peptiden dichroitische Verhältnisse von 1.10 ± 0.02 für die symmetrische CH_2 -Schwingung, 1.15 ± 0.02 für die asymmetrische CH_2 -Schwingung und 1.51 ± 0.03 für die CO-Schwingung aufweisen. Dies entspricht im Mittel einer Neigung der Lipidmoleküle bezogen auf die Oberflächennormalen von 32° (Kim et al., 1998). Dieser Wert korreliert sehr gut mit früheren Studien, die Winkel zwischen 20 und 30° für Multischichten von Phospholipiden postulieren (Akutsu et al., 1981; Janiak et al., 1976; Nabedryk et al., 1982; Okamura et al., 1986) und dem in dieser Arbeit bestimmten mittleren Winkel von 31° für die POPC-Multischichten. Tatulian et al. berechneten ein dichroitisches Verhältnis von 1.25 ± 0.02 und einen Ordnungsparameter von 0.45 ± 0.02 für vollständig hydratisierte DMPC-Doppelschichten (Tatulian et al., 1995). Auch diese Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Daten, die in dieser Arbeit ermittelt wurden.

Die Untersuchung der räumlichen Orientierung der Peptide TMH-1 und TMH-2 in POPC-Multischichten mittels der ATR-FT-IR-Spektroskopie hat gezeigt, dass die Peptide zwar in die Lipiddoppelschichten insertieren, aber keine senkrechte

Anordnung bezogen auf die Oberflächennormale einnehmen. Über die Auswertung der Amid I-Bande ergibt sich der Winkel γ anhand der verschiedenen Messungen mit $(56.7 \pm 0.3)^\circ$ für das TMH-1 und $(63.0 \pm 2.4)^\circ$ für das TMH-2. Dies entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit dem *magic angle* (Frey and Tamm, 1991). Demnach nehmen die Peptide eine Zufallsorientierung innerhalb der Membran ein. Möglicherweise könnten mit den gelabelten Peptiden, die für die anschließenden FRET-Messungen verwendet werden, stärkere Senkrechtorientierungen erreicht werden. Neben den positiv geladenen Lysin-Resten am C-terminalen Ende weisen diese Peptide Fluorophore am N-Terminus auf, die sich genau wie die Lysin-Reste außerhalb der Lipiddoppelschicht lokalisieren werden. Andere Peptide und Proteine, die in der Literatur diskutiert werden, zeigen definiere Orientierungen in Membranen. Torres et al. insertierten das pentamere Phospholamban in Lipidmembranen und berechneten aus den polarisierten Spektren einen Winkel von 32° bezogen auf die Membrannormale (Torres et al., 2000). Nach Ding et al. zeigen die α -helikalen Transmembrandomänen zwei und fünf des α -Faktor Pheromonrezeptors (Ste2p) Winkel von 34° bzw. 32° bezogen auf die Membrannormale, wenn sie in DMPC-Multilayer insertiert werden (Ding et al., 2001).

4.3 Kontrolle der Aggregation der Peptide durch die Einführung fluorinierter Seitenketten

4.3.1 Theoretische Betrachtung der FRET-Experimente

Zur Auswertung der FRET-Messungen wurde eine theoretische Betrachtung der Experimente vorgenommen. Es ist möglich über den Zusammenhang zwischen der Anzahl an NBD gelabelten Peptiden, die gelöscht wurden und dem Verhältnis von NBD zu TAMRA gelabelten Peptiden eine Aussage über die Anzahl der Moleküle zu machen, aus denen ein Peptidoligomer aufgebaut ist (Adair and Engelman, 1994). Das entsprechende Modell beinhaltet eine Reihe von Annahmen: (1) Die Aggregation der Moleküle wird durch das Labeln der Peptide nicht beeinflusst. (2) Alle Peptide sind innerhalb der Lipiddoppelschicht lokalisiert. (3) Die Wechselwirkungen zwischen den Peptiden erfolgen zufällig.

Die gemessene Fluoreszenz I in Anwesenheit von Akzeptor ist definiert als:

$$I = f_D(N_D - N_Q) + f_Q N_Q. \quad \text{Gl. 4-1}$$

Die Fluoreszenz in Abwesenheit von Akzeptor I^0 ist gegeben durch:

$$I^0 = f_D N_D, \quad \text{Gl. 4-2}$$

wobei f_D die molare Fluoreszenz des nicht gelöschten Donors D und f_Q die molare Fluoreszenz des gelöschten Donors ist. N_D steht für die gesamte Stoffmenge an Donor und N_Q für die Stoffmenge an gelöschtem Donor. Die Energie Transfer-Effizienz E ist definiert als:

$$E = 1 - \frac{I}{I^0} = \left(1 - \frac{f_Q}{f_D}\right) \frac{N_Q}{N_D}. \quad \text{Gl. 4-3}$$

Um die Fluoreszenz eines Donormoleküls zu löschen, muss mindestens ein Akzeptormolekül an dem Oligomer beteiligt sein. Darüber hinaus ist ein Akzeptor in der Lage die Fluoreszenz aller Donoren im selben Oligomer zu löschen ($f_Q/f_D = 0$). Unter der Annahme einer zufälligen Anzahl von Donoren und Akzeptoren in den Aggregaten, können alle Oligomere mit beliebigen Donor- und Akzeptorkonzentrationen durch eine binominale Verteilungsfunktion zusammengefasst werden. Die Gesamtzahl an gelöschtem Donor ist somit gegeben als:

$$N_Q = \sum_{j=1}^{n-k} \sum_{k=1}^{n-1} k \frac{n!}{k! j! (n-k-j)!} \chi_D^k \chi_A^j \chi_u^{n-k-j}. \quad \text{Gl. 4-4}$$

Dabei steht n für die Anzahl an Peptiden im Oligomer, χ_D für den Molenbruch des Donors, χ_u für den Molenbruch an ungelabeltem Peptid und χ_A für den Molenbruch des Akzeptors. k zählt die Anzahl der Donoren mit Ausnahme für $k = 0$ (Oligomer enthält nur Akzeptoren und ungelabelte Peptide) und $k = n$ (Oligomer enthält nur Donoren). j zählt die Anzahl der Akzeptoren mit Ausnahme von $j = 0$ (Oligomer enthält nur Donoren und ungelabelte Peptide). In den Berechnungen wurde für den Donor ein Molenbruch χ_D von 0.5 verwendet, da in allen Proben sowohl die Konzentration an NBD gelabeltem Peptid als auch die Gesamtpeptidkonzentration durch Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant bei 2.75 μM bzw. 5.50 μM gehalten wurde. Die Gesamtzahl an nicht gelöschtem Donor ist gegeben als:

$$N_D = \sum_{j=0}^{n-k} \sum_{k=1}^n k \frac{n!}{k!j!(n-k-j)!} \chi_D^k \chi_A^j \chi_u^{n-k-j}. \quad \text{Gl. 4-5}$$

Mit Hilfe des Ausdrucks $\chi_A + \chi_D + \chi_u = 1$ und der Annahme eines Monomer-Oligomer-Gleichgewichts erhält man durch Kombination der Gl. 4-4 und Gl. 4-5 mit Gl. 4-3 im Falle eines Dimers folgenden Zusammenhang:

$$\frac{I}{I_0} = m + (1-m) \left(1 - \chi_D \frac{\chi_A}{\chi_D} \right). \quad \text{Gl. 4-6}$$

Dabei steht m für den Anteil der Moleküle in der monomeren Form und $(1-m)$ für den Teil der Moleküle, die an Oligomeren beteiligt sind. Der Ausdruck für eine Trimer ist gegeben als:

$$\frac{I}{I_0} = m + (1-m) \left(1 - \chi_D^2 \left(\left(\frac{2}{\chi_D} \right) \left(\frac{\chi_A}{\chi_D} \right) - \left(\frac{\chi_A}{\chi_D} \right)^2 \right) \right). \quad \text{Gl. 4-7}$$

Tetramere werden durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{I}{I_0} = m + (1-m) \left(1 - \chi_D^3 \left(12 \left(\frac{\chi_A}{\chi_D} \right) - 6 \left(\frac{\chi_A}{\chi_D} \right)^2 + \left(\frac{\chi_A}{\chi_D} \right)^3 \right) \right). \quad \text{Gl. 4-8}$$

Die Dissoziationskonstante K_D ist definiert als:

$$K_D = \frac{(mX_p)^n}{((1-m)X_p/n)}, \quad \text{Gl. 4-9}$$

wobei X_p für das Lipid-zu-Peptidverhältnis steht.

4.3.2 Untersuchung des Aggregationszustands der Peptide in Lipidvesikeln mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Mit Hilfe der FRET-Messungen sollte das Aggregationsverhalten der Peptide TMF-1 und TMF-2 mit dem der nicht fluorinierten Analoga verglichen werden. Durch die Einführung der fluorinierten Aminosäuren sollte die stabilisierende Wirkung von fluorinierten Seitenketten auf die Oligomerisierung der Peptide in Lipidvesikeln untersucht werden. Zur Bestimmung des Aggregationszustands der Peptide innerhalb der Lipiddoppelschicht wurden FRET-Messungen durchgeführt. Dabei wurden

TAMRA gelabelte Peptide als Akzeptoren und NBD gelabelte Peptide als Donoren verwendet. Durch Messung der Abnahme der Fluoreszenzintensität des Donors als Funktion der Akzeptorkonzentration während die Gesamtpeptidkonzentration durch Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant gehalten wurde, konnte der Aggregationszustand der Peptide in der Membran bestimmt werden (Adair and Engelman, 1994; Chung et al., 1992; Li et al., 1999; London and Khorana, 1982; Reddy et al., 1999). Die Abb. 4–38 – Abb. 4–41 zeigen das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit I und in Abwesenheit von TAMRA gelabelten Peptiden I^0 bei unterschiedlichen Lipid-zu-Peptidverhältnissen für die vier Peptide TMH-1, TMH-2, TMF-1 und TMF-2. Die Peptide wurden vor der Vesikelpräparation in Lipidfilme inseriert. Eine Assoziation der Peptide in der Membran resultiert in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität des NBD mit steigendem Molenbruch an TAMRA gelabelten Peptiden. Kein Energie Transfer wurde erwartet, wenn die Peptide monomer in der Membran vorliegen.

Ergebnisse der FRET-Messungen für das Peptid TMH-1.

In Abb. 4–37 sind exemplarisch für das Peptid TMH-1 die Fluoreszenzspektren dargestellt, die mit variierenden Mengen an TAMRA gelabeltem Peptid bei einem Lipid-zu-Peptidverhältnis von 600:1 erhalten wurden. Während die NBD-Fluoreszenz bei 535 nm mit steigender Konzentration an Akzeptor gelabeltem Peptid kontinuierlich abnahm, zeigte gleichzeitig die Fluoreszenz der TAMRA gelabelten Peptide bei 580 nm einen stetigen Anstieg der Intensität.

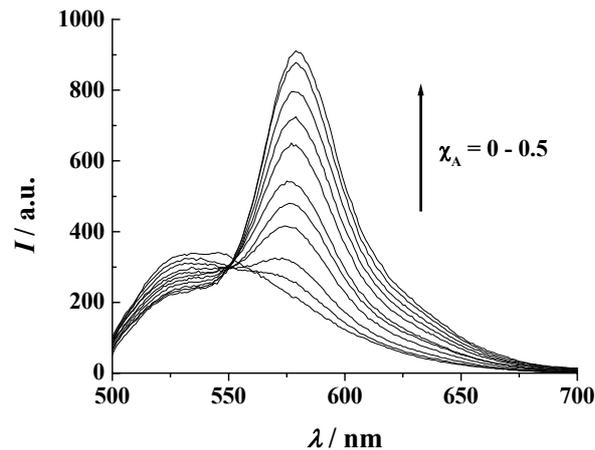


Abb. 4–37: Fluoreszenzspektren der NBD und TAMRA gelabelten Peptide aufgenommen bei einem Lipid-zu-Peptidverhältnis von 600:1. Die Konzentration an Donor gelabeltem Peptid betrug für alle Proben 2.75 μM , während der Molenbruch der Akzeptor gelabelten Peptide zwischen 0 und 0.5 variiert wurde. Die Gesamtkonzentration an Peptid wurde durch Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant gehalten.

Für die Auswertung wurde das Verhältnis der Intensitäten der Donorfluoreszenz in Anwesenheit I und in Abwesenheit von Akzeptor I^0 bestimmt und in Abhängigkeit vom Verhältnis der Molenbrüche des Akzeptors und des Donors aufgetragen.

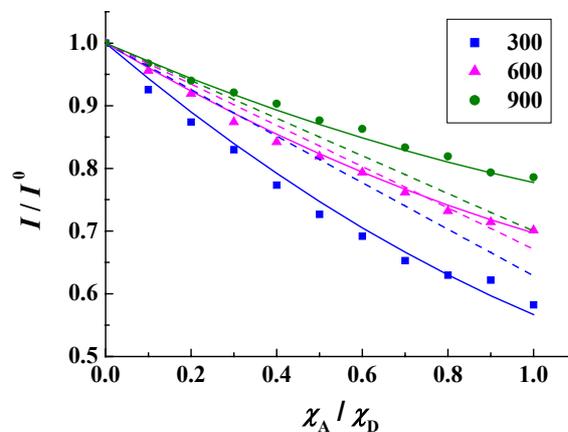


Abb. 4–38: Bestimmung des Aggregationszustands von TMH-1 in POPC-Vesikeln. Es wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit I und in Abwesenheit von Akzeptor I^0 aufgezeichnet, während die Gesamtpeptidkonzentration durch Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant gehalten wurde. Durch Variation der Lipidkonzentration wurden unterschiedliche Lipid-zu-Peptidverhältnisse eingestellt: (●) 1:900, (■) 1:600 und (▲) 1:300. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Anpassung basierend auf einem Monomer-Trimer-Gleichgewicht. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Ergebnis der Anpassung eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts.

Aufgrund der beobachteten Abnahme im Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I/I^0 mit steigendem Molenbruch an TAMRA gelabelten Peptiden, konnte eine nicht kovalente Assoziation der Peptide angenommen werden. Diese Tatsache wurde durch die Abnahme des Energie Transfers mit steigendem Lipid-zu-Peptidverhältnis bestätigt. Je höher die Lipidkonzentration gewählt wurde, umso geringer war die Tendenz der Peptide zur Ausbildung von Aggregaten. Anhand der Messungen waren verschiedene Größen der Oligomere denkbar, deren Auftreten mit Hilfe einer *global fit*-Analyse untersucht wurde. Dabei zeigten die gestrichelten Linien eine Anpassung unter der Annahme eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts, die relativ schlecht mit den Messdaten in Einklang zu bringen war. Eine deutlich höhere Übereinstimmung zwischen Modell- und Messdaten konnte mit Hilfe der Anpassung eines Monomer-Trimer-Gleichgewichts erhalten werden. Die Ergebnisse sind als durchgezogene Linien dargestellt (Abb. 4–38). Die Analyse liefert die Dissoziationskonstante K_D für das Oligomerisierungsmodell eines Trimers (Tab. 4–8). Neben der *global fit*-Analyse wurden die Messreihen für die verschiedenen Lipid-zu-Peptidverhältnisse einzeln mit den Fitroutinen angepasst, die Aggregaten in der Größe von Dimeren, Trimeren oder Tetrameren entsprachen. Auf diesem Weg wurden auch hier die Dissoziationskonstanten K_D und die entsprechenden Fehler berechnet (Tab. 4–8).

Tab. 4–8: Tabelle der K_D -Werte berechnet zum einen mit Hilfe einer *global fit*-Analyse und zum anderen durch Anpassung von einzelnen Fitroutinen an die Messkurven des jeweiligen Lipid-zu-Peptidverhältnisses für TMH-1.

	<i>global fit</i> -Analyse	Einzel-fit-Analyse
Dimer		$(6.8 \pm 7.0) \times 10^{-6} \text{ MF}$
Trimer	$4.3 \times 10^{-6} \text{ MF}^2$	$(4.4 \pm 0.3) \times 10^{-6} \text{ MF}^2$
Tetramer		$(1.5 \pm 0.9) \times 10^{-8} \text{ MF}^3$

Während die Fehler für die Annahme eines Monomer-Dimer- bzw. eines Monomer-Tetramer-Gleichgewichts sehr groß sind (100 % für das Dimer und 60 % für das Tetramer), zeigen die Daten im Falle des Monomer-Trimer-Gleichgewichts eine sehr gute Übereinstimmung und einen kleinen Fehler von 7 % bezogen auf die Dissoziationskonstante. Auf Basis dieser Auswertung wird ein Monomer-Trimer-Gleichgewicht favorisiert.

Ergebnisse der FRET-Messungen für das Peptid TMH-2.

Es wurden ebenfalls FRET-Messungen für das Peptid TMH-2 inseriert in POPC-Vesikel durchgeführt (Abb. 4–39).

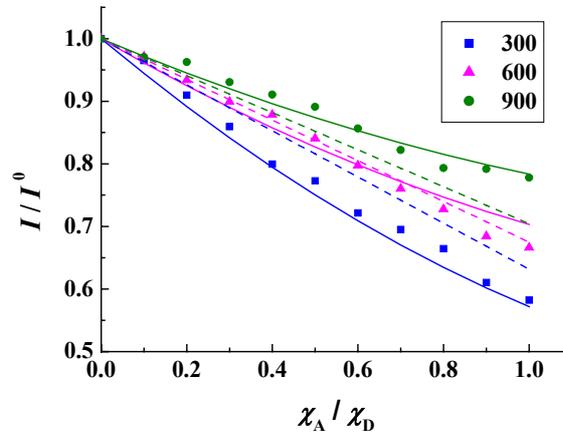


Abb. 4–39: Bestimmung des Aggregationszustands von TMH-2 in POPC-Vesikeln. Es wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit I und in Abwesenheit von Akzeptor I^0 aufgezeichnet, während die Gesamtpeptidkonzentration durch Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant gehalten wurde. Durch Variation der Lipidkonzentration wurden unterschiedliche Lipid-zu-Peptidverhältnisse eingestellt: (●) 1:900, (■) 1:600 und (▲) 1:300. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Anpassung basierend auf einem Monomer-Trimer-Gleichgewicht. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Ergebnis der Anpassung eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts.

Das Peptid TMH-2 zeigt dem TMH-1 ähnliche Ergebnisse. Es wurde eine Abnahme im Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I/I^0 mit steigendem Molenbruch an TAMRA gelabelten Peptiden beobachtet und eine Zunahme des Energie Transfers mit sinkendem Lipid-zu-Peptidverhältnis, wodurch auf eine nicht kovalente Assoziation der Peptide geschlossen wurde. Während der *global fit* unter Annahme eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts wiederum schlecht mit den Messdaten in Einklang gebracht werden konnte, zeigte die entsprechende Auswertung für ein Monomer-Trimer-Gleichgewicht eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der FRET-Messungen. Im Rahmen der Fehlerbetrachtung bestätigten die Fehler von 92 % für das Dimer und 83 % für das Tetramer verglichen mit einem Fehler von 23 % für die Ausbildung von Trimeren, die Annahme eines Monomer-Trimer-Gleichgewichts der Peptide innerhalb der Lipiddoppelschicht (Tab. 4–9).

Tab. 4–9: Tabelle der K_D -Werte berechnet zum einen mit Hilfe einer *global fit*-Analyse und zum anderen durch Anpassung von einzelnen Fitroutinen an die Messkurven des jeweiligen Lipid-zu-Peptidverhältnisses für TMH-2.

	<i>global fit</i> -Analyse	Einzelfit-Analyse
Dimer		$(6.6 \pm 6.1) \times 10^{-4} \text{ MF}$
Trimer	$4.61 \times 10^{-6} \text{ MF}^2$	$(4.8 \pm 1.1) \times 10^{-6} \text{ MF}^2$
Tetramer		$(1.8 \pm 1.5) \times 10^{-8} \text{ MF}^3$

Ergebnisse der FRET-Messungen für das Peptid TMF-1.

Analog den vorangegangenen Messungen lieferte der FRET für das Peptid TMF-1 eine Abnahme im Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I/I^0 mit steigendem Molenbruch an TAMRA gelabelten Peptiden und eine Zunahme des Energie Transfers mit sinkendem Lipid-zu-Peptidverhältnis und bestätigte die konzentrationsabhängige Ausbildung von Oligomeren in der Membran.

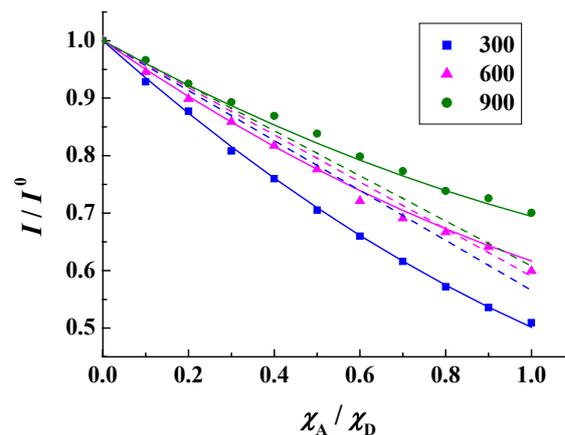


Abb. 4–40: Bestimmung des Aggregationszustands von TMF-1 in POPC-Vesikeln. Es wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit I und in Abwesenheit von Akzeptor I^0 aufgezeichnet, während die Gesamtpeptidkonzentration durch Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant gehalten wurde. Durch Variation der Lipidkonzentration wurden unterschiedliche Lipid-zu-Peptidverhältnisse eingestellt: (●) 1:900, (■) 1:600 und (▲) 1:300. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Anpassung basierend auf einem Monomer-Trimer-Gleichgewicht. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Ergebnis der Anpassung eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts.

Die *global fit*-Analyse zeigte, wie in den vorangegangenen Experimenten, eine gute Übereinstimmung unter Annahme eines Monomer-Trimer-Gleichgewichts und eine Kurvenanpassung für die Ausbildung von Dimeren, die schlecht mit den gemessenen Daten übereinstimmt. Die über den *global fit* berechnete Dissoziationskonstante und

die Fehlerbetrachtung für die Anpassung jeder einzelnen Kurve für die verschiedenen Lipid-zu-Peptidverhältnisse unter der Annahme der Ausbildung von Dimeren, Trimeren oder Tetrameren sind in Tab. 4–10 dargestellt. Aufgrund der Fehler (120 % für das Dimer, 69 % für das Tetramer und 11 % für das Trimer) konnte auch hier gefolgert werden, dass die beste Übereinstimmung zwischen Modell und Daten für ein Monomer-Trimer-Gleichgewicht erhalten werden.

Tab. 4–10: Tabelle der K_D -Werte berechnet zum einen mit Hilfe einer *global fit*-Analyse und zum anderen durch Anpassung von einzelnen Fitroutinen an die Messkurven des jeweiligen Lipid-zu-Peptidverhältnisses für TMF-1.

	<i>global fit</i> -Analyse	Einzel-fit-Analyse
Dimer		$(2.0 \pm 2.4) \times 10^{-4} \text{ MF}$
Trimer	$1.9 \times 10^{-6} \text{ MF}^2$	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-6} \text{ MF}^2$
Tetramer		$(7.2 \pm 5.0) \times 10^{-9} \text{ MF}^3$

Ergebnisse der FRET-Messungen für das Peptid TMF-2.

Die Messungen zeigten eine Abnahme im Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I/I^0 mit steigendem Molenbruch an TAMRA gelabelten Peptiden und eine Zunahme des Energie Transfers mit sinkendem Lipid-zu-Peptidverhältnis. Somit wurde auch für TMF-2 bestätigt, dass die Peptide nicht kovalent miteinander wechselwirken (Abb. 4–41).

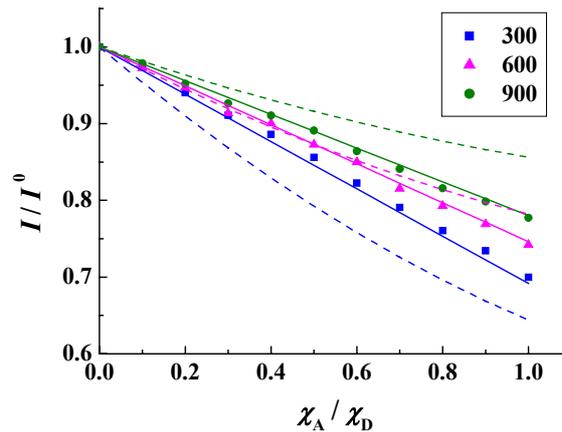


Abb. 4–41: Bestimmung des Aggregationszustands von TMF-2 in POPC-Vesikeln. Es wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit I und in Abwesenheit von Akzeptor I^0 aufgezeichnet, während die Gesamtpeptidkonzentration durch Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant gehalten wurde. Durch Variation der Lipidkonzentration wurden unterschiedliche Lipid-zu-Peptidverhältnisse eingestellt: (●) 1:900, (■) 1:600 und (▲) 1:300. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Anpassung basierend auf einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Ergebnis der Anpassung eines Monomer-Trimer-Gleichgewichts.

Die FRET-Messungen für das Peptid TMF-2 unterschieden sich von den bisher dargestellten Ergebnissen. Im Gegensatz zu den drei vorangegangenen Peptiden ergab die *global fit*-Analyse, anders als für eine Trimerbildung, eine gute Übereinstimmung der Messdaten unter der Annahme eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts. Gleichzeitig bestätigte auch die Einzelfit-Analyse mit einem Fehler von 13 % für ein Dimer verglichen mit 80 % im Falle eines Trimers bzw. 122 % für ein Tetramer ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht der Peptide innerhalb der Lipiddoppelschicht (Tab. 4–11).

Tab. 4–11: Tabelle der K_D -Werte berechnet zum einen mit Hilfe einer *global fit*-Analyse und zum anderen durch Anpassung von einzelnen Fitroutinen an die Messkurven des jeweiligen Lipid-zu-Peptidverhältnisses für TMF-2.

	<i>global fit</i> -Analyse	Einzelfit-Analyse
Dimer	$1.6 \times 10^{-3} \text{ MF}$	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ MF}$
Trimer		$(1.2 \pm 1.0) \times 10^{-5} \text{ MF}^2$
Tetramer		$(5.2 \pm 6.3) \times 10^{-8} \text{ MF}^3$

Ergebnisse der FRET-Messungen für das Peptid TMH-1 bei nachträglicher Insertion der Peptide in die Lipidvesikel.

Um zu untersuchen in wieweit die Aggregation der Peptide in POPC-Vesikeln durch die Art der Probenpräparation und somit durch die Art der Insertion der Peptide in die Lipiddoppelschicht beeinflusst wird, wurden für das TMH-1 neben den zuvor beschriebenen Messungen (Abb. 4–38) auch Experimente an Proben durchgeführt, bei denen die Peptide nachträglich in die Membran inseriert wurden. In Abb. 4–42 ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit I und in Abwesenheit von Akzeptor I^0 in Abhängigkeit vom Verhältnis der Molenbrüche des TAMRA und des NBD gelabelten Peptids dargestellt.

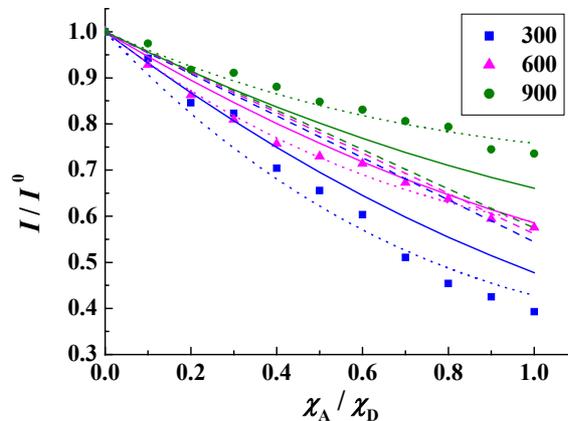


Abb. 4–42: Bestimmung des Aggregationszustands von TMH-1 in bei einer nachträglichen Insertion in POPC-Vesikeln. Es wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit I und in Abwesenheit von Akzeptor I^0 aufgezeichnet, während die Gesamtpeptidkonzentration durch Zugabe von ungelabeltem Peptid konstant gehalten wurde. Durch Variation der Lipidkonzentration wurden unterschiedliche Lipid-zu-Peptidverhältnisse eingestellt: (●) 1:900, (■) 1:600 und (▲) 1:300. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Anpassung basierend auf einem Monomer-Trimer-Gleichgewicht. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Ergebnis der Anpassung eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts und die gepunkteten Linien der Annahme eines Monomer-Tetramer-Gleichgewichts.

Vergleicht man den Verlauf von I/I^0 in Abhängigkeit vom Verhältnis der Molenbrüche von TAMRA gelabeltem TMH-1 und NBD gelabeltem TMH-1 für die verschiedenen Lipid-zu-Peptidverhältnisse der unterschiedlich hergestellten Proben, so konnten in beiden Fällen ähnliche Messverläufe beobachtet werden. Auch für eine nachträgliche Insertion der Peptide konnte durch die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten I/I^0 mit steigendem Molenbruch an TAMRA gelabelten

Peptiden und die Zunahme des Energie Transfers mit sinkendem Lipid-zu-Peptidverhältnis die konzentrationsabhängige Ausbildung von Oligomeren in der Membran bestätigt werden. Die Einzelfit-Analyse lieferte für alle drei postulierten Aggregationszustände relativ große Fehler. Mit Abweichungen von 91 % im Falle eines Dimers, 100 % für die Annahme eines Trimers und einer Abweichung von 34 % für ein Tetramer, ergaben die Ergebnisse die besten Übereinstimmungen für die Annahme eines Monomer-Tetramer-Gleichgewichts (Tab. 4–12).

Tab. 4–12: Tabelle der K_D -Werte berechnet durch Anpassung von einzelnen Fitroutinen an die Messkurven des jeweiligen Lipid-zu-Peptidverhältnisses für TMH-1 bei einer nachträglichen Insertion der Peptide in POPC-Vesikel.

	Einzelfit-Analyse
Dimer	$(4.4 \pm 4.0) \times 10^{-4} \text{ MF}$
Trimer	$(1.4 \pm 1.4) \times 10^{-6} \text{ MF}^2$
Tetramer	$(3.9 \pm 1.3) \times 10^{-9} \text{ MF}^3$

Ein Unterschied zwischen den Resultaten, die für die verschiedenen Probenpräparationen erhalten wurden, lag im Energie Transfer, der für die drei verschiedenen Lipid-zu-Peptidverhältnisse bei gleicher Konzentration an Donor und Akzeptor gelabeltem Peptid erhalten wurde ($\chi_A/\chi_D = 1$). Insgesamt nahm der Energie Transfer bei einer nachträglichen Insertion der Peptide in die Vesikel für die unterschiedlichen Zusammensetzungen zu. Während bei der Filmpräparation Werte von 0.74 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 900:1$), 0.58 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 600:1$) und 0.39 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 300:1$) erreicht wurden, erhöhte sich der Energie Transfer auf 0.78 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 900:1$), 0.70 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 600:1$) und 0.57 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 300:1$), wenn die Peptide erst nach der Vesikelpräparation in die Membran eingebracht wurden.

4.3.3 Diskussion

Die Untersuchung der Aggregatbildung der Peptide in POPC-Vesikeln und die Bestimmung der Größe der Oligomere mittels einer *global fit*-Analyse der FRET-Daten und einer Anpassung von einzelnen Fitroutinen an die Messkurven des jeweiligen Lipid-zu-Peptidverhältnisses, hat gezeigt, dass TMH-1, TMF-1 und TMH-2 Trimere ausbilden, während TMF-2 in Form von Dimeren in der Lipiddoppelschicht vorliegt. Darüber hinaus kann festgehalten werden, dass es für

alle Peptide zur Einstellung eines reversiblen Gleichgewichts zwischen Monomeren und Oligomeren kommt, da beobachtet werden kann, dass der Anteil an Monomer ansteigt, wenn die Lipidkonzentration erhöht wird. Untersuchungen anderer Gruppen haben gezeigt, dass ein zentral eingebauter Asparagin-Rest in der Sequenz eines Peptids in der Lage ist Helix-Helix-Wechselwirkungen in Membranen zu verursachen (Choma et al., 2000; Gratkowski et al., 2001; Zhou et al., 2001). Wird die polare Aminosäure, wie im Fall des TMH-2 und des TMF-2, durch einen hydrophoben Rest, wie das Leucin, ersetzt, sollten die Assoziationen zwischen den Helices unterbunden werden (Choma et al., 2000). Gleichzeitig haben Studien an Peptiden, die Aminosäuren mit fluorinierten Seitenketten aufweisen, wie das TMF-1 und TMF-2, gezeigt, dass diese Peptide aufgrund der relativ starken Fluor-Wasserstoff-Brückenbindung in der Lage sind in Detergenz-Micellen stabilere und größere Aggregate auszubilden, als die entsprechenden nicht fluorinierten Analoga (Bilgicer et al., 2001a; Bilgicer et al., 2001b; Borman and Washington, 2001). Die Verkleinerung der Dissoziationskonstante von TMF-1 ($K_D = 1.89 \times 10^{-6} \text{ MF}^2$) verglichen mit TMH-1 ($K_D = 4.33 \times 10^{-6} \text{ MF}^2$) bestätigt diese Aussagen. Das TMF-2 bildet aufgrund der geringeren Stabilisierung der Oligomere durch das Fehlen des Asparagin-Rests erwartungsgemäß kleinere Aggregate in Form von Dimeren mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 1.58 \times 10^{-3} \text{ MF}$ aus. Das Peptid TMH-2 zeigt hingegen unerwartete Ergebnisse. Da das Molekül, anders als sein fluoriniertes Analogum TMF-2, keine fluorinierten Seitenketten zur Stabilisierung von *coiled coil*-Strukturen aufweist und darüber hinaus der im TMH-1 und TMF-1 auftauchende Asparagin-Rest durch einen Leucin-Rest ersetzt wurde, wurde erwartet, dass das Peptid monomer in der Membran vorliegt. Die beobachtete Ausbildung der Trimere könnte auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Peptiden zurückgeführt werden, die zum jetzigen Zeitpunkt nicht weiter spezifiziert werden können. Messungen einer kooperierenden Arbeitsgruppe an einer anderen Fraktion desselben Peptids haben gezeigt, dass TMH-2 in SDS-Micellen in Form von Monomeren oder Dimeren vorliegt (Bilgicer and Kumar, 2004).

Die Untersuchung der Aggregation von TMH-1 in Membranen bei nachträglicher Insertion der Peptide in die POPC-Vesikel zeigt, dass die Messungen hinsichtlich des Kurvenverlaufs ähnliche Ergebnisse liefern wie beim vorherigen Einbau der Peptide in Lipidfilme. Aufgrund der relativ großen Fehler in der Anpassung der Einzelfits

könnten sowohl Trimere, als auch Tetramere als Aggregatform in Frage kommen. Der Grund für die schlechte Kurvenanpassung kann auf die, für die Berechnungen, verwendete Konzentration der Peptide zurückgeführt werden. Wie bereits in Kap. 4.2.4 erläutert, zeigen die Ergebnisse der CD-Spektroskopie, dass beide nicht fluorinierten Peptide einen unerwartet hohen α -helikalen Gehalt aufweisen, der auf die Ausbildung relativ stabiler Aggregate in wässriger Lösung schließen lässt. Gleichzeitig verdeutlichen die in Kap. 4.2.2 dargestellten Ergebnisse, dass sich die Peptide bei einer nachträglichen Insertion in einem Gleichgewicht zwischen der wässrigen und der Lipidphase befinden. Sowohl bei den Untersuchungen zur Insertion als auch bei den Reversibilitätsmessungen wird beobachtet, dass bei einer nachträglichen Insertion der Peptide in die Lipiddoppelschicht deutlich mehr Zeit beansprucht wird bis die Fluoreszenzintensität einen konstanten Wert annimmt und sich somit ein Gleichgewichtszustand einstellt, als wenn die Peptide direkt in die Lipidfilme eingebracht werden. Darüber hinaus weisen die gelabelten Peptide verglichen mit den ungelabelten Peptiden, die für die Insertionsmessungen verwendet wurden, einen Fluorophor am N-terminalen Ende der Sequenz auf, der sowohl im Falle der Akzeptor gelabelten Moleküle, als auch im Falle der Sequenzen, die mit einem Donor gelabelt wurden, die Insertion der Peptide behindert. Es kann postuliert werden, dass die Peptide zumindest zu einem Teil weiterhin in Form von Aggregaten in der wässrigen Phase vorliegen und nicht alle Peptide in die Lipiddoppelschicht insertiert sind. Demnach ist die Konzentration der Peptide in der Lipidmembran, die als Berechnungsgrundlage für die FRET-Auswertung verwendet wird, zu hoch gewählt. Gleichzeitig können auch außerhalb der Lipiddoppelschicht Aggregate gebildet werden, die ebenso wie die Oligomere in der Membran einen Beitrag zu den erhaltenen Ergebnissen leisten. Die aufgeführten Gründe liefern die Erklärung für die schlechtere Übereinstimmung zwischen den Modellen eines Monomer-Trimer-Gleichgewichts bzw. eines Monomer-Tetramer-Gleichgewichts und den Ergebnissen der FRET-Messungen verglichen mit den vorangegangenen Daten, wenn die Peptide in die Lipidfilme eingebracht wurden. Darüber hinaus zeigt ein Vergleich der Ergebnisse für die beiden unterschiedlichen Probenpräparationen, dass sich der Energie Transfer für die drei verschiedenen Lipid-zu-Peptidverhältnisse bei gleichen Konzentrationen an Donor und Akzeptor gelabeltem Peptid ($\chi_A/\chi_D = 1$) für die beiden Methoden unterscheidet. Insgesamt nahm der Energie

Transfer bei einer nachträglichen Insertion der Peptide in die Vesikel für die unterschiedlichen Zusammensetzungen zu. Während bei der Filmpräparation Werte von 0.74 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 900:1$), 0.58 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 600:1$) und 0.39 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 300:1$) erreicht wurden, erhöhte sich der Energie Transfer auf 0.78 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 900:1$), 0.70 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 600:1$) und 0.57 ($c_{\text{POPC}}/c_{\text{TMH-1}} = 300:1$), wenn die Peptide erst nach der Vesikelpräparation in die Membran eingebracht wurden. Der Grund hierfür könnte in der strukturbedingten unterschiedlichen Insertion der gelabelten Peptide liegen. Aufgrund der fünf positiv geladenen Lysinreste am C-terminalen Ende, die eingeführt wurden um die Wasserlöslichkeit der Peptide zu erhöhen (Li et al., 2003), kann davon ausgegangen werden, dass die Moleküle bei einer nachträglichen Insertion mit dem N-terminalen farbstoffgelabelten Ende voran insertieren. Bei der Herstellung von Lipidfilmen und anschließender Vesikelpräparation können die Fluorophore auch auf unterschiedlichen Seiten der Membran orientiert sein und sogenannte *mismatches* ausbilden. Kommt es zur Ausbildung von Aggregaten zwischen Peptiden, deren Fluorophore zum einen im Innern der Vesikel und zum anderen auf der Außenseite positioniert sind, kann kein Energie Transfer stattfinden. Aus diesem Grund nimmt der Energie Transfer bei einer nachträglichen Insertion in Vesikel, verglichen mit der Präparation aus Lipidfilmen, zu. Prinzipiell kann festgehalten werden, dass die Methode der nachträglichen Insertion von TMH-1 in die Membran aufgrund der unbekanntenen Konzentration an Peptid in der Lipiddoppelschicht schlechter geeignet ist, um das Aggregationsverhalten der Peptide zu beschreiben. Insgesamt zeigt das TMH-1 jedoch ein vergleichbares Verhalten in der Membran für die beiden verschiedenen Präparationsmethoden.

4.4 Kontrolle der Aggregation der Peptide auf Membranebene

Wie in Kap. 4.2.2 beschrieben, ist TMH-1 nicht in der Lage in DPPC-Vesikel zu insertieren, die sich in der Gelphase befinden, zeigt aber eine Insertion in POPC-Vesikel, die bei Raumtemperatur im flüssig-kristallinen Zustand vorliegen. Da die Peptide demnach auf die flüssig-kristalline Phase beschränkt sind und ihre Assoziation konzentrationsabhängig ist (Kap. 4.3), wurde versucht die Aggregation der Peptide in Vesikeln mit Hilfe der Temperatur zu steuern. Zu diesem Zweck

wurde eine Lipidmischung benötigt, die es erlaubte die Ausbildung von Domänen in der Gelphase und im flüssig-kristallinen Zustand temperaturabhängig zu kontrollieren. Nach Curatolo et al. bilden Lipidvesikel bestehend aus Mischungen von POPC und DPPC, bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur der beiden Komponenten eine vollständig gemischte flüssig-kristalline Phase (L_{α}) aus, während es bei tieferen Temperaturen ($T < T_m$) zur Phasenseparation in eine L_{α} - und eine Gelphase kommt (Curatolo et al., 1985). In dem Gebiet der zweiphasigen Koexistenz bilden die in der Gelphase vorliegenden DPPC-haltigen Domänen ein Netzwerk von schmalen Inseln aus, die vom flüssig-kristallinen POPC umgeben werden (Shoemaker and Vanderlick, 2003). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde eine Lipidmischung von DPPC und POPC in einem Verhältnis von 6:4 verwendet.

4.4.1 Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur einer DPPC/POPC-Mischung (6:4) nach der Patman-Methode

Der Phasenübergang der DPPC/POPC-Mischung im Verhältnis 6:4 von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase wurde mit Hilfe des Fluorophors Patman ermittelt. Patman ist in der Membran im Bereich der Kopfgruppen der Lipide lokalisiert und weist beim Durchlaufen der Phasenumwandlungstemperatur eine große Stoke'sche Verschiebung auf (Hutterer et al., 1996; Massey et al., 1985). Die beobachtete Rotverschiebung der Fluoreszenz mit steigender Temperatur zeigt die Sensitivität der Fluorophors auf die Polarität der Umgebung, die sich während des Phasenübergangs ändert (Hutterer et al., 1996; Lippert, 1957). In Abb. 4–43 sind die Fluoreszenzspektren von Patman in einer DPPC/POPC-Mischung (6:4) innerhalb eines Temperaturbereichs von 20 bis 50 °C dargestellt. Es konnte eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenz von 38 nm in den längerwelligen Spektralbereich mit steigender Temperatur beobachtet werden.

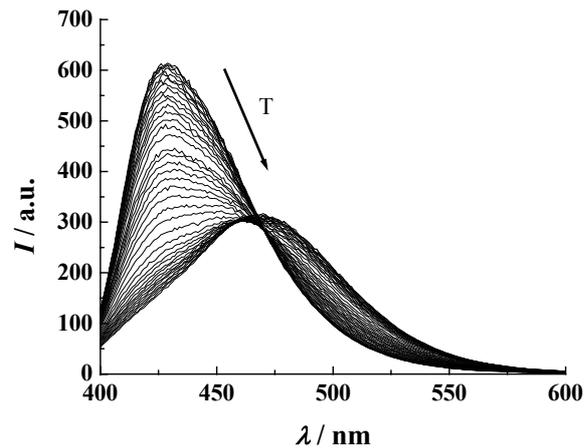


Abb. 4–43: Fluoreszenzspektren des Fluorophors Patman in einer DPPC/POPC-Mischung (6:4) in Abhängigkeit von der Temperatur (20 – 50 °C). Mit steigender Temperatur kam es zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenz.

Zur Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur wurde das Maximum der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 4–44). Die Maxima λ_{\max} steigen von 429 nm auf 467 nm an. Der Wendepunkt der Kurve lieferte mit 34 °C die Temperatur des Phasenübergangs von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase.

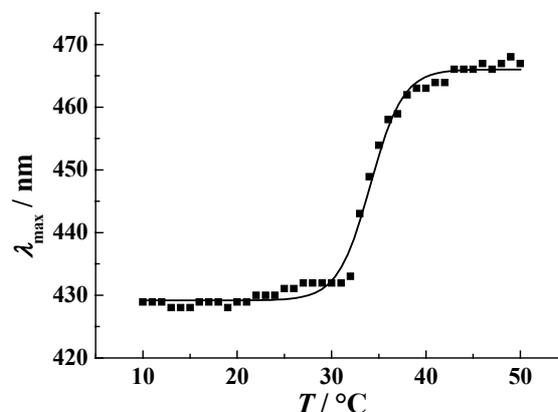


Abb. 4–44: Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur T_m einer Lipidmischung von DPPC und POPC im Verhältnis 6:4 mit Hilfe des Fluorophors Patman. Das Maximum der Patman Fluoreszenz λ_{\max} wurde als Funktion der Temperatur bei einem Lipid-zu-Fluorophorverhältnis von 100:1 aufgezeichnet (■). Die durchgezogene Linie (–) ist das Ergebnis eines Boltzmann-Fits, dessen Wendepunkt die Phasenumwandlungstemperatur T_m von 34 °C liefert.

4.4.2 Untersuchung der Ausbildung DPPC-haltiger Domänen in DPPC/POPC-Mischungen (6:4) mittels FRET

Der Nachweis der Ausbildung der Domänen erfolgte mit Hilfe des FRET zwischen dem Donor 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (NBD-DPPE) und dem Akzeptor Lissamin rhodamin B-1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (N-Rh-DPPE). Der Donor NBD-DPPE weist eine geringere Affinität zur Gelphase auf, als der Akzeptor N-Rh-DPPE. Kommt es zu einer Phasenseparation, so kann die resultierende räumliche Trennung der Fluorophore voneinander mit Hilfe des Energie Transfers verfolgt werden (Pedersen et al., 1996).

Abb. 4–45 zeigt den Verlauf der Akzeptorfluoreszenz in Abwesenheit von Donor in Abhängigkeit von der Temperatur in einem Bereich von 20 bis 50 °C. Der lineare Abfall der Fluoreszenzintensität konnte der sinkenden Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors bei steigenden Temperaturen zugeschrieben werden (Oliver et al., 2000).

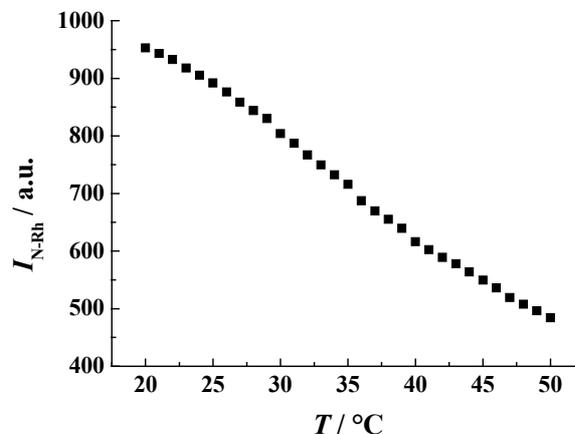


Abb. 4–45: Temperaturabhängigkeit der N-Rh-DPPE-Fluoreszenz (■) in DPPC/POPC-Vesikeln in einem Verhältnis von 6:4 in Abwesenheit von NBD-DPPE. Die Proben wurden von 20 °C auf 50 °C erwärmt.

Proben, die Donor und Akzeptor enthielten, zeigten sowohl für ein Erhitzen der Proben von 20 auf 50 °C (■), als auch für ein Abkühlen der Proben von 50 auf 20 °C (▲) eine deutlich verringerte Intensität der Akzeptorfluoreszenz (Abb. 4–46). Der Unterschied zwischen den beiden Messungen bestand lediglich in einer leichten

Erhöhung der Steigung bei niedrigeren Temperaturen für den Kurvenverlauf, der über eine Abkühlung der Probe erhalten wurde.

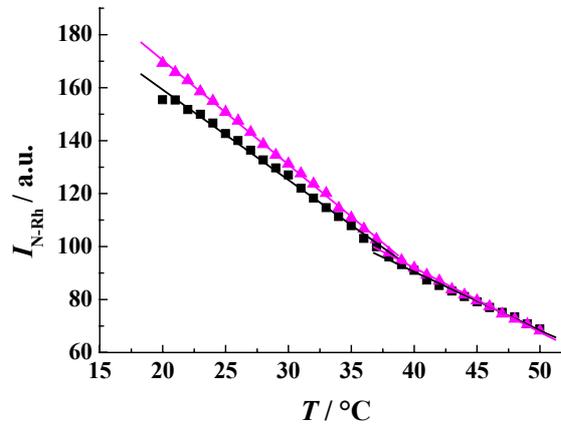


Abb. 4–46: Temperaturabhängigkeit der N-Rh-DPPE-Fluoreszenz in DPPC/POPC-Vesikeln in einem Verhältnis von 6:4 in Anwesenheit von NBD-DPPE bei Erhitzen der Probe von 20 auf 50 °C (■) bzw. Abkühlen der Probe von 50 auf 20 °C (▲). Mittels einer linearen Kurvenanpassung wurden die Steigungen bei Erhitzen der Probe mit -3.4 K^{-1} in einem Bereich von 20 °C bis 37 °C und mit -2.2 K^{-1} in einem Bereich von 38 °C bis 50 °C bestimmt (—). Bei einer Abkühlung der Probe ergaben sich die Steigungen mit -2.4 K^{-1} in einem Bereich von 50 °C bis 38 °C und mit -3.9 K^{-1} in einem Bereich von 37 °C bis 20 °C (—).

Die deutlich niedrigeren Intensitäten in Anwesenheit von NBD-DPPE waren ein Ergebnis der unterschiedlichen Anregungsenergien. Während in Anwesenheit von Donor die Anregung des N-Rh-DPPE nur über den Energie Transfer erfolgte, wurden die Messungen in Abwesenheit von Donor mit der Anregungswellenlänge von N-Rh-DPPE aufgenommen, so dass der Fluorophor direkt angeregt wurde. Darüber hinaus konnte eine deutliche Änderung in der Steigung in einem Temperaturbereich zwischen 37 °C und 38 °C beobachtet werden. Die Steigung nahm im Bereich des Phasenübergangs der verwendeten Lipidmischung von DPPC/POPC (6:4) von 34 °C (Kap. 4.4.1) von -3.4 K^{-1} auf -2.2 K^{-1} (Erhitzen der Lipidmischung) bzw. von -3.9 K^{-1} auf -2.4 K^{-1} (Abkühlen der Lipidmischung) ab und bestätigte somit die Ausbildung von DPPC-haltigen Domänen. Zur Korrektur der Messung um die Temperaturabhängigkeit des Akzeptors wurde das Verhältnis aus der Fluoreszenzintensität des N-Rh-DPPE in An- und in Abwesenheit von Donor $I_{\text{N-Rh}}/I_{\text{N-Rh+NBD}}$ gebildet und in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen (Abb. 4–47).

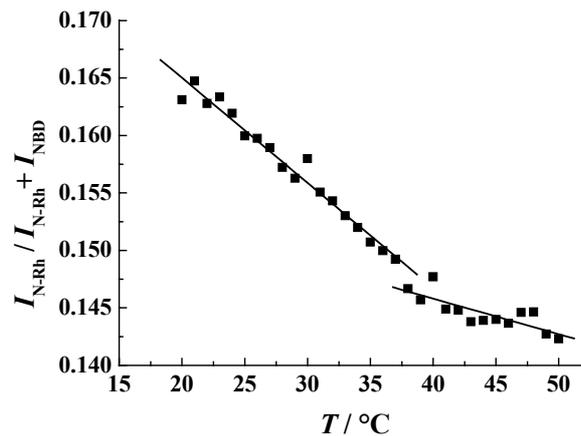


Abb. 4–47: Verhältnis der Fluoreszenzintensität des Akzeptors in An- und in Abwesenheit von Donor in Abhängigkeit von der Temperatur. Mittels einer linearen Kurvenanpassung wurden die Steigungen mit -0.9 K^{-1} in einem Bereich von 20 °C bis 37 °C und mit -0.3 K^{-1} in einem Bereich von 38 °C bis 50 °C bestimmt (–).

Das Verhältnis zeigte über den vollständigen Temperaturbereich eine negative Steigung und somit eine Abnahme der Energie Transfer-Effizienz mit steigender Temperatur. Auch in dieser Darstellung kann ein Wechsel in der Steigung des Messverlaufs von -0.9 mK^{-1} auf -0.3 mK^{-1} in einem Temperaturbereich von 37 °C auf 38 °C beobachtet werden, der auf eine Phasenseparation der Lipidmischung und somit auf veränderte Energie Transfer-Effizienzen von Donor und Akzeptor hinwies.

4.4.3 Temperaturabhängigkeit der Energie Transfer-Effizienz gelabelter Peptide in einer Lipidmischung

Für die folgenden Messungen wurde NBD bzw. TAMRA gelabeltes TMH-1 in die untersuchte Lipidmischung von DPPC/POPC (6:4) insertiert und das Assoziationsverhalten der Peptide in der Membran in Abhängigkeit von der Temperatur mit Hilfe von FRET-Messungen untersucht. Abb. 4–48 zeigt die Fluoreszenzintensität des NBD-TMH-1 I in Abhängigkeit von der Temperatur in Anwesenheit (\blacktriangle) und Abwesenheit des Akzeptors TAMRA-TMH-1 (\blacksquare).

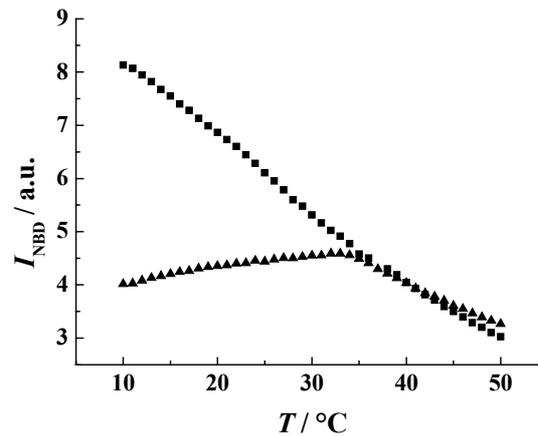


Abb. 4–48: Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzintensität des NBD-TMH-1 inseriert in DPPC/POPC-Vesikel (6:4) in Anwesenheit (▲) und in Abwesenheit des Akzeptors TAMRA-TMH-1 (■).

DPPC/POPC-Vesikel, die lediglich den Donor enthielten, zeigten einen nahezu linearen Abfall der Donorfluoreszenz mit steigender Temperatur. Der beobachtete Abfall der Intensität konnte auf die Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors mit steigender Temperatur zurückgeführt werden (Fery-Forgues et al., 1993). Befanden sich sowohl Donor als auch Akzeptor in den Vesikeln, so konnte beobachtet werden, dass die NBD-Fluoreszenz bei niedrigeren Temperaturen sehr viel kleinere Werte aufwies als in Abwesenheit von TAMRA gelabelten Peptiden. Die verringerte Donorfluoreszenz wurde durch den Energie Transfer zum Akzeptor verursacht. Die Fluoreszenzintensität des NBD stieg bis zu einer Temperatur von 33 °C leicht an und erreichte an diesem Punkt ein Maximum. Oberhalb von 33 °C fiel die NBD-Fluoreszenz in nahezu gleichem Maße ab wie die Donorfluoreszenz in den Messungen, die in Abwesenheit von Akzeptor durchgeführt wurden. Zur Korrektur der Messung um die Temperaturabhängigkeit des Donors wurde das Verhältnis aus der Fluoreszenzintensität des NBD in An- und in Abwesenheit von Akzeptor $I_{\text{NBD}}/I_{\text{NBD}+\text{TAMRA}}$ gebildet und in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen (Abb. 4–49).

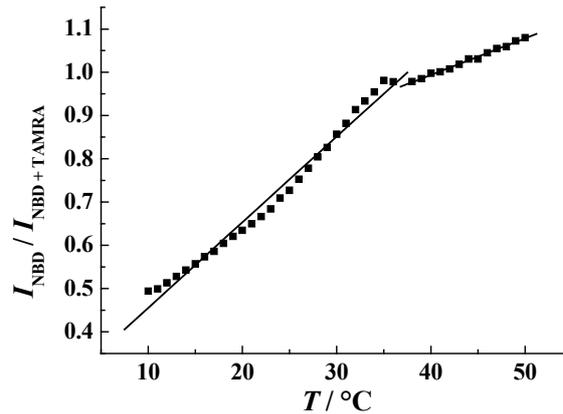


Abb. 4–49: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten des Donors in An- und in Abwesenheit von Akzeptor in Abhängigkeit von der Temperatur. Mittels einer linearen Kurvenanpassung wurde die Steigung im unteren Temperaturbereich mit 20 mK^{-1} und im oberen Temperaturbereich mit 8.5 mK^{-1} bestimmt (–).

Das Verhältnis zeigte über den vollständigen Temperaturbereich eine positive Steigung und somit eine Abnahme der Energie Transfer-Effizienz mit steigender Temperatur. Darüber hinaus konnte bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Änderung in der Steigung von 20 mK^{-1} auf 8.5 mK^{-1} registriert werden. Das beobachtete Maximum in der Donorfluoreszenz (Abb. 4–48) und die Änderung der Steigung (Abb. 4–49) erfolgten innerhalb eines Temperaturbereichs von 33 bis $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Dies entspricht der Phasenumwandlungstemperatur T_m , bei der die DPPC/POPC-Mischung (6:4) von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase übergeht.

4.4.4 Diskussion

Die vorangegangenen Messungen haben gezeigt, dass die Ausbildung von Oligomeren in Membranen konzentrationsabhängig verläuft (Kap. 4.3) und das TMH-1 nicht in der Lage ist in Lipiddoppelschichten zu insertieren (Kap. 4.2.2), die in der Gelphase vorliegen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde versucht, den Assoziationszustand der Peptide mit Hilfe des physikalischen Zustands der Lipide einer Mischung zu kontrollieren. Es konnte gezeigt werden, dass es unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m zu einer Aufkonzentrierung der Peptide kommt, wodurch eine temperaturgetriggerte Erhöhung in der Ausbildung von Aggregaten beobachtet werden kann, die einen Ausschluss der Peptide aus den DPPC-haltigen Domänen belegt. Der Triggerprozess kann über FRET-Messungen mit NBD gelabeltem TMH-1 als Donor und TAMRA gelabeltem TMH-1 als Akzeptor in einer DPPC/POPC-Mischung (6:4) verfolgt werden. Dabei zeigen die Daten ein Maximum

in der Fluoreszenzintensität des Donors bzw. ein Minimum in der Energie Transfer-Effizienz im Bereich der Phasenumwandlungstemperatur T_m (Abb. 4–48). Die signifikanten Änderungen in der Fluoreszenz gehen also mit dem Phasenübergang der Lipidmischung einher. Aus der Literatur ist bekannt, dass DPPC unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur der Mischung in der Gelphase vorliegt und längliche, phasenseparierte Domänen ausbildet, welche die fluide POPC-Matrix netzwerkartig durchspannen (Curatolo et al., 1985; Shoemaker and Vanderlick, 2003). Die Ausbildung dieser Domänen kann über FRET-Messungen mit den gelabelten Lipiden NBD-DPPE und N-Rh-DPPE in der DPPC/POPC-Mischung (6:4) bestätigt werden (Pedersen et al., 1996). Leidy et al. konnten im Bereich des Phasenübergangs einer DMPC/DSPC-Mischung ein Maximum in der NBD-Fluoreszenz beobachten, wenn der Akzeptor N-Rh-DPPE in der Mischung enthalten war (Leidy et al., 2001). Die Messungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen zwar kein deutliches Minimum in der Akzeptorfluoreszenz, es kann jedoch eine deutliche Änderung in der Steigung in einem Temperaturbereich von 37 °C und 38 °C im Verlauf der Intensität des N-Rh-DPPE verzeichnet werden, die auf eine Ausbildung DPPC-haltiger Domänen unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur von 34 °C schließen lässt. Aufgrund der Tatsache, dass Insertionsmessungen an DPPC-Vesikeln gezeigt haben, dass TMH-1 bei Raumtemperatur nicht in die Lipiddoppelschicht insertieren kann, da sich das Lipid in der Gelphase befindet (Kap. 4.2.2), kann davon ausgegangen werden, dass das TMH-1 in Mischungen von DPPC/POPC (6:4) unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur von 34 °C aus den DPPC-haltigen Domänen ausgeschlossen wird. Dies führt gleichzeitig zu einer Erniedrigung des Lipid-zu-Peptidverhältnisses in den POPC-haltigen fluiden Bereichen der Membran. Eine Erhöhung der Temperatur über die Phasenumwandlungstemperatur bedingt die Auflösung der DPPC-haltigen Domänen und die Ausbildung einer vollständig gemischten flüssig-kristallinen Membran, in der sich die Peptide in allen Bereichen aufhalten können (Abb. 4–50). Der damit verbundene Anstieg des Lipid-zu-Peptidverhältnisses führt zu einer geringeren Zahl an Oligomeren und somit zu einer Erniedrigung des Energie Transfers. Der Triggerprozess ist in Abb. 4–50 gezeigt.

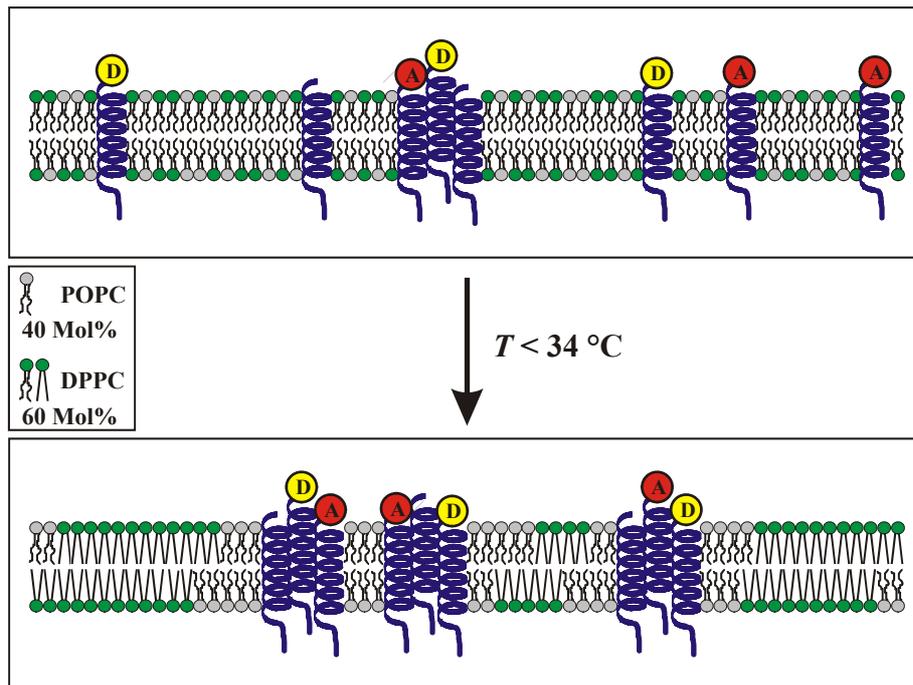


Abb. 4–50: Schematische Darstellung der temperaturabhängig getriggerten Ausbildung von Peptidoligomeren in POPC/DPPC-haltigen Lipiddoppelschichten.

Die obere Darstellung zeigt die DPPC/POPC-Membran (6:4) bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur. Die Lipiddoppelschicht liegt in einer vollständig gemischten flüssig-kristallinen Phase (L_α) vor, in der sich die Peptide in allen Bereichen aufhalten können. In der unteren Darstellung ist die Membran bei Temperaturen unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur von $34 \text{ } ^\circ\text{C}$ abgebildet. Es kommt zur Ausbildung DPPC-haltiger Domänen, die in der Gelphase vorliegen und zu einem Ausschluss der Peptide aus diesen Bereichen. Die damit verbundene Aufkonzentrierung der Moleküle in den fluiden POPC-haltigen Gebieten bewirkt die Ausbildung einer höheren Zahl von Oligomeren.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen der Peptide TMH-1 und TMH-2 und deren fluorinierter Analoga TMF-1 und TMF-2 mit Lipiddoppelschichten untersucht. Die Peptide sind abgeleitet von der Aminosäuresequenz des GCN4-Zippers, von dem bekannt ist, dass er *coiled coil*-Strukturen ausbildet, wobei die hydrophoben durch hydrophile Reste ersetzt wurden, um die Lipidlöslichkeit zu gewährleisten.

Die Charakterisierung der Lipid-Peptid-Wechselwirkungen erfolgte in Phospholipidvesikeln bestehend aus 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin. Es konnte mit Hilfe des an Position vier befindlichen Tryptophan in der Sequenz aller Peptide über die Tryptophan-Fluoreszenz eine reversible Insertion der Moleküle in POPC-Doppelschichten nachgewiesen werden. Quenchingexperimente konnten im Falle der Peptide TMH-1 und TMH-2 eine Lokalisierung des Tryptophan-Rests in der Membran belegen. Dabei ergab sich der Abstand zwischen dem Tryptophan-Rest und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht mit 1.5 nm für TMH-1 bzw. 1.9 nm für TMH-2. Mittels der Circular dichroismus-Spektroskopie wurde der α -helikale Gehalt der Peptide in unterschiedlichen Medien bestimmt, der belegte, dass ein Helixanteil von 67 % im Falle des TMH-1 bzw. 42 % im Falle des TMH-2 inseriert in POPC-Vesikel erreicht wurde. *Attenuated Total Reflection – Fourier Transformed Infrared* – Experimente zeigten, dass die nicht fluorinierten Peptide in der Membran alle möglichen Orientierungen einnehmen..

Erstmals in Lipidvesikeln konnte die Ausbildung und die Stabilität von Peptidoligomeren der Peptide TMH-1 und TMH-2 gezeigt werden. Durch die Einführung fluorinierter Seitenketten in den Peptiden TMF-1 und TMF-2 konnte die Tendenz zur Aggregation erhöht werden. Dies wurde durch die ermittelten Dissoziationskonstanten von $4.3 \cdot 10^{-6}$ für TMH-1 und $1.9 \cdot 10^{-6}$ für TMF-1 belegt, die mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer bestimmt wurden. Zudem konnten für alle vier Peptide über FRET-Messungen die Zahl der Peptide in einem Oligomer in Lipidmembranen bestimmt werden.

Es konnte eine Methode basierend auf FRET entwickelt werden, um das Aggregationsverhalten der Peptide in Lipiddoppelschichten temperaturabhängig zu kontrollieren. Mit Hilfe von FRET-Experimenten an fluoreszenzgelabelten Lipiden wurde zunächst die Ausbildung von DPPC-haltigen Domänen in DPPC/POPC-Mischungen (6:4) unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur bestätigt. Anschließend wurde das Peptid TMH-1 in die Lipiddoppelschicht inseriert und es konnte eindeutig belegt werden, dass durch Variation der Temperatur das Monomer-Trimer-Gleichgewicht der Peptidoligomerisierung in der Membran gesteuert werden konnte.

6 Literaturverzeichnis

A

- Adair, B. D., and Engelman, D. M. (1994). Glycophorin A helical transmembrane domains dimerize in phospholipid bilayers: a resonance energy transfer study. *Biochemistry* **33**, 5539-44.
- Adamson, J. G., Zhou, N. E., and Hodges, R. S. (1993). Structure, function and application of the coiled-coil protein folding motif. *Curr Opin Biotechnol* **4**, 428-37.
- Akutsu, H., Ikematsu, M., and Kyogoku, Y. (1981). Molecular structure and interaction of dipalmitoyl phosphatidylcholine in multilayers. Comparative study with phosphatidylethanolamine. *Chem Phys Lipids* **28**, 149-58.
- Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., and Morán, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. *Prot Eng* **6**, 383-90.
- Axelsen, P. H., Kaufman, B. K., McElhaney, R. N., and Lewis, R. N. (1995). The infrared dichroism of transmembrane helical polypeptides. *Biophys J* **69**, 2770-81.

B

- Betz, S. F., and DeGrado, W. F. (1996). Controlling topology and native-like behavior of de novo-designed peptides: design and characterization of antiparallel four-stranded coiled coils. *Biochemistry* **35**, 6955-62.
- Betz, S. F., Liebmann, P. A., and DeGrado, W. F. (1997). *De novo* design of native proteins: characterization of proteins intended to fold into antiparallel, rop-like, four-helix bundles. *Biochemistry* **36**, 2450-8.
- Bilgicer, B., Fichera, A., and Kumar, K. (2001a). A coiled coil with a fluorous core. *J Am Chem Soc* **123**, 4393-9.
- Bilgicer, B., and Kumar, K. (2002). Synthesis and thermodynamic characterization of self-sorting coiled coils. *Tetrahedron* **58**, 4105-12.
- Bilgicer, B., and Kumar, K. (2004). *De novo* design of defined helical bundles in membrane environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15324-9.
- Bilgicer, B., Xing, X., and Kumar, K. (2001b). Programmed self-sorting of coiled coils with leucine and hexafluoroleucine cores. *J Am Chem Soc* **123**, 11815-6.

- Birks, J. B. (1970). "Photophysics of Aromatic Molecules." Wiley-Interscience, London.
- Bong, D. T., Janshoff, A., Steinem, C., and Ghadiri, M. R. (2000). Membrane partitioning of the cleavage peptide in flock house virus. *Biophys J* **78**, 839-45.
- Borman, S., and Washington, C. E. (2001). Fluorous peptides: enhanced stability of fluorinated peptide derivatives suggests design applications. *Chemical & Engineering News* **79**, 41-2.

C

- Chattopadhyay, A., and London, E. (1987). Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry* **26**, 39-45.
- Chen, P. S., Toribara, T. Y., and Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem* **28**, 1756-8.
- Choi, G., Landin, J., and Xie, X.-Q. (2002). The cytoplasmic helix of cannabinoid receptor CB₂, a conformational study by circular dichroism and ¹H NMR spectroscopy in aqueous and membrane-like environments. *J Peptide Res* **60**, 169-77.
- Choma, C., Gratkowski, H., Lear, J. D., and DeGrado, W. F. (2000). Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol* **7**, 161-6.
- Chung, L. A., Lear, J. D., and DeGrado, W. F. (1992). Fluorescence studies of the secondary structure and orientation of a model ion channel peptide in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **31**, 6608-16.
- Cottingham, K. (2004). Do you believe in lipid rafts? *Anal Chem* **76**, 403A-408A.
- Cowgill, R. W. (1967). Fluorescence and protein structure. X. Reappraisal of solvent and structural effects. *Biochim Biophys Acta* **133**, 6-18.
- Crick, F. H. C. (1953). The fourier transform of a coiled-coil. *Acta Crystallogr* **6**, 689-97.
- Curatolo, W., Sears, B., and Neuringer, L. J. (1985). A calorimetry and deuterium NMR study of mixed model membranes of 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine and saturated phosphatidylcholines. *Biochim Biophys Acta* **817**, 261-70.

D

- de Almeida, R. F., Loura, L. M., Fedorov, A., and Prieto, M. (2002). Nonequilibrium phenomena in the phase separation of a two-component lipid bilayer. *Biophys J* **82**, 823-34.
- de Vos, A. M., Ultsch, M., and Kossiakoff, A. A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* **255**, 306-12.
- Ding, F.-X., Xie, H., Arshava, B., Becker, J. M., and Naider, F. (2001). ATR-FTIR study of the structure and orientation of transmembrane domains of the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor receptor in phospholipids. *Biochemistry* **40**, 8945-54.

E

- Ercelen, S., Kazan, D., Erarslan, A., and Demchenko, A. P. (2001). On the excited-state energy transfer between tryptophan residues in proteins: the case of penicillin acylase. *Biophys Chem* **90**, 203-17.

F

- Fahrenfort, J. (1961). Attenuated total reflection - a new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds. *Spectrochim Acta* **17**, 698-709.
- Fasman, G. D. (1976). Proteins. In "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", Vol. 1. CRC Press, Florida.
- Fery-Forgues, S., Fayet, J., and Lopez, A. (1993). Drastic changes in the fluorescence properties of NBD probes with the polarity of the medium: involvement of TICT state? *J Photochem Photobiol A Chem* **70**, 229-43.
- Flowers, S., Biswas, E. E., and Biswas, S. B. (2003). Conformational dynamics of DnaB helicase upon DNA and nucleotide binding: analysis by intrinsic tryptophan fluorescence quenching. *Biochemistry* **42**, 1910-21.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* **2**, 55-75.
- Frank, H. S., and Evans, M. E. (1945). Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary lipid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *J Chem Physics* **13**, 507-32.
- Fraser, R. D. B., and MacRae, T. P. (1973). "Conformation in fibrous proteins and related synthetic polypeptides." Academic Press, New York.

- Frey, S., and Tamm, L. K. (1991). Orientation of melittin in phospholipid bilayers. A polarized attenuated total reflection infrared study. *Biophys J* **60**, 922-30.
- Fringeli, U. P., and Günthard, H. H. (1981). Infrared membrane spectroscopy. *Membrane Spectroscopy*, 270-332.

G

- Galla, H.-J. (1988). "Spektroskopische Methoden in der Biochemie." Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Ghadiri, M. R., Soares, C., and Choi, C. (1992a). A convergent approach to protein design. Metal ion-assisted spontaneous self-assembly of a polypeptide into triple-helix bundle protein. *J Am Chem Soc* **114**, 825-31.
- Ghadiri, M. R., Soares, C., and Choi, C. (1992b). Design of artificial four-helix bundle metalloprotein via a novel ruthenium(II)-assisted self-assembly process. *J Am Chem Soc* **114**, 4000-2.
- Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**, 319-26.
- Giocondi, M. C., Pacheco, L., Milhiet, P. E., and Le Grimmellec, C. (2001). Temperature dependence of the topology of supported dimyristoyl-distearoyl phosphatidylcholine bilayers. *Ultramicroscopy* **86**, 151-7.
- Glover, J. N., and Harrison, S. C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* **373**, 257-61.
- Goormatigh, E., and Ruyschaert, J.-M. (1990). Polarized attenuated total reflection infrared spectroscopy as a tool to investigate the conformation and orientation of membrane compounds. *Molecular Description of Biological Membranes by Computer-Aided Conformational Analysis*, 285-329.
- Gratkowski, H., Lear, J. D., and DeGrado, W. F. (2001). Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 880-5.
- Greenfield, N., Davidson, B., and Fasman, G. D. (1967). The use of computed optical rotatory dispersion curves for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **6**, 1630-7.
- Greenfield, N., and Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108-16.

H

- Han, X., Steinhauer, D. A., Wharton, S. A., and Tamm, L. K. (1999). Interaction of mutant influenza virus hemagglutinin fusion peptides with lipid bilayers: probing the role of hydrophobic residue size in the central region of the fusion peptide. *Biochemistry* **38**, 15052-9.
- Harboth, J., Weber, K., and Osborn, M. (1995). Epitope mapping and direct visualization of the parallel, in-register arrangement of the double-stranded coiled-coil in the NuMA protein. *EMBO J* **14**, 2447-60.
- Harbury, P. B., Kim, P. S., and Alber, T. (1994). Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer. *Nature* **371**, 80-3.
- Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S., and Alber, T. (1993). A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* **262**, 1401-7.
- Hildebrand, J. H., and Cochran, D. H. F. (1949). Liquid-liquid solubility of perfluoromethylcyclohexane with benzene, carbon tetrachloride, chlorobenzene, chloroform and toluene. *J Am Chem Soc* **71**, 22-5.
- Hodges, R. S. (1996). Boehringer Mannheim award lecture 1995. La conference Boehringer Mannheim 1995. De novo design of alpha-helical proteins: basic research to medical applications. *Biochem Cell Biol* **74**, 133-54.
- Hutterer, R., Schneider, F. W., Sprinz, H., and Hof, M. (1996). Binding and relaxation behaviour of prodan and patman in phospholipid vesicles: a fluorescence and ¹H NMR study. *Biophys Chem* **61**, 151-60.

I

- Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., and Ninham, B. W. (1977). Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim Biophys Acta* **470**, 185-201.

J

- Janiak, M. J., Small, D. M., and Shipley, G. G. (1976). Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin. *Biochemistry* **15**, 4575-80.
- Janosch, S., Nicolini, C., Ludolph, B., Peters, C., Volkert, M., Hazlet, T. L., Gratton, E., Waldmann, H., and Winter, R. (2004). Partitioning of dual-lipidated peptides into membrane microdomains: lipid sorting vs peptide aggregation. *J Am Chem Soc* **126**, 7496-503.
- Janshoff, A., and Steinem, C. (2000). Scanning force microscopy of model membranes. *Biospektrum* **5**, 401-6.

Jasco. (1994). CD-Spektrometer J710 Handbuch.

K

- Kayser, V., Turton, D. A., Aggeli, A., Beevers, A., Reid, G. D., and Beddard, G. S. (2004). Energy migration in novel pH-triggered self-assembled β -sheet ribbons. *J Am Chem Soc* **126**, 336-43.
- Kienker, P. K., DeGrado, W. F., and Lear, J. D. (1994). A helical-dipole model describes the single-channel current rectification of an uncharged peptide ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4859-63.
- Kim, H. S., Hartgerink, J. D., and Ghadiri, M. R. (1998). Oriented self-assembly of cyclic peptide nanotubes in lipid membranes. *J Am Chem Soc* **120**, 4417-24.
- Kiss, R. S., Kay, C. M., and Ryan, R. O. (1999). Amphipathic α -helix bundle organization of lipid-free chicken apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **38**, 4327-34.
- Kohn, W. D., Mant, C. T., and Hodges, R. S. (1997). Alpha-helical protein assembly motifs. *J Biol Chem* **272**, 2583-6.

L

- Lakey, J. H., and Pattus, F. (1989). The voltage-dependent activity of Escherichia coli porins in different planar bilayer reconstitutions. *Eur J Biochem* **186**, 303-8.
- Lakowicz, J. R. (1999). "Principles of Fluorescence Spectroscopy." Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Larive, C. K., Jayawickrama, D., and Orfi, L. (1997). Quantitative analysis of peptides with NMR spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **51**, 1531-6.
- Lazo, N. D., and Downing, D. T. (2001). Effects of Na₂SO₄ on hydrophobic and electrostatic interactions between amphipathic α -Helices. *J Peptide Res* **58**, 457-63.
- Leidy, C., Wolkers, W. F., Jorgensen, K., Mouritsen, O. G., and Crowe, J. H. (2001). Lateral organization and domain formation in a two-component lipid membrane system. *Biophys J* **80**, 1819-28.
- Li, M., Reddy, L. G., Bennett, R., Silva, N. D., Jr., Jones, L. R., and Thomas, D. D. (1999). A fluorescence energy transfer method for analyzing protein oligomeric structure: application to phospholamban. *Biophys J* **76**, 2587-99.
- Li, Y., Han, X., and Tamm, L. K. (2003). Thermodynamics of fusion peptide-membrane interactions. *Biochemistry* **42**, 7245-51.

- Lippert, E. (1957). Spektroskopische Bestimmung des Dipolmoments aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand. *Z Elektrochem* **61**, 962-75.
- London, E., and Khorana, H. G. (1982). Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures. *J Biol Chem* **257**, 7003-11.
- Lumb, K. J., Carr, C. M., and Kim, P. S. (1994). Subdomain folding of the coiled coil leucine zipper from the bZIP transcriptional activator GCN4. *Biochemistry* **33**, 7361-7.
- Lumb, K. J., and Kim, P. S. (1995a). A buried polar interaction imparts structural uniqueness in a designed heterodimeric coiled coil. *Biochemistry* **34**, 8642-8.
- Lumb, K. J., and Kim, P. S. (1995b). Measurement of interhelical electrostatic interactions in the GCN4 leucine zipper. *Science* **268**, 436-9.
- Luo, P., and Baldwin, R. L. (1997). Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* **36**, 8413-21.
- Lupas, A. (1997). Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 388-93.

M

- MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P. M., Takeshita, K., Subbarao, N. K., and Hu, L. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1061**, 297-303.
- Marsh, D. (1996). Peptide models for membrane channels. *Biochem J* **315**, 345-61.
- Massey, J. B., She, H. S., and Pownell, H. J. (1985). Interfacial properties of model membranes and plasma lipoproteins containing ether lipids. *Biochemistry* **24**, 6973-8.
- Merelo, J. J., Andrade, M. A., Prieto, A., and Morán, F. (1994). Proteinotopic feature maps. *Neurocomputing* **6**, 443-54.
- Mingarro, I., von Heijne, G., and Whitley, P. (1997). Membrane-protein engineering. *Trends Biotechnol* **15**, 432-7.
- Moitra, J., Szilak, L., Krylov, D., and Vinson, C. (1997). Leucine is the most stabilizing aliphatic amino acid in the d position of a dimeric leucine zipper coiled coil. *Biochemistry* **36**, 12567-73.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., and Wescott, W. C. (1962). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* **194**, 979-80.

N

- Nabedryk, E., Gingold, M. P., and Breton, J. (1982). Orientation of gramicidin A transmembrane channel. Infrared dichroism study of gramicidin in vesicles. *Biophys J* **38**, 243-9.
- Naeem, A., Khan, K. A., and Khan, R. H. (2004). Characterization of a partially folded intermediate of papain induced by fluorinated alcohols at low pH. *Arch Biochem Biophys* **432**, 79-87.
- Narayanaswami, V., Yamauchi, Y., Weers, P. M., Maekawa, H., Sato, R., Tsuchida, K., Oikawa, K., Kay, C. M., and Ryan, R. O. (2000). Spectroscopic characterization of the conformational adaptability of Bombyx mori apolipoprotein III. *Eur J Biochem* **267**, 728-36.
- Neil, E., and Marsh, E. N. G. (2000). Towards the nonstick egg: designing fluorophore proteins. *Chem Biol* **7**, R153-R157.

O

- Okamura, E., Umemura, J., and Takenaka, T. (1986). Orientation of gramicidin D incorporated into phospholipid multibilayers: a fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta* **856**, 68-75.
- Oliver, A. E., Baker, G. A., Fugate, R. D., Tablin, F., and Crowe, J. H. (2000). Effects of temperature on calcium-sensitive fluorescence probes. *Biophys J* **78**, 2116-26.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., and Kim, P. S. (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**, 538-42.

P

- Parker, M. W., Postma, J. P. M., Pattus, F., Tucker, A. D., and Tsernoglou, D. (1992). Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* **224**, 639-57.
- Pedersen, S., Jorgensen, K., Baekmark, T. R., and Mouritsen, O. G. (1996). Indirect evidence for lipid-domain formation in the transition region of phospholipid bilayers by two-probe fluorescence energy transfer. *Biophys J* **71**, 554-60.

Q

- Qi, X., and Grabowski, G. A. (1998). Acid β -glucosidase: intrinsic fluorescence and conformational changes induced by phospholipids and saposin C. *Biochemistry* **37**, 11544-54.

R

- Reddy, L. G., Jones, L. R., and Thomas, D. D. (1999). Depolymerization of phospholamban in the presence of calcium pump: a fluorescence energy transfer study. *Biochemistry* **38**, 3954-62.
- Riess, J. G. (1994). Highly fluorinated systems for oxygen transport, diagnosis and drug delivery. *Coll Surf A* **84**, 33-48.
- Roberts, G. G. (1990). "Langmuir-Blodgett Films." Plenum Press, New York.
- Ross, M., Steinem, C., Galla, H.-J., and Janshoff, A. (2001). Visualization of chemical and physical properties of calcium-induced domains in DPPC/DPPE Langmuir-Blodgett layers. *Langmuir* **17**, 2437-45.

S

- Sackmann, E. (1996). Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **271**, 43-8.
- Sáez-Ciri3n, A., Nir, S., Lorizate, M., Agirre, A., Cruz, A., P3rez-Gill, J., and Nieva, J. L. (2002). Sphingomyelin and cholesterol promote HIV-1 gp41 pretransmembrane sequence surface aggregation and membrane restructuring. *J Biol Chem* **277**, 21776-85.
- Schacht, L., Scheibe, G., and Schuller, H. (1955). Die 3bertragung monomolekularer Filme auf feste Tr3ger. *Z Elektrochem* **59**, 863-5.
- Sch3gger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
- Scott, R. L. (1948). The solubility of fluorocarbons. *J Am Chem Soc* **70**, 4090-3.
- Seelig, J. (2004). Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 40-50.
- Shaikh, S. R., Dumaul, A. C., Jenki, L. J., and Stillwell, W. (2001). Lipid phase separation in phospholipid bilayers and monolayers modeling the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1512**, 317-28.
- Shigematsu, D., Matsutani, M., Furuya, T., Kiyota, T., Lee, S., Sugihara, G., and Yamashita, S. (2002). Roles of peptide-peptide charge interaction and lipid phase separation in helix-helix association in lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* **1564**, 271-80.
- Shoemaker, S. D., and Vanderlick, T. K. (2003). Material studies of lipid vesicles in the L_{α} and L_{α} -gel coexistence regimes. *Biophys J* **84**, 998-1009.
- S3nnichsen, F. D. (1992). Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: a NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry* **31**, 8790-8.

- Stryer, L. (1996). "Biochemie." Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Surewicz, W. K., and Epand, R. M. (1984). Role of peptide structure in lipid-peptide interactions: a fluorescence study of the binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. *Biochemistry* **23**, 6072-7.

T

- Tamm, L. K., and Tatulian, S. A. (1997). Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* **30**, 365-429.
- Tanford, C. (1980). "The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes." Wiley, New York.
- Tang, Y., Ghirlanda, G., Petka, W. A., Nakajima, T., DeGrado, W. F., and Tirrell, D. A. (2001a). Fluorinated coiled coil proteins prepared in vivo display enhanced thermal and chemical stability. *Angew Chem Int Ed* **40**, 1494-6.
- Tang, Y., Ghirlanda, G., Vaidehi, N., Kua, J., Mainz, D. T., Goddard, I. W., DeGrado, W. F., and Tirrell, D. A. (2001b). Stabilization of coiled-coil peptide domains by introduction of trifluoroleucine. *Biochemistry* **40**, 2790-6.
- Tatulian, S. A., Jones, L. R., Reddy, L. G., Stokes, D. L., and Tamm, L. K. (1995). Secondary structure and orientation of phospholamban reconstituted in supported bilayers from polarized attenuated total reflection FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 4448-56.
- Terwilliger, T. C., and Eisenberg, D. (1982). The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *J Biol Chem* **257**, 6016-22.
- Torres, J., Adams, P. D., and Arkin, I. T. (2000). Use of a new label, $^{13}\text{C}=^{18}\text{O}$, in the determination of a structural model of phospholamban in a lipid bilayer. Spatial restraints resolve the ambiguity arising from interpretations of mutagenesis data. *J Mol Biol* **300**, 677-85.
- Tripet, B., Wagschal, K., Lavigne, P., Mant, C. T., and Hodges, R. S. (2000). Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a *de novo*-designed model coiled-coil: 20 amino acid substitutions in position "d". *J Mol Biol* **300**, 377-402.

W

- Wallach, D. F., and Zahler, P. H. (1966). Protein conformations in cellular membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 1552-9.
- Weber, G., and Farris, F. J. (1979). Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* **18**, 3075-8.

- Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M., and Seelig, J. (2000). Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: thermodynamic and mechanistic aspects. *Biochemistry* **39**, 442-52.
- Wilson, C., Wardell, M. R., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., and Agard, D. A. (1991). Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* **252**, 1817-22.
- Wimley, W. C., and White, S. H. (2000). Designing transmembrane α -helices that insert spontaneously. *Biochemistry* **39**, 4432-42.
- Winter, R., and Noll, F. (1998). "Methoden der Biophysikalischen Chemie." Teubner Studienbücher, Stuttgart.
- Woofson, D. N., and Alber, T. (1995). Predicting oligomerization states of coiled coils. *Protein Sci* **4**, 1596-607.
- www.avantilipids.com.
- www.cmpharm.ucsf.edu/cgi-bin/nnpredict.pl.
- www.udel.edu/~dzubeckcdspec.html.

X

- Xing, X., Fichera, A., and Kumar, K. (2001). A novell synthesis of enantiomerically pure 5,5,5,5',5',5'-hexafluoroleucine. *Organic Letters* **3**, 1285-6.

Y

- Yonei, S., Todo, T., and Kato, M. (1979). Radiation effects on erythrocyte membrane structure studied by the intrinsic fluorescence. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **35**, 161-70.

Z

- Zaks, A., and Klibanov, A. M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science* **224**, 1249-51.
- Zhou, F. X., Merianos, H. J., Brunger, A. T., and Engelman, D. M. (2001). Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2250-5.
- Zhou, N. E., Kay, C. M., and Hodges, R. S. (1992). Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol Chem* **267**, 2664-70.

7 Anhang

7.1 Symbolverzeichnis

A	Absorption bzw. Fläche
A_{\parallel}	Absorption des parallel polarisierten Lichts
A_{\perp}	Absorption des senkrecht polarisierten Lichts
c	Konzentration
c_F	Konzentration des Fluorophors in Anwesenheit von Quencher
c_F^0	Konzentration des Fluorophors in Abwesenheit von Quencher
c_Q	Quencherkonzentration
d	Schichtdicke der Küvette
d_p	Eindringtiefe der IR-Strahlung in eine Probe
E	Energie Transfer-Effizienz
\vec{E}	elektrischer Feldvektor
\vec{E}_L	linksläufige Komponente des elektrischen Feldvektors
\vec{E}_R	rechtsläufige Komponente des elektrischen Feldvektors
$E_{x,y,z}$	Amplitude des elektrischen Feldes in x-, y- oder z-Richtung
f_D	molare Fluoreszenz an nicht gelöschtem Donor
f_H	α -helikaler Gehalt eines Peptids
f_Q	molare Fluoreszenz an gelöschtem Donor
h	Plancksches Wirkungsquantum
J	Überlappintegral
I	Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von Lipid/Quencher/Akzeptor oder Intensität der IR-Strahlung nach der Absorption durch eine Probe
I^0	Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Lipid/Quencher/Akzeptor oder Intensität der IR-Strahlung vor der Absorption durch eine Probe
$I_{L,R}$	Intensität des links bzw. rechts zirkular polarisierten Lichts nach Absorption

I_{NBD}	NBD-Fluoreszenz in Abwesenheit von TAMRA bzw. N-Rh-DPPE (Untersuchung der Domänenbildung, Trigger-Messungen)
$I_{\text{N-Rh}}$	N-Rh-DPPE-Fluoreszenz in Abwesenheit von NBD-DPPE (Untersuchung der Domänenbildung)
j	zählt die Anzahl der Akzeptoren in einem Oligomer
K_{D}	Dissoziationskonstante
K_{FQ}	Gleichgewichtskonstante für die Komplexbildung von Fluorophor und Quencher
K_{Q}	Gleichgewichtskonstante des Quenchingprozesses durch einen Stoß
k	zählt die Anzahl der Donoren in einem Oligomer
k_{A}	Geschwindigkeitskonstante der Absorption
k_{F}	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz
k_{T}	Transfargeschwindigkeitskonstante
$k_{x,y,z}$	x-, y- und z-Komponente des integrierten Absorptionskoeffizienten
L_{α}	fluide oder flüssig-kristalline Phase
M	Molare Masse
m	Anteil der Moleküle in der monomeren Form
$m-1$	Anteil der an Oligomeren beteiligten Moleküle
N_{AS}	Anzahl an Aminosäuren in einem Peptid
N_{D}	Gesamtstoffmenge an Donor
N_{Q}	Stoffmenge an gelöschtem Donor
n	Brechungsindex bzw. Anzahl an Peptiden in einem Oligomer
$n_{1,2}$	Brechungsindex des Ge-Kristalls (n_1) bzw. des Membranmultilayers (n_2)
P	Abstand zwischen dem Fluorophor und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht
Q	Quencher
Q_{a}	Abstand zwischen dem Quencher und dem Zentrum der Lipiddoppelschicht
R	Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül oder Radius bzw. die halbe Schichtdicke einer Aggregatstruktur
R_0	kritischer Quencherradius bzw. FÖRSTER-Abstand
S_0	Schwingungsgrundzustand
S_0^{r}	relaxierter Gleichgewichtsschwingungsgrundzustand

S_1	angeregter Schwingungszustand
S_1^r	relaxierter angeregter Gleichgewichtsschwingungszustand
S_0	Ordnungsparameter
T	Transmission oder Durchlässigkeit
t	Zeit
V	Volumen
VF	Verdünnungsfaktor
X	lateraler Abstand zwischen Fluorophor und Quencher
Z_a	vertikaler Abstand zwischen Fluorophor und Quencher
α	Winkel zwischen der Molekülachse und dem Übergangsdipolmoment
X_p	Lipid-zu-Peptidverhältnis
χ_A	Molenbruch der Akzeptor gelabelten Peptide
χ_D	Molenbruch der Donor gelabelten Peptide
χ_{DOXYL}	Molenbruch des Quenchers
χ_u	Molenbruch der ungelabelten Peptide
$\Delta\lambda_{\max}$	Änderung der Wellenlänge des Intensitätsmaximums der Fluoreszenz
δ	optische Wegdifferenz
ε	Extinktionskoeffizient
ϕ	Fluoreszenzquantenausbeute in Anwesenheit von Lipid/Quencher/Akzeptor oder Einfallswinkel des eingestrahltten Lichts (ATR-FT-IR)
ϕ^0	Fluoreszenzquantenausbeute in Abwesenheit von Lipid/Quencher/Akzeptor
ϕ_D	Fluoreszenzquantenausbeute des Donors
γ	Winkel zwischen der Membrannormalen und der Molekülachse
κ^2	Orientierungsfaktor
λ	Wellenlänge
λ_{\max}	Wellenlänge des Intensitätsmaximums der Fluoreszenz
μ_{el}	elektrisches Übergangsdipolmoment
μ_{magn}	magnetisches Übergangsdipolmoment
ν	Schwingungsgrundzustand
ν^*	Schwingungszustand des ersten elektronisch angeregten Zustands
ν	Wellenzahl

θ_λ	Elliptizität
$[\theta]_\lambda$	spezifische Elliptizität
$\theta_{222}^{\text{gem}}$	gemessene Elliptizität bei 222 nm
τ_D	Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit von Akzeptor
τ_F	Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors in Anwesenheit von Quencher
τ_F^0	Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors in Abwesenheit von Quencher
ν_s	symmetrische Schwingungen
ν_{as}	asymmetrische Schwingungen

7.2 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATR-FTIR	<i>Attenuated Total Reflection – Fourier Transformed Infrared</i>
a.u.	<i>arbitrary units</i> , willkürliche Einheiten
<i>t</i> -BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CD	Circulardichroismus
DIEA	Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DS	DOXYL-stearinsäure
F	Fluorophor
F*	angeregter Fluorophor
[FQ]	Fluorophor-Quencher-Komplex
[FQ]*	angeregter Fluorophor-Quencher-Komplex
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GndHCl	Guanidiniumchlorid
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HF	Flusssäure
IC	Innere Umwandlung
ISC	<i>Inter System Crossing</i>
MBHA	Methylbenzhydrylamin-Harz

MF	Molenbruch des Peptid-zu-Lipidverhältnisses
mM	millimolar
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NBD-F	4-Fluor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
N-Rh	Lissamin rhodamin B
POPC	1-Palmitoyl-2-oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat -Polyacrylamidgelelektrophorese
TAMRA	5(6)-Carboxytetramethylrhodamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Trp	Tryptophan
UV	Ultraviolett
VIS	<i>visible</i> , sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts

7.3 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid (37.5:1)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat	Merck (Darmstadt)
L(+)-Ascorbinsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue R250	SERVA (Heidelberg)
DMSO	Merck (Darmstadt)
5- und 16-DOXYL-stearinsäure	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Ethanol	T.J. Baker (Deventer, Holland)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
GndHCl	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mucosol [®]	Merck (Darmstadt)

Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Merck (Darmstadt)
NBD	Molecular Probes (Eugene, USA)
NBD-DPPE	Molecular Probes (Eugene, USA)
N-Rh-DPPE	Molecular Probes (Eugene, USA)
Perchlorsäure	Merck (Darmstadt)
Phospholipide	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
TAMRA	Molecular Probes (Eugene, USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	SERVA (Heidelberg)
TFE	Merck (Darmstadt)
Tris/HCl	USB (Ohio, USA)
N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
D-Tryptophan	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck (Darmstadt)

7.4 Materialien

braune Fläschchen	Merck (Darmstadt)
Einmalkanülen	Ehrhardt & Söhne GmbH (Geislingen)
Einmalrührspatel	Brand (Wertheim)
Einwegküvetten Plastibrand [®] PMMA	Brand (Wertheim)
Fläschchenverschlüsse mit PTFE-beschichteter Gummidichtung	Merck (Darmstadt)
MicroTips XL	Biozym Diagnostic GmbH (Oldendorf)
Mucasol [®]	Brand (Wertheim)
Polycarbonatmembran	Armatis (Mannheim)
Reagenzgläser	Merck (Darmstadt)
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg)
Rotilabo [®] -Rührmagnete	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Quarzküvetten	Hellma GmbH (Mühlheim/Baden)
weiße Fläschchen	Merck (Darmstadt)

7.5 Geräte

ATR-FTIR-Spektrometer

FTIR-Spektrometer IFS88	Bruker Optik GmbH (Ettlingen)
MCT-Detektor, Model D316/8	InfraRed Associates, Inc. (Florida, USA)
ATR-Einheit MVP	Harrick (Ossining, USA)
Polarisator Model P03	InfraSpecs (Filderstadt)
Polarisatorhalterung	Feinmechanische Werkstatt (Regensburg)

CD-Spektrometer

Jasco CD-Spektrometer J-710	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Gross-Umstadt)
-----------------------------	---

Fluoreszenzspektrometer

Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer	Varian (Darmstadt)
MLW-Thermostat	MLW Labortechnik (Ilmenau)
Variomag Electronicrührer	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)

UV-Spektrometer

Cary 50 Bio	Varian (Darmstadt)
UV-visible Spectrophotometer	

Reinstwasseranlage

Milli-RO 3 Plus	Millipore (Eschborn)
Milli-Q Plus 185	

Sonstiges

Alublock für die Veraschung	Merck (Darmstadt)
Cary Eclipse UV-Spektrometer	Varian (Darmstadt)
Feinwaage Adventurer™	AH-W Wägetechnik (Deggendorf)
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR International (Darmstadt)

Miniextruder Liposofast®	Avestin (Ottawa, Kanada)
NeoLab-Mikro-Zentrifuge	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg)
pH-Meter 766-Set B	Merck (Darmstadt)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. (Berlin)
SDS-Apparatur EC 120	Thermo EC (Holbrook, USA)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255H	Bandelin (Berlin)
Vakuumentrockenschrank VD 23	Binder (Tuttlingen)
Verblaseapparatur	Glasbläserei (Regensburg)
Vortexer Reax Top	Heidolph (Schwabach)
Wasserbad E11	Dinkelberg Analytics GmbH (Neu-Ulm)

Lebenslauf

Name Natascha Naarmann

geboren 4.10.1976 in Hamm

Eltern Friedrich Naarmann und Margarete Naarmann
(geb. Große-Halbuer)

Schulbildung Mariengrundschule Werl-Büderich von 09/1983 bis 07/1987
Ursulinengymnasium Werl von 09/1987 bis 06/1990
Ludwig-Thoma-Gymnasium Prien von 09/1990 bis 06/1996

Studium Studium der Chemie an der Universität Regensburg von
10/1996 bis 09/2001
Vordiplom im Fach Chemie am 21.10.1998

Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie unter
Anleitung von Prof. Dr. Burkhard König von 01/2001 bis 09/2001
Diplom im Fach Chemie am 07.09.2001

Tätigkeiten Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Organische Chemie
der Universität Regensburg von 01/2001 bis 09/2001
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Analytische
Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg
von 11/2001 bis 02/2005

Dissertation Beginn der Dissertation am 01.11.2001 am Institut für
Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität
Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem

Liste der Publikationen und Poster

Publikationen:

Naarmann, N., Bilgiçer, B., Kumar, K., Steinem, C. Controlling Association of Vesicle Embedded Peptides by Alteration of the Physical State of the Lipid Matrix. submitted in *Biochemistry*

Naarmann, N., Bilgiçer, B., Kumar, K., Steinem, C. Controlled Self-Assembly of Coiled Coils based on the Phase Separation of Fluorinated Peptides and the Physical State of Lipid Membranes. in preparation

Posterpräsentationen:

„Design and Characterization of Pore-Forming Helix-Bundles in Lipid Membranes“
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2002, Dresden

„Design, Synthesis and Characterization of Pore-Forming Helix-Bundles in Lipid Membranes“
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2004, Freiburg

Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle

Prof. Dr. Claudia Steinem für die interessante Aufgabenstellung, die hervorragende Betreuung und Unterstützung und das tolle Arbeitsklima.

Prof. Dr. Otto Wolfbeis für die Bereitstellung der Geräte, ein gutes Institutsklima und die schönen Weihnachts- und Sommerfeste.

Prof. Dr. Krishna Kumar und Başar Bilgiçer für die Synthese und Bereitstellung der Peptide und die fachliche Unterstützung.

Prof. Dr. Bernhard Dick vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Regensburg für die Bereitstellung des ATR-FT-IR-Spektrometers und die Unterstützung bei der *global fit*-Analyse. Seiner Mitarbeiterin Tanja Schaffer für die Einweisung in das Gerät und die freundliche Unterstützung.

Prof. Dr. Andreas Janshoff vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Mainz und seinem ganzen Arbeitskreis für die fachlichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Johann Steinberger aus der Elektronik-Werkstatt der Universität Regensburg, der immer zur Stelle war, wenn es Probleme gab.

allen technischen Mitarbeitern und den Sekretärinnen des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Unterstützung und ein angenehmes Arbeitsklima.

Claudia Pilz für die vielen Diskussionen, Anregungen und Aufmunterungen in den gemeinsamen Raucherpausen, die Wanderungen von A nach A, die Unterstützung während der letzten drei Jahre und eine schöne Zeit.

bei meinem Arbeitskreis, insbesondere Katja, Alex, Winni und meinen beiden Laborkollegen Christian und Manuela für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Ideen, die vielen gemeinsamen „Messungen“ und Abende und eine unvergessliche Zeit.

ganz besonders meiner Familie dafür, dass sie immer hinter mir gestanden sind und ohne deren Beistand all dies nicht möglich gewesen wäre.

meiner Schwester Julia für ihre Geduld, ihre Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte, wenn es mal nicht so lief.

meinem Freund Stephan, weil er immer da war, alle Launen ertragen hat und mich immer unterstützt hat, wo er nur konnte.

