

Wechselwirkung von Modellsubstraten und Signalpeptiden des Tat-abhängigen
Translokationsweges mit Lipidmonoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II - Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl. Biologin Tina Brehmer

geb. am 24.01.1982 in Cottbus

Gutachter:

1. Prof. Dr. Alfred Blume (Halle (Saale))
2. Prof. Dr. Gerald Brezesinski (Potsdam)

Verteidigung: 15.02.2012

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1	Biologische Membranen und Zellen.....	1
1.2	Mechanismen des Membrantransportes	2
1.3	Twin Arginin Translocation Pathway.....	3
1.3.1	Das pflanzliche Twin-Arginin-Translokations-System	3
1.3.2	Das bakterielle Twin-Arginin-Translokations-System	5
1.4	Modellsubstrate	6
1.4.1	Modellsubstrate des Thylakoid-Systems.....	7
1.4.2	Modellsubstrate des <i>E. coli</i> -Systems.....	8
1.5	Lipidmodellsysteme.....	9
1.6	Lipide.....	11
1.6.1	Lipide der Thylakoid-Lipidmembran.....	11
1.6.2	Lipide der Cytoplasmamembran von <i>E. coli</i>	12
1.7	Aufgaben und Ziele	14
2	Experimenteller Teil.....	15
2.1	Materialien.....	15
2.1.1	Chemikalien	15
2.1.2	Lipide und Proteine/Peptide	15
2.2	Methoden und experimenteller Versuchsaufbau	17
2.2.1	Filmwaage	17
2.2.2	Infrarot Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS).....	20
2.2.3	Epi-Fluoreszenzmikroskopie.....	25
3	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen mit dem Thylakoid-System	27
3.1	Physikalisch-chemische Charakterisierung von Thylakoidlipiden an der Luft/Wasser-Grenzfläche	27
3.1.1	Druck/Flächen-Isothermen durch Filmwaagemessungen	27
3.1.2	IRRA-spektroskopische Untersuchung der Lipidmonoschichten	28
3.1.3	Epi-fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Thylakoid-Lipidgemisches.....	29
3.2	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche	34
3.2.1	Adsorptionsverhalten der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche	34

3.2.2	IRRA-spektroskopische Untersuchung der Protein/Peptidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche	37
3.3	Adsorption der Proteine und des Peptides an Lipidmonoschichten	47
3.3.1	Zeitabhängige Adsorption der Proteine und des Peptides an Monoschichten des Thylakoid-Lipidgemisches.....	47
3.3.2	Adsorption der Proteine und des Peptides an PG/SQDG- und an MGDG-Monoschichten	58
3.3.3	Zeitabhängige Adsorption der Proteine und des Peptides an POPC	60
3.4	Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von EGFP-Chimären mit komplexeren Peptidsequenzen	63
3.4.1	Adsorption von 16/EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten.....	63
3.4.2	Adsorption von PC/EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten.....	70
3.5	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse des Thylakoid-Systems.....	77
4	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen mit dem bakteriellen System	79
4.1	Physikalisch-chemische Lipidcharakterisierung der Lipide des polaren <i>E. coli</i> Extraktes an der Luft/Wasser-Grenzfläche	79
4.1.1	Druck/Flächen-Isothermen durch Filmwaagemessungen	79
4.1.2	IRRA-spektroskopische Untersuchung der Lipidmonoschichten	79
4.1.3	Epi-fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des polaren <i>E. coli</i> -Lipidgemisches.....	80
4.2	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche	85
4.2.1	Adsorption der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche	85
4.2.2	IRRA-spektroskopische Untersuchung der Protein/Peptidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche	87
4.3	Adsorption der Proteine und des Peptides an Lipidmonoschichten	91
4.3.1	Zeitabhängige Adsorption der Proteine und des Peptides an das polare <i>E. coli</i> -Lipidgemisch.....	91
4.3.2	Zeitabhängige Adsorption der Proteine und des Peptides an <i>E. coli</i> PG	99
4.4	Untersuchung des Adsorptionsverhaltens eines speziellen preHiPIP-Konstruktes an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten	106
4.4.1	Adsorption und IRRA-spektroskopische Analyse des Proteinfilms des preHiPIP mit Thrombinschnittstelle an der Luft/Wasser-Grenzfläche.....	106
4.4.2	Adsorption von preHiPIP mit Thrombinschnittstelle an Lipidmonoschichten	107

4.5	Untersuchung des Adsorptionsverhaltens des Tat-Substrates YcdB an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten.....	110
4.5.1	Adsorption und IRRA-spektroskopische Analyse der Proteinfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche	110
4.5.2	Adsorption der YcdB-Proteine und des Co-Faktors an Lipidmonoschichten..	112
4.6	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse des bakteriellen Systems.....	119
5	Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Messungen mit den Modellsubstraten für das thylakoidale und das bakterielle Tat-abhängige Translokationssystem.....	121
6	Ausblick	123
7	Zusammenfassung.....	125
8	Literaturverzeichnis.....	127

Abkürzungsverzeichnis

POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
MGDG	1,2-Diacyl-3- β -D-Galactopyranosyl- <i>sn</i> -Glycerol, (Monogalactosyldiacylglycerol)
DGDG	1,2-Diacyl-3(α -D-Galactopyranosyl-1-6- β -D-Galactopyranosyl)- <i>sn</i> -Glycerol, (Digalactosyldiacylglycerol)
SQDG	1,2-Diacyl-3(6-Sulfono- α -D-Quinovosyl- <i>sn</i> -Glycerol, (Sulfoquinovosyldiacylglycerol)
PC	1,2-Diacyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin, aus Soja
PE	1,2-Diacyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylethanolamin
PG	1,2-Diacyl-3- <i>sn</i> -Phosphatidylglycerol, (Diacylphosphatidylglycerol)
CL	1,1',2,2'-Tetraacyl-Cardiolipin
GFP	Green Fluorescent Protein (aus <i>Aequorea victoria</i>)
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
i16/EGFP	EGFP mit der thylakoiddirigierenden Domäne des Transitpeptides der 16 kDa Untereinheit des sauerstoff-entwickelnden Komplexes des Photosystems II
SP16	Signalpeptid, thylakoiddirigierende Domäne des Transitpeptides der 16 kDa Untereinheit des sauerstoff-entwickelnden Komplexes des Photosystems II
16/EGFP	EGFP mit dem Transitpeptid der 16 kDa Untereinheit des sauerstoff- entwickelnden Komplexes des Photosystems II
PC/EGFP	EGFP mit dem Transitpeptid des Plastocyanins
TatA	Untereinheit des Tat-spezifischen Translokationskomplexes
HiPIP	High Potential Iron Sulfur Protein (aus <i>Allochromatium vinosum</i>)
preHiPIP	HiPIP mit dem Tat-spezifischen Signalpeptid
Signalpeptid	Tat-spezifisches Signalpeptid des HiPIP
preHiPIP-Thr	HiPIP mit dem Tat-spezifischen Signalpeptid und spezifischer Schnittstelle für Thrombin
YcdB	Tat-spezifisches Substrat (aus <i>Escherichia coli</i>)
YcdB-Co-Faktor	Tat-spezifisches Substrat inkl. Co-Faktor
Häm	Co-Faktor des YcdB

BODIPY-C12-HPC	2-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-dodecanoyl)-1-Hexadecanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine
Rhodamin-DHPE	1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TFE	Trifluorethanol
DMSO	Dimethylsulfoxid
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
A	Fläche pro Molekül
π	Oberflächendruck
σ	Oberflächenspannung
L_{α}	lamellare, flüssig-kristalline Phase
H_{II}	invers-hexagonale Phase
G	gasanaloge Phase
LE	flüssig-expandierte Phase („liquid expanded“)
LC	flüssig-kondensierte Phase („liquid condensed“)
S	festanaloge Phase („solid“)
R	Probenspektrum
R_0	Reflektivitätsspektrum
RA	Reflexions-Absorptions-Spektrum
λ	Wellenlänge
k	Absorptionskoeffizient
n	Brechungsindex
d	Schichtdicke
b	Molekülbreite
l	Moleküllänge
θ	Neigungswinkel
Tat	Twin Arginine Translocation
OEC	oxygen-evolving complex
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Biologische Membranen und Zellen

Biologische Membranen sind die grundlegende Voraussetzung zur Bildung von lebensfähigen Zellen. Dabei sind sie nicht nur für die mechanische Abgrenzung und den Schutz gegenüber der Umwelt verantwortlich, sondern gewährleisten den Austausch von Stoffen und Informationen. Auch innerhalb der Zelle sind Membranen von Wichtigkeit. Sie dienen der Kompartimentierung und schaffen somit voneinander abgegrenzte Reaktionsräume. Die Grundstruktur aller Zellmembranen ist eine Lipiddoppelschicht, die sich aufgrund des bipolaren Aufbaus der Lipidmoleküle in einer wässrigen Umgebung spontan bildet. Je nach Lokalisation und Funktion in der Zelle bzw. nach Zelltyp ist die Lipiddoppelschicht aus verschiedenen Lipiden zusammengesetzt und mit membranassoziierten Proteinen unterschiedlicher Art und Anzahl ausgestattet. Membranen sind fluide Systeme in denen sowohl einzelne Lipide als auch Proteine innerhalb der Einzelschicht diffundieren können. Diese Beweglichkeit kann durch die Verbindung mit einem intrazellulären, der Unterstützung der Membran dienenden, Proteingerüst eingeschränkt sein.

In der Biologie unterscheidet sich der Aufbau einer Prokaryotenzelle grundlegend von dem einer Eukaryotenzelle. Auch innerhalb dieser Zelltypen gibt es verschiedene Arten von Zellen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll hier nur auf den Aufbau der für diese Arbeit relevanten Zelltypen eingegangen werden.

Die Pflanzenzelle gehört neben der tierischen Zelle zu den Eukaryotenzellen, d.h. sie besitzt einen echten Zellkern, in dem das Erbgut organisiert ist. Die Pflanzenzelle zeichnet sich durch einen hochkomplexen Aufbau aus. Sie beinhaltet eine Vielzahl von Organellen, die als Kompartimente für die komplizierten Stoffwechselreaktionen dienen. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist der Aufbau der Chloroplasten von besonderem Interesse (Abb. 1.1 A). In diesen Organellen finden photosynthetische Energietransferreaktionen und die Fixierung von Kohlenstoff statt. Chloroplasten sind von zwei Membranen umhüllt, die durch einen Intermembranraum separiert werden. Im Stroma befindet sich ein drittes, eigenständiges Membransystem – die Thylakoide. Die Thylakoidmembran umschließt das Lumen, lagert sich durch starke Faltung zu Granastrukturen und beherbergt alle Energie umwandelnden Systeme sowie das Chlorophyll.

Die *Escherichia coli*-Zelle (*E. coli*) ist ein Vertreter der Prokaryotenzellen, die keinen Kern beinhalten (Abb. 1.1 B). Das Erbgut liegt hier nicht in einem abgegrenzten Kompartiment vor.

Als Nucleoid bezeichnet, befindet sich ein einziges DNA-Molekül in freiem, häufig kondensiertem Zustand in der Zelle. Die einzigen Organellen der Prokaryotenzelle sind Ribosomen. *E. coli* zählt zu den gramnegativen Bakterien und besitzt damit ein komplexes, zellumschließendes Membransystem (Abb. 1.1 C). Die Zelle wird von zwei Membranen umhüllt, die im periplasmatischen Raum eine Schicht aus Peptidoglycan einschließen.

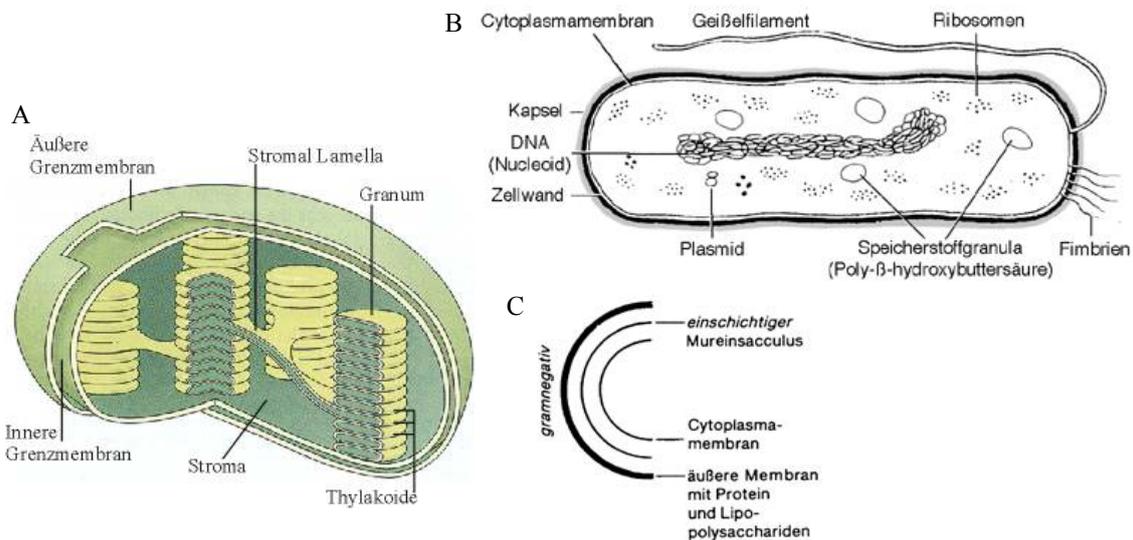


Abb. 1.1: Schematische Darstellung von A: Chloroplast (http://www.pi3.uni-stuttgart.de/SMG/bilder_homepage/lhcii_Chloroplast.jpg); B: Bakterium; C: Aufbau der Zellumantelung von gramnegativen Bakterien^[1].

1.2 Mechanismen des Membrantransportes

Lipiddoppelschichten sind für Ionen und große, polare Moleküle undurchlässig. Kleine, nichtpolare und sehr kleine, polare Moleküle können diese Barriere passieren. Für den Transfer von Ionen und komplexeren Verbindungen wie Nährstoffen und Metaboliten sind Membranproteine verantwortlich. Man unterscheidet Kanal- und Trägerproteine. Kanalproteine bilden eine wassergefüllte Pore in der Lipiddoppelschicht durch die Stoffe passiv diffundieren. Trägerproteine binden Stoffe und transportieren sie, durch die Veränderung ihrer Konformation, durch die Membran. Der Transport mit Hilfe der Trägerproteine kann aktiv oder passiv erfolgen. D.h. der Transport erfolgt entweder in Richtung des Konzentrations- bzw. elektrochemischen Gradienten (passiv) oder entgegengesetzt eines Konzentrations- bzw. elektrochemischen Gradienten unter Energieverbrauch (aktiv). Der aktive Membrantransport wird wiederum unterschieden in primären und sekundären, aktiven Transport. Beim primären, aktiven Transport sind der Translokationsprozess und der Energieverbrauch direkt aneinander gekoppelt. Der sekundäre,

aktive Transport ist dagegen indirekt mit dem Energieverbrauch verknüpft. In Pflanzen-, Pilz- und Prokaryotenzellen wird für die Energetisierung überwiegend der H^+ -Gradient genutzt.

1.3 Twin Arginin Translocation Pathway

1.3.1 Das pflanzliche Twin-Arginin-Translokations-System

In der Thylakoidmembran von Chloroplasten existieren vier voneinander unabhängige Systeme für den membranübergreifenden Proteintransport^[2, 3]. Sie sind charakterisiert als der spontane, der SRP- (signal recognition particle), der Sec- (sekretorisch) und der Tat- (twin arginine translocation) abhängige Transportweg, wobei der Sec- und der Tat-abhängige Weg der Translokation von Proteinen in das thylakoidale Lumen dienen. Von ihnen nimmt das Tat-System eine Sonderstellung ein. Es ist der einzige Transportweg, der eine Translokation von gefalteten und Co-Faktor tragenden Proteinen ermöglicht^[2, 4]. Das bedeutet, dass ein Transport auch von Proteinen möglich ist, die sehr schnell falten oder die im Stroma mit einem Co-Faktor versehen werden müssen um aktiv zu sein. Die Besonderheit des Transportes gefalteter Proteine wurde durch Creighton *in vitro* gezeigt^[5] und später durch Marques auch *in vivo* nachgewiesen^[6]. Eine Faltung des Targetproteins ist aber keine erforderliche Voraussetzung für den Tat-abhängigen Transport^[7].

Es ist bekannt, dass mehrere membranständige Proteine den Tat-Translokationskomplex bilden, an den das Target bindet und mit dessen Hilfe der Transport stattfindet. Verschiedene Gruppen entwickelten Modelle zur Wechselwirkung dieser membranständigen Proteine und schlugen einen Transportablauf für den Tat-abhängigen Translokationsprozess vor^[2, 8]. Als gesichert gilt, dass für den thylakoidalen Tat-abhängigen Transmembrantransport ein Signalpeptid an das zu transportierende Protein gekoppelt sein muss. Die Signalpeptide der Sec- und Tat-Substrate sind durch eine amino-terminale, basische Region, einen hydrophoben, zentralen Anteil und eine polare carboxy-terminale Region, die mit einer Ala-X-Ala-Prozessierungssequenz endet, charakterisiert. Die Besonderheit des Signalpeptides von Proteinen, die für den Tat-abhängigen Transportweg bestimmt sind, ist ein Aminosäurepaar von Argininen in der an den hydrophoben Abschnitt grenzenden N-terminalen Region. Dieses Charakteristikum ist der Namensgeber des Transportweges (Twin Arginine Translocase).

Das Tat-System wird aus drei Hauptkomponenten, den Membranproteinen TatA (Tha4)^[9, 10], TatB (Hcf106)^[11] und TatC (cpTatC)^[12] aufgebaut. Die Proteine TatA und TatB sind Homologe und weisen eine ähnliche Struktur auf. Sie sind durch eine N-terminale α -Helix in der Membran verankert. Dieser Abschnitt weist eine hohe Sequenzübereinstimmung zwischen

den beiden Proteinen auf. Eine weitere α -Helix und eine C-terminale Domäne ragen in das Stroma. In TatB sind diese Domänen länger verglichen mit denen von TatA. Die dritte Komponente, TatC, ist ein integrales Membranprotein mit sechs transmembranen α -Helices. Sowohl der Amino- als auch der Carboxyterminus ragen in das Stroma.

Die einzelnen Proteinuntereinheiten (TatA, TatB, TatC) bilden in der Membran zwei Subkomplexe. Die Proteine TatB und TatC formen einen ungefähr 700 kDa großen Rezeptorkomplex^[13]. Oligomere von TatA lagern sich zu einem separaten, losen Komplex zusammen, der mit dem Rezeptorkomplex assoziiert ist, wenn ein Proteintransport stattfindet^[14, 15].

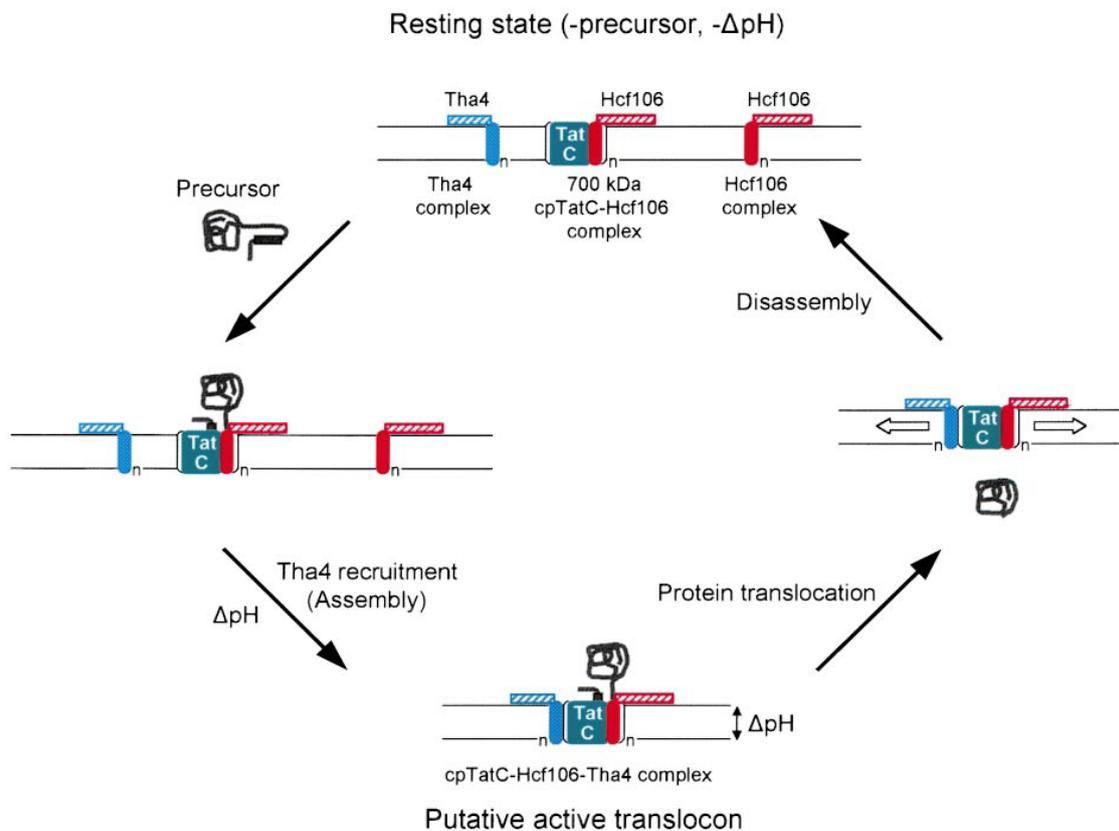


Abb. 1.2: Schematischer Translokationsablauf des Tat-abhängigen Transportweges (Erläuterung siehe Text)^[12].

Man stellt sich den Translokationsablauf folgendermaßen vor: Das mit dem Signalpeptid versehene Protein (Precursor) bindet an den TatBC Komplex; durch diesen Stimulus lagern sich TatA Oligomere an den Rezeptorkomplex und bilden vermutlich eine Art Translokationspore; das mit dem Signalpeptid versehene Protein wird transportiert, vom Komplex gelöst, das Signalpeptid wird abgespalten und das reife Protein in das Lumen entlassen; der TatA-Komplex zerfällt (Abb. 1.2)^[2, 8]. Ob TatA tatsächlich eine Pore oder einen Kanal bildet, wodurch der Proteintransport stattfindet, wird von einigen Autoren angezweifelt^[16, 17].

1.3.2 Das bakterielle Twin-Arginin-Translokations-System

Das bakterielle Tat-System ist dem pflanzlichen Tat-abhängigen System sehr ähnlich, was vermuten lässt, dass auch die jeweiligen Translokationsvorgänge ähnlich sind (Abb. 1.2). Die Untereinheiten TatA, TatB und TatC aus thylakoidalem und gramnegativem Systemen teilen eine hohe Sequenzhomologie. Viele grampositive Bakterien verfügen nur über TatA- und TatC-Proteine, die ein „Minimalsystem“ bilden^[18, 19]. TatA ist hier wahrscheinlich bifunktional und übernimmt die Aufgaben der gramnegativen TatA- und TatB-Proteine^[20].

Das am besten charakterisierte bakterielle System ist das aus *E. coli*. Berthelmann und Brüser zeigten, dass die Proteine des Translokationssystems nicht homogen in der Cytoplasmamembran verteilt sind^[21], wo sie den Transport vom Cytoplasma in das Periplasma vermitteln. Durch die Fusion der einzelnen Komponenten an GFP ermittelten sie, dass TatB und TatC vor allem an den Zellpolen lokalisiert sind, TatA dagegen in der gesamten Membran verteilt ist. Studien von Ray et al. ergaben zwar gleiche Lokalisationen für TatA und TatB, für TatC fanden sie allerdings ebenfalls eine homogene Verteilung in der Plasmamembran^[22]. Pop et al. fanden in *Bacillus subtilis*, dass TatA nicht nur in der Membran, sondern auch gelöst im Cytoplasma vorkommt und dort möglicherweise Chaperonfunktionen erfüllt^[23].

Die Proteine TatA und TatB sind relativ klein (9,6 kDa bzw. 18,4 kDa) und besitzen eine amino-terminale Transmembranhelix. Daran schließt sich eine kurze Linkerregion an, gefolgt von einer amphipatischen Helix und einem unstrukturierten, geladenen Carboxyterminus. Über die Membrantopologie des TatA-Proteins ist man sich nicht einig. Einige beschreiben, dass sich der N-Terminus im Periplasma, der C-Terminus dagegen im Cytoplasma befindet^[24, 25]. Gouffi et al. postulieren außerdem eine duale Topologie des Proteins^[24]. Hier soll auch die amphipatische α -Helix die Membran durchspannen können. Chan et al. andererseits beschreiben eine Struktur für TatA, bei der beide Termini ins Cytoplasma ragen^[26]. Es wurden zwar für die beiden Proteine TatA und TatB strukturelle Ähnlichkeiten gefunden, einander ersetzen können sie aber nicht^[27]. In *E. coli* existiert ein weiteres Protein, das TatA und TatB ähnlich ist – TatE. Es liegt monocistronisch, außerhalb des *tatABC* Operons vor. Es wird angenommen, dass es durch Gen-Duplikation des TatA entstanden ist. Beide Proteine stimmen in ihrer Sequenz zu über 50 % überein. Die Expression des Gens *tatE* kann das Fehlen des Proteins TatA kompensieren^[28]. Die größte Untereinheit des Tat-abhängigen Translokationssystems ist TatC mit 28,9 kDa. Ausgehend von der Primärstruktur wurden sechs Transmembranhelices vorhergesagt, wobei beide Termini in das Cytoplasma weisen^[29].

Wie im pflanzlichen System werden auch im bakteriellen System verschiedene funktionelle Komplexe abgebildet. In *E. coli* werden ein homooligomerischer TatA-Komplex, ein TatBC-Komplex, sowie in geringem Umfang ein TatABC-Komplex gefunden^[30]. Das Protein TatA kann Komplexe unterschiedlicher Größe (zwischen 50 und 500 kDa) bilden. Die Komplexe variieren in einer Größenordnung von etwa 34 kDa, was bedeutet, dass TatA in Modulen von 3 bis 4 Untereinheiten vorkommt. Man nimmt an, dass TatA eine Art Pore in der Membran bildet^[31]. Allerdings bleiben damit einige Fragen die Praktikabilität des Proteintransportes betreffend ungeklärt. Brüser & Sanders entwickelten theoretische Überlegungen einer alternativen Funktion von TatA, in denen das Protein keine Pore bildet, sondern durch die lokale Schwächung der Integrität der Membran einen Substratdurchtritt ermöglicht^[32]. Der TatBC-Komplex liegt in einer Größenordnung zwischen 350 und 600 kDa vor und die Proteine TatB und TatC kommen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vor. Wie auch im pflanzlichen System ist der TatBC-Komplex an der Substratbindung beteiligt^[33, 34]. Um als Substrat erkannt zu werden, müssen die Proteine, wie im pflanzlichen System, ein Signalpeptid tragen. Obwohl die Translokationskomplexe in grampositiven und gramnegativen Bakterien offensichtlich unterschiedlich sind, haben die Signalpeptide eine sehr ähnliche Struktur. Sie sind prinzipiell aus drei Domänen aufgebaut; eine polare N-terminale Region, eine hydrophobe, zentrale Domäne (H-Region) und die C-terminale Region, die mit einer spezifischen Ala-X-Ala-Sequenz endet. Dieses Motiv dient der Signalpeptidase als Schnittstelle. Das Twin-Arginine-Motiv ist in der Grenzregion zwischen der N- und H-Region lokalisiert. Es ist eingebettet in eine Konsensussequenz SRRxFLK, wobei x eine polare Aminosäure ist. Ein weiterer Unterschied zum pflanzlichen Signalpeptid ist, dass das Argininpaar nicht zwingend vorhanden sein muss. Verschiedene Eigenschaften der Signalsequenz sind wichtig für eine spezifische Erkennung durch das Tat-System. In vitro Assays haben gezeigt, dass die Energetisierung für den Transport ATP-unabhängig ist und wahrscheinlich von der protonen-motorischen Kraft ausgeht^[33].

1.4 Modellsubstrate

In dieser Arbeit wurden Studien zum Adsorptionsverhalten von verschiedenen Substraten an Lipidmonoschichten durchgeführt. Dabei wurden Wechselwirkungen zwischen Substrat und Lipiden in Abhängigkeit des Vorhandenseins bzw. Fehlens einer Peptidsequenz am Substrat, die für den Transport durch das Tat-Translokationssystem essentiell ist, und verschiedener Parameter der Lipidmonoschicht wie Zusammensetzung und Druck untersucht.

1.4.1 Modellsubstrate des Thylakoid-Systems

Es ist gezeigt worden, dass verschiedene Modellproteine über den Tat-abhängigen Weg transportiert werden können, wenn sie das entsprechende Signalpeptid tragen^[6]. Das für die Untersuchungen verwendete Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) ist eine Variante des Green Fluorescent Protein (GFP). Das in der Abb. 1.3 abgebildete GFP kommt in der im Pazifischen Ozean lebenden Qualle *Aequorea victoria* vor. Es emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$) wenn es durch ultraviolettes oder blaues Licht ($\lambda_{\text{max}} = 395 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 470 \text{ nm}$) angeregt wird^[35].

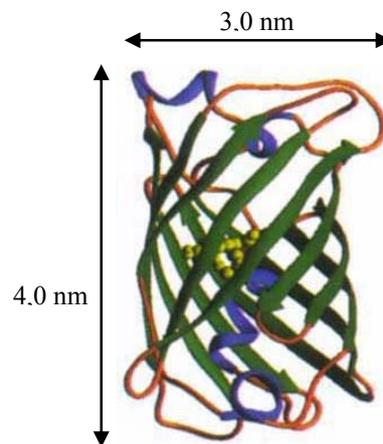


Abb. 1.3: Struktur des Green Fluorescent Protein GFP (pdb: 1GFL). Die Zylinderwände werden durch 11 β -Faltblattstränge (Grün) gebildet. Kurze α -helikale Abschnitte (Blau) befinden sich an den Zylinderenden und bilden das Gerüst für das Fluorophor (Gelb)^[36].

In der Qualle wird es durch das blau fluoreszierende Photoprotein Aequorin angeregt. GFP wird häufig als Fluoreszenzmarker z.B. zur Lokalisierung bestimmter Proteine oder der Bestimmung von Genaktivitäten benutzt. Um die farbliche Bandbreite und damit den Anwendungsbereich zu erweitern, wurden unterschiedliche Veränderungen des Proteins durch Mutationen erzeugt^[37], darunter auch das EGFP. Die Mutationen betreffen die Aminosäuren Phenylalanin64Leucin und Serin65Threonin. Diese bewirken eine Verschiebung der Anregungswellenlänge auf $\lambda = 488 \text{ nm}$ wobei das Emissionsmaximum bei $\lambda = 508 \text{ nm}$ liegt^[38]. Außerdem weist EGFP eine 35-fach verstärkte Fluoreszenz auf^[39].

Die verschiedenen chimären Formen des EGFP, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von Marques et al. für die Untersuchung von Transportprozessen über die thylakoidale Membran verwendet^[40]. An EGFP wurden Transitpeptide verschiedener Chloroplastenproteine, unter anderem das Transitpeptid der 16 kDa Untereinheit des sauerstoff-entwickelnden Komplexes (oxygen evolving complex – OEC) des Photosystems II (PSII-Q) und das Transitpeptid des Plastocyanins (PC), fusioniert. Beide Peptide weisen

jeweils eine die Translokation ins Stroma des Chloroplasten vermittelnde Domäne und eine den Transport ins Lumen der Thylakoide dirigierende Region auf^[41]. Die Transitpeptide unterscheiden sich durch die spezifische Nutzung bestimmter Transportwege über die Thylakoidmembran, wobei die thylakoiddirigierende Region des PSII-Q für den Tat-Weg und die des PC für den Sec-Weg spezifisch ist^[3]. Die chimären Proteine werden als 16/EGFP und PC/EGFP bezeichnet. Ist von 16/EGFP die erste Domäne abgespalten und verfügt damit nur noch über die thylakoiddirigierende Domäne, wird das Protein i16/EGFP (i steht für Intermediat) genannt (Abb. 1.4).

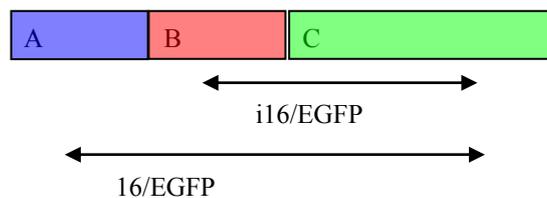


Abb. 1.4: Schema chimärer Formen des EGFP. A: chloroplastendrigierende Domäne; B: thylakoiddirigierende Domäne; C: Substrat.

Das für die Untersuchungen verwendete Signalpeptid SP16 ist, wie oben beschrieben, der thylakoiddirigierende Teil des Transitpeptides des sauerstoff-entwickelnden Komplexes im Photosystem II. Es besteht aus 31 Aminosäuren und beinhaltet das charakteristische Argininpaar (Abb. 1.5). Es wurde von BACHEM synthetisiert.

AEAETSRRAMLGFVAAGLASGSFVKAVLASA

Abb. 1.5: Aminosäuresequenz des für den thylakoidalen, Tat-abhängigen Weg spezifischen Signalpeptides (SP16) der 16 kDa Untereinheit des OEC. Rot: Twin-Arginin-Motiv.

1.4.2 Modellsubstrate des *E. coli*-Systems

Das High Potential Iron Sulfur Protein (HiPIP) kommt natürlicher Weise hauptsächlich in phototrophen Bakterien vor, wurde aber auch in nicht phototrophen Organismen nachgewiesen^[42-44]. Mitglieder der HiPIP-Familie zeigen eine geringe Homologie der Primärsequenz aber ihre Tertiärstruktur ist jeweils sehr ähnlich^[45]. Die dreidimensionale Struktur wurde durch NMR und Röntgenstreuung untersucht und publiziert (Abb. 1.6)^[46, 47]. Vertreter der HiPIP-Familie sind 7-9 kDa groß und tragen einen Eisen-Schwefel-Komplex, welcher als Elektronenaustauscher bei hohen Redoxpotentialen (zwischen +50 bis +450 mV) fungiert^[45]. Es wurde gezeigt, dass HiPIP in *E. coli* expremiert^[48, 49] und dass das Protein durch den Tat-abhängigen Weg in *E. coli* transportiert werden kann^[50].

In dieser Arbeit wurden sowohl die reine Form des Proteins (HiPIP) als auch eine mit dem Tat-spezifischen Signalpeptid versehene Variante (preHiPIP) verwendet^[50]. Das in dieser

Arbeit verwendete, monomere HiPIP ist 9 kDa groß. Der [Fe₄S₄]-Komplex ist über vier Cysteine gebunden^[47, 51]. Das Protein faltet und bindet den Co-Faktor bevor es in den periplasmatischen Raum transportiert wird.

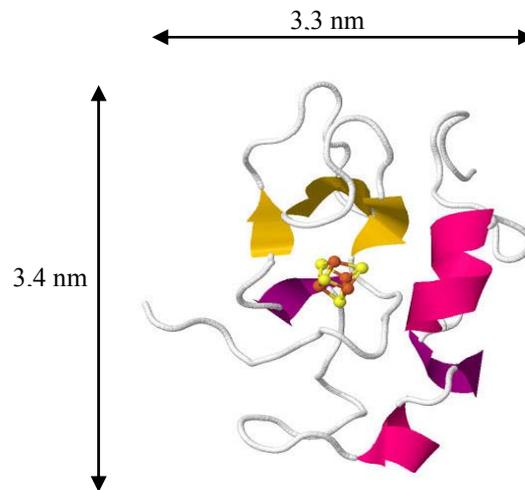


Abb. 1.6: Struktur des High Potential Iron Sulfur Protein HiPIP (pdb: 1NEH) inklusive Eisen-Schwefel Komplex^[46]. Die Sekundärstrukturanteile sind farbig hervorgehoben: Magenta und Violett: α -Helices; Gelb: β -Faltblätter.

Das Signalpeptid ist aus 36 Aminosäuren aufgebaut und wurde synthetisch hergestellt (Kap. 2.1.2.4).

SDKPISKSRRDAVKVMLGTAAAIPMINLVGFGTARA

Abb. 1.7: Aminosäuresequenz des Tat-spezifischen Signalpeptides des HiPIP. Rot: Twin-Arginin-Motiv.

YcdB ist ein periplasmatisches Hämoprotein und ist ~45 kDa groß. Es wurde von Sturm et al. als erstes Mitglied dieser Gruppe als Tat-Substrat in *E. coli* identifiziert. Als prosthetische Gruppe enthält es einen Protoporphyrin IX Komplex (~ 0,6 kDa), welcher unabhängig von der Interaktion mit dem Tat-Translokationskomplex wahrscheinlich im Cytoplasma gebunden wird. Die Funktion des Proteins ist unbekannt. Womöglich fungiert es als Peroxidase unter Säurestress^[52].

1.5 Lipidmodellsysteme

Aufgrund der Komplexität der Struktur biologischer Membranen ist es schwierig einzelne Prozesse, wie Bindung und Transport von Molekülen an bzw. durch Membranen, gezielt im biologischen System zu untersuchen. Um diese Prozesse zu studieren, werden häufig

Modellmembranen eingesetzt. In solchen Modellmembranen können Parameter wie z.B. Temperatur, Druck oder die Lipidzusammensetzung leicht variiert werden.

In allen Membranen ist das grundlegende Aufbauprinzip einer molekularen Doppelschicht zu beobachten. Diese Gleichförmigkeit wird durch die amphipathischen Eigenschaften und der damit verbundenen Fähigkeit der Lipide in wässriger Umgebung spontan in bestimmte Strukturen zu assoziieren, verursacht. Die Lipide orientieren sich dabei so, dass die hydrophilen Teile mit Wasser in Interaktion treten können. Die hydrophoben Anteile werden dagegen möglichst so angeordnet, dass sie nicht in Kontakt mit dem umgebenden Wasser kommen. Diesem Phänomen liegt der von Tanford beschriebene hydrophobe Effekt zugrunde^[53].

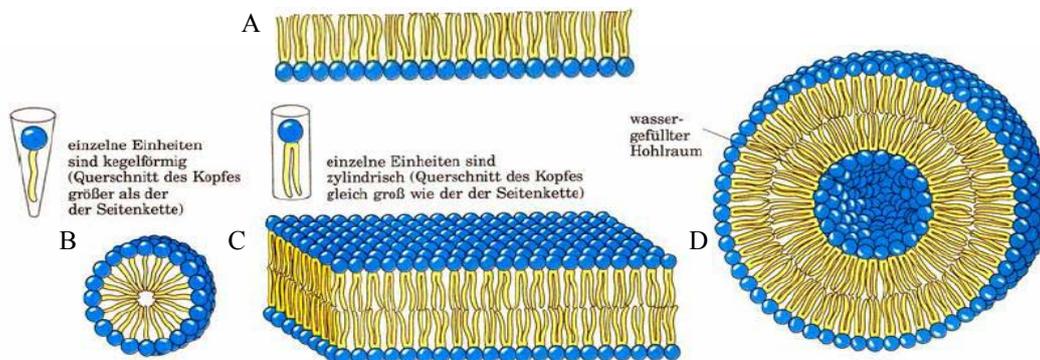


Abb. 1.8: Schematische Darstellung verschiedener Organisationstypen von Lipiden. Die Ausbildung der unterschiedlichen Strukturen ist u. a. von der Geometrie der Lipidmoleküle abhängig. A: monomolekulare Lipidschicht; B: Mizelle; C: planare Membran; D: unilamellares Vesikel. Modifiziert nach Lehninger et al.^[54].

Aufgrund der Fähigkeit der Selbstorganisation von Lipidmolekülen in wässriger Umgebung bilden sich in Abhängigkeit der strukturellen Eigenschaften der Lipide, der Lösungsmittelverhältnisse (lyotrope Mesomorphie) und der Temperatur (thermotrope Mesomorphie) verschiedene Strukturen, die sich als Modellmembranen eignen (Abb. 1.8).

In dieser Arbeit wurde das Modellsystem einer monomolekularen Lipidschicht verwendet (Abb. 1.8 A)^[55-57].

Monoschichten werden durch die Präparation von Lipidlösungen auf der Oberfläche wässriger Phasen gebildet, wobei sich die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide zum Wasser, die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten zur Luft ausrichten. Strukturell entspricht dieses Modell einer Hälfte der Lipiddoppelschicht einer biologischen Membran. In dieser Arbeit wurden Monoschichten zur Charakterisierung der verwendeten Lipide und zur Untersuchung der Wechselwirkungen von in der Subphase gelösten Substanzen mit den Lipiden verwendet.

1.6 Lipide

1.6.1 Lipide der Thylakoid-Lipidmembran

Die Lipide Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), Digalactosyldiacylglycerol (DGDG), Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) und Diacylphosphatidylglycerol (PG) sind die vier Lipidhauptbestandteile der thylakoidalen Membran (Abb. 1.9), außerdem enthalten sind die Lipide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylinositol (PI)^[58, 59].

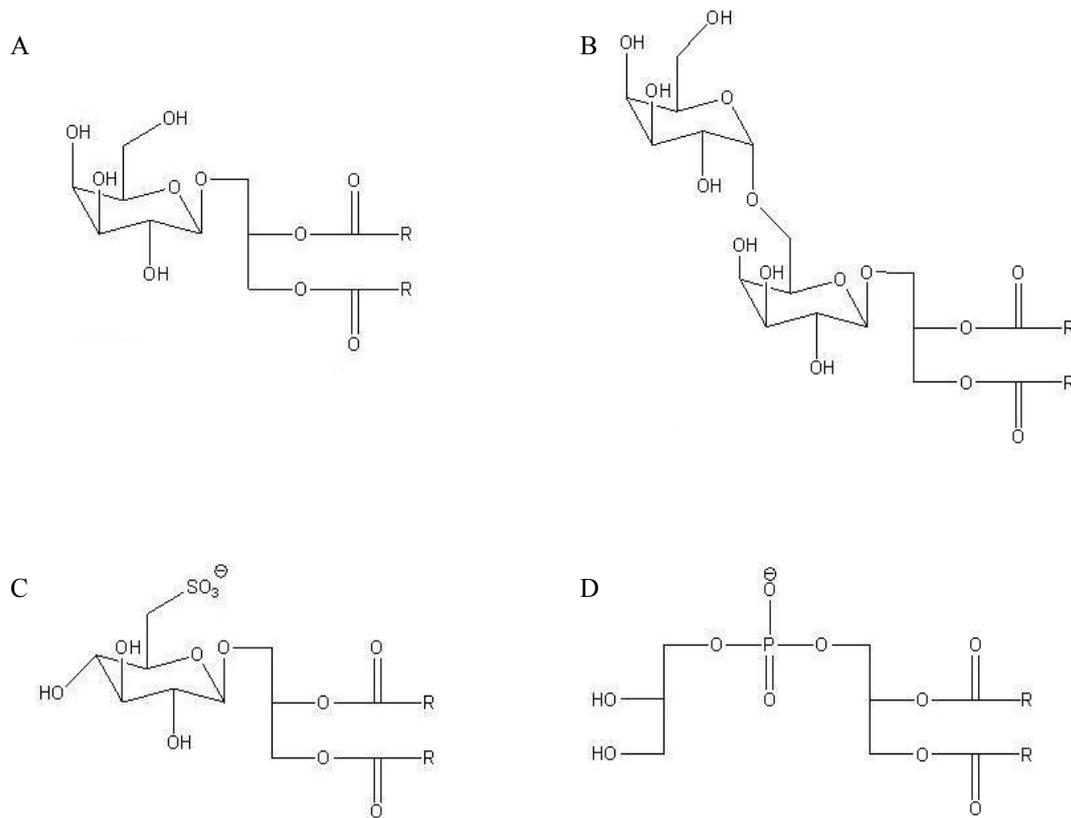


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der verwendeten thylakoidalen Lipide. A: Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG); B: Digalactosyldiacylglycerol (DGDG); C: Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG); D: Diacylphosphatidylglycerol (PG). Die Acylketten werden durch den Buchstaben R wiedergegeben.

Die Hauptkomponente MGDG bildet invers-hexagonale Phasen (H_{II}), wohingegen die Lipide DGDG, SQDG und PG lamellare Phasen ausbilden^[60-62]. Die Eigenschaft von MGDG H_{II} -Phasen zu bilden, ist essentiell für die Bildung der Granastrukturen des thylakoidalen Systems^[63], dabei interagieren die Lipide untereinander aber auch mit Membranproteinen. Es ist bekannt, dass einzelne Lipidmoleküle Interaktionen mit Membranproteinen eingehen und direkte funktionelle Aufgaben im Zusammenhang mit den Aufgaben der Proteine übernehmen^[64]. Die Kohlenwasserstoffketten der Glycolipide aus photosynthetisch aktiven Geweben der höheren Pflanzen sind zum größten Teil mehrfach ungesättigt. Hauptsächlich

kommen 9,12,15-Octadecatriensäure ($\Delta^{9,12,15}$ -18 : 3) und 7,10,13-Hexadecatriensäure ($\Delta^{7,10,13}$ -16 : 3) vor^[58].

Eine umfassendere, biophysikalische Untersuchung der zwei häufigsten Lipide der Thylakoidmembran, MGDG und DGDG, wurde durch Bottier et al. vorgenommen^[65]. Die Druck/Flächen-Isotermen (π/A -Isothermen) zeigen, dass die Lipide in der flüssig-expandierten Phase vorliegen. Unter dem Rasterkraftmikroskop (AFM) wurde ein homogener MGDG-Film bei 15 mN m^{-1} , aber eine Separation in ungleichmäßige Domänen bei 35 mN m^{-1} gemessen, wohingegen der DGDG-Film über den gesamten Druckbereich homogen erscheint. Ellipsometrische Messungen ergaben eine größere Schichtdicke von DGDG-Monoschichten gegenüber MGDG-Monoschichten. Durch Polarisations-Modulations-Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (PM-IRRAS) wurden eine parallele Orientierung der Monogalactosylgruppen der MGDG-Moleküle im Bezug auf die Grenzfläche und eine Neigung von 40° der Digalactosylgruppen der DGDG-Moleküle im Bezug zur Oberflächennormalen ermittelt. Außerdem wurde ein geringerer Hydratationsgrad der MGDG-Moleküle gegenüber den DGDG-Molekülen mittels Raman-Spektroskopie festgestellt. Mittels Röntgenstreuung wurde das schon früher durch Brentel et al. und Webb et al. publizierte unterschiedliche Phasenverhalten der Lipide in Wasser bestätigt^[61, 62].

1.6.2 Lipide der Cytoplasmamembran von *E. coli*

Die Cytoplasmamembran von *E. coli* ist hauptsächlich aus den Lipiden Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Kardiolipin (CL) aufgebaut^[66] (Abb. 1.10).

Die Kettenlänge der Acylketten variiert in einer breiten Verteilung (Tab. 1.1). In der Literatur ist eine ausführliche biophysikalische Betrachtung dieser Lipide bzw. deren Gemische nicht zu finden. Clausell et al. veröffentlichten π/A -Isothermen des totalen Lipidextraktes von *E. coli*, der die Zusammensetzung PE/PG/CL/Unbekannt 57:15:10:18 mol-% und ein flüssig-expandiertes Phasenverhalten aufweist^[67].

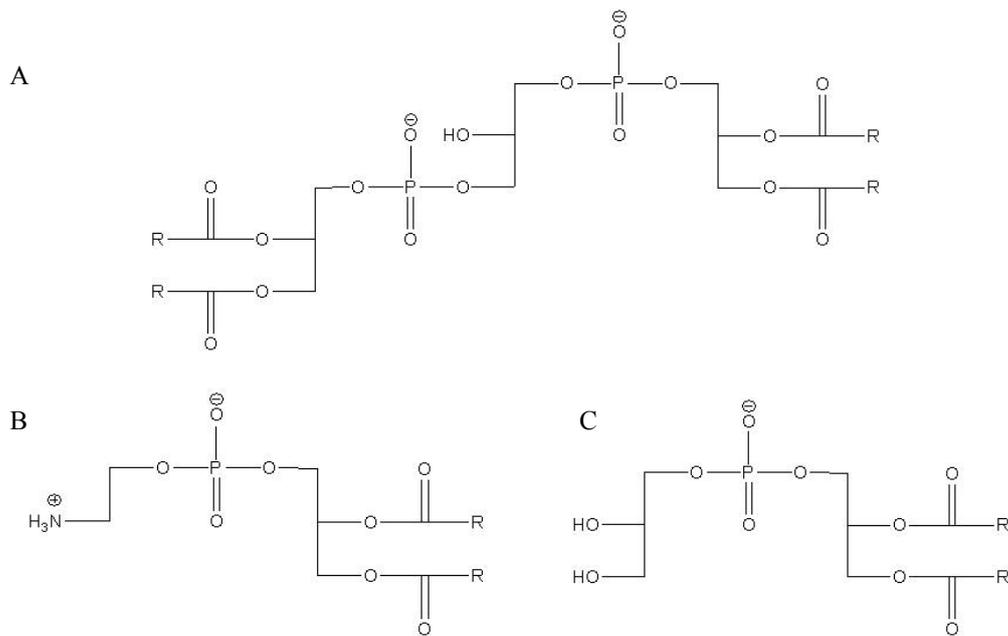


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der verwendeten Lipide der Cytoplasmamembran von *E. coli*. A: Kardiolipin (CL); B: Phosphatidylethanolamin (PE); C: Phosphatidylglycerol (PG). Die Acylketten werden durch den Buchstaben R wiedergegeben.

Acylkettenlänge	PE	PG	CL
14 : 0	1,5	1,6	2,2
15 : 0	/	1,2	4,8
16 : 0	33,6	43,6	33,3
16 : 1	9,3	7,4	10,2
17 : 0	17,7	27,3	28,4
18 : 0	/	0,4	/
18 : 1	34,1	9,8	14,4
19 : 0	3,8	5,6	5,3
unbekannt	/	3,2	1,4

Tab. 1.1: Fettsäureverteilung der verschiedenen *E. coli* Einzellipide. <http://www.avantilipids.com/>.

1.7 Aufgaben und Ziele

Ziel der Arbeit war es, die ersten Schritte des Twin-Arginin-Transportweges (Tat-Weg) zu charakterisieren. Dieser Transportweg nimmt eine Sonderstellung unter den verschiedenen, bekannten Translokationsmechanismen über Membranen ein. Er ist der einzige Weg über den nativ gefaltete und Co-Faktor tragende Proteine transportiert werden können. Es ist bekannt, welche membranständigen Proteine in diesem Translokationsvorgang involviert sind und auch welche Voraussetzungen das zu transportierende Protein erfüllen muss. Außerdem ist bekannt, dass vor dem Transport ein spezifischer Erkennungs- und Bindungsvorgang zwischen zu transportierendem Protein und dem membranständigen Translokationskomplexes stattfindet. Eine der wichtigsten zu beantwortenden Fragen ist, ob vor dieser spezifischen Erkennung und Bindung unspezifische Wechselwirkungen des Proteins mit den Membranlipiden vorhanden sind, die die Bindung an den Translokationskomplex vorbereiten.

Da das Tat-spezifische Transportsystem sowohl in Chloroplasten pflanzlicher Zellen als auch in einigen Bakterien vorkommt, sind die Untersuchung der Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der frühen Schritte des Transportes durch beide Systeme ebenfalls von Interesse.

2 Experimenteller Teil

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chloroform und Methanol: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland.

Salze und Puffer: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland.

20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 (Puffer I)

20 mM Tris, pH 8,0 (Puffer II)

20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0

Fluoreszenzfarbstoffe: Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland.

Hellmanex: Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland.

2.1.2 Lipide und Proteine/Peptide

2.1.2.1 Thylakoid-Lipide

Die thylakoidalen Lipide wurden von Lipid Products (South Nutfield, Redhill, UK) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Die Lipide MGDG, DGDG, SQDG und PG wurden in Lösung geliefert. Durch die Zugabe dieser Stammlösung zu Chloroform wurden die Lösungen der gewünschten Konzentration hergestellt. Die Gemische wurden aus den genannten Einzelkomponenten hergestellt und hatten folgende Zusammensetzung:

Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55:27:7:11 mol-%)

Anionisches Lipidgemisch (SQDG/PG 39:61 mol-%)

Chloroplasten-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG/PC 18:31:6:11:34 mol-%)

2.1.2.2 *E. coli*-Lipide

Die *E. coli* Lipide PE, PG, CL, sowie die verschiedenen Lipidgemische (s.u.) wurden von Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama, USA) bezogen und ohne weiter Reinigung verwendet. Die Lösungen wurden durch Einwiegen des Pulvers und Auflösen in Chloroform/Methanol hergestellt. Die Gemische waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Gesamtlipidextract	(PE/PG/CL/Unbekannt 57:15:10:18 mol-%)
polarer Lipidextract	(PE/PG/CL 67:23:10 mol-%)

Außerdem wurden die Lipide POPC und PC aus Soja ebenfalls von Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama, USA) verwendet. Auch diese Lipide wurden ohne zusätzliche Aufreinigung benutzt und die Lösungen durch die Einwaage des Pulvers und Auflösen in Chloroform/Methanol hergestellt.

2.1.2.3 Proteine/Peptide für das Thylakoid-System

Die verschiedenen Proteine (EGFP, i16/EGFP, 16/EGFP, PC/EGFP) für die Wechselwirkungsstudien wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. B. Klösgen (Institut für Biologie, Pflanzenphysiologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg) bereitgestellt. Sie befanden sich in Lösung (in Puffer I, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) und wurden ohne weitere Behandlung eingesetzt. Das Peptid (AEAETSRRAMLGFVAAGLASGSFVKAVLASA) wurde von BACHEM (Bubendorf, Schweiz) synthetisiert und lag als Feststoff vor. Für die Experimente wurde es in Trifluor-ethanol (TFE) bzw. Puffer unter der Zugabe von TFE (99,8 mol-% Puffer I mit 0,2 mol-% TFE bzw. 99,2 mol-% Puffer I mit 0,8 mol-% TFE) gelöst.

2.1.2.4 Proteine/Peptide für das *E. coli*-System

Die verschiedenen Proteine (HiPIP, preHiPIP, preHiPIP-Thr, YcdB, YcdB-Co-Faktor), sowie der Co-Faktor des YcdB wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. T. Brüser (Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover) bereitgestellt. Die Proteine befanden sich in Lösung und wurden ohne weitere Behandlung eingesetzt. Das Signalpeptid (SDKPISKSRRAVAVMLGTAAAIIPMINLVGFGTARA) wurde von Dr. Miroslav Malešević (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) in einem SYRO II MULTISYNTECH Peptidsynthesizer unter Verwendung eines Fmoc-Ala-Wang-Harzes mittels Fmoc-Chemie synthetisiert^[68] und bereitgestellt. Das Peptid und der Co-Faktor lagen als Feststoff vor und wurden in Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bzw. DMSO gelöst.

2.2 Methoden und experimenteller Versuchsaufbau

2.2.1 Filmwaage

Die Filmwaage ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften von Monoschichten amphiphiler Moleküle^[55], wobei sich Parameter wie Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert u.s.w. der Subphase sehr gut einstellen und variieren lassen. So kann die Abhängigkeit des lateralen Oberflächendruckes des Films bzw. der Fläche pro Lipidmolekül von diesen Parametern festgestellt werden. Auch der Einfluss anderer Substanzen durch die Zugabe in die Subphase kann so festgestellt werden.

Für die verschiedenen Experimente wurden unterschiedliche Filmwaagetypen benutzt (siehe dazu Kap. 2.2.1.1 und 2.2.1.2). Die Tröge aller Filmwaagen waren mit Teflon beschichtet oder aus diesem hergestellt, durch einen Thermostaten (Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland) temperierbar und durch einen Überbau aus Plexiglas abdeckbar. Vorhandene Barrieren sind ebenfalls aus Teflon und computergesteuert.

Die Tröge wurden nach Bedarf mit Hellmanex gereinigt und anschließend mehrfach mit Reinstwasser gespült. Die wässrige Subphase wurde in den Trog gefüllt und der entsprechende Füllstand eingestellt. Auf die Oberfläche dieser Subphase wurde die Lipidlösung „gespreitet“, d.h. die Lösung wurde tropfenweise mit Hilfe von Dosierspritzen (Hamilton Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) auf der Oberfläche aufgetragen. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels bildet sich eine Lipidmonoschicht.

Der Oberflächendruck π kann aus der Reduktion der Oberflächenspannung σ nach der Gleichung:

$$\pi = \sigma_0 - \sigma$$

berechnet werden. D.h. π ist als Differenz zwischen der Oberflächenspannung des Wassers ohne (σ_0) bzw. mit Lipidfilm (σ) definiert. Der Oberflächendruck π wurde über ein Filterpapierblättchen durch ein Wilhelmy-Messsystem aufgenommen („RuK trough control“, Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Deutschland) und mit einer Origin Software (ADDITIVE GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland) ausgewertet. Das Filterpapierblättchen wurde nach jeder Adsorptionsmessung mit Proteinen/Peptiden ausgetauscht.

Die Filmwaagetechnik ermöglicht die verfügbare Fläche pro Molekül auf der Subphase kontinuierlich zu verändern und damit das Kompressionsverhalten der Monoschicht zu bestimmen und in einem Phasendiagramm darzustellen (Abb. 2.1).

Für die „gespreitete“ Monoschicht können je nach der Lipidkonzentration (Fläche pro Molekül) gas-, flüssig- oder festanaloge Phasen unterschieden werden. Die sich ausbildenden Phasenzustände werden nach der Nomenklatur von Adamson benannt^[56] (Abb. 2.1).

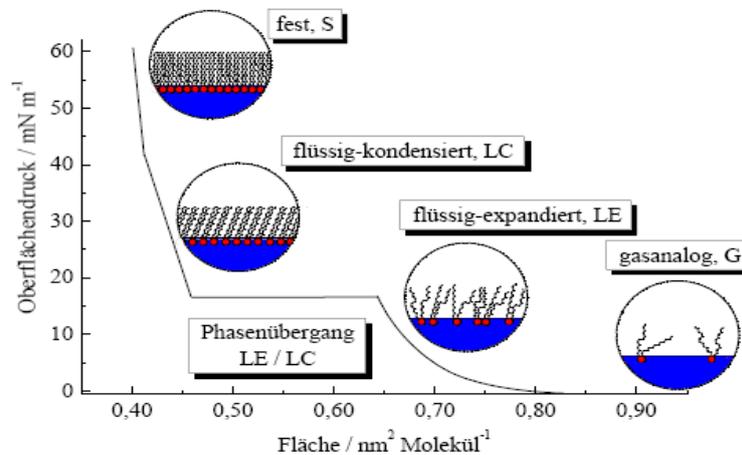


Abb. 2.1: Vereinfachte π/A -Isotherme eines Lipids mit zwei Acylketten mit schematischer Darstellung der Molekülorganisation in den einzelnen Phasen^[69].

Mit einer Fläche von mehreren Quadratnanometern je Molekül liegt der Film als zweidimensionales Gas (G) vor, in dem keine Wechselwirkung zwischen den amphiphilen Molekülen stattfindet. Mit zunehmender Verringerung der Flächen pro Molekül kommt es zu einem Übergang zur flüssig-expandierten Phase (LE), in der die Ketten wie in der Gasphase ungeordnet sind aber zunehmend miteinander wechselwirken. In der flüssig-expandierten Phase kommt es zu einem Druckanstieg, bis die Phase sich bei einem konstanten Oberflächendruck in einem Phasenübergang erster Ordnung in die flüssig-kondensierte Phase (LC) umwandelt^[70-72]. Bei weiterer Verringerung der Fläche pro Lipidmolekül deutet ein Knick in der Isotherme einen kontinuierlichen Übergang von der flüssig-kondensierten in die festanaloge Phase (S) an^[73, 74]. Wird der Film weiter komprimiert (in der Abbildung nicht dargestellt) kommt es zum Kollaps der Monoschicht. Das bedeutet eine irreversible Zerstörung des Films, da sich einzelne Moleküle oder Molekülgruppen übereinander schieben oder in die Subphase abtauchen.

2.2.1.1 Druck/Flächen-Isothermen (π/A -Isothermen)

Für die Messung der π/A -Isothermen wurde eine sehr große Filmwaage (783 x 68,4 x 3 mm³, Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Nach dem Reinigen des Troges und der Befüllung mit der Subphase wurde das Lipid auf die Subphasenoberfläche aufgetragen. Die gespreitete Menge der Lipidlösung wurde jeweils so gewählt, dass die aufgetragene Lipidschicht in der gas-analogen Phase bzw. im Übergangsbereich zwischen gas-analoger und flüssig-expandierter Phase vorliegt und noch kein Oberflächendruck messbar ist.

Nach einer Equilibrierungszeit von ~ 10 min wurde der Film mit einer konstanten Geschwindigkeit von $0,02 \text{ nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1} \text{ Minute}^{-1}$ bis zum Kollaps komprimiert.

2.2.1.2 Zeitabhängige Adsorptionsmessungen

Für die zeitabhängigen Adsorptionsmessungen von Proteinen/Peptiden an Lipidmonoschichten wurde eine selbstgebaute Filmwaage ($113,85 \times 25,2 \times 5,5 \text{ mm}^3$), die über eine Barriere zur Flächenregulation verfügt, verwendet. Nach der Präparation des Lipidfilms auf der entsprechenden Subphase wurde durch Kompression (s.o.) ein bestimmter Oberflächendruck eingestellt, der durch die computergesteuerte Variation der Fläche konstant gehalten wurde. Nach dem Erreichen des gewünschten, lateralen Druckes wurde ein bestimmtes Volumen der Protein/Peptidlösung durch eine Bohrung direkt in die Subphase injiziert. Die Protein/Peptidkonzentration im Trog betrug dann 100 nM . In Einzelfällen wurde eine höhere Konzentration des Proteins/Peptides in der Subphase durch die Zugabe eines entsprechend größeren Volumens der Stammlösung erreicht. Während der Injektion wurde die Subphase durchmischt, um eine Verteilung der Protein/Peptidlösung im Trog zu gewährleisten. Danach wurde die Änderung der Fläche als Funktion der Zeit gemessen.

Zusätzlich wurden zeitabhängige Adsorptionsmessungen von Proteinen/Peptiden an Lipidmonoschichten mit einer sehr einfachen, ebenfalls selbstgebauten, runden Variante der Filmwaage ohne mobile Barrieren durchgeführt ($\text{Ø } 30 \text{ mm} \times 13,9 \text{ mm}$). In diesem Fall wurde die Druckänderung nach der Injektion der Protein/Peptidlösung in die Subphase in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Der entscheidende Vorteil dieser Filmwaage ist das geringe Subphasenvolumen, woraus ein ebenfalls geringes Injektionsvolumen der Protein/Peptidlösungen resultiert. Nach dem Reinigen des Troges und der Befüllung mit der entsprechenden Subphase wurde der Lipidfilm gespreitet. Durch die Variation des Spreitvolumens wurden Lipidfilme mit verschiedenen Oberflächendrücken hergestellt. Nach der Equilibrierungsphase wurde die Protein/Peptidlösung ebenfalls durch eine Bohrung injiziert. Während der gesamten Messung wurde die Subphase kontinuierlich durchmischt. Aufgrund der Trogtiefe konnte eine störende Einwirkung auf die Grenzschicht ausgeschlossen werden. Allerdings muss beachtet werden, dass das Rühren eine beschleunigende Wirkung auf den Adsorptionsprozess haben könnte.

Bestimmung des maximalen Einbaudruckes

Mit den Werten der Oberflächendruckänderungen ($\Delta\pi$ -Werte) nach der Proteininjektion kann in Abhängigkeit vom Ausgangsdruck der maximale Einbaudruck ermittelt werden^[75, 76]. Dafür wurden die $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Protein/Peptidinjektion gegen die Startdrücke

aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Durch das Ablesen des Schnittpunktes dieser Geraden mit der x-Achse wird der maximale Einbaudruck ermittelt. Der maximale Einbaudruck eines Proteins/Peptides gibt an, bis zu welchem Oberflächendruck der Monoschicht ein Einbau des Proteins/Peptids erfolgt. Ist dieser Wert größer als der Monolayer-Bilayer Äquivalenzdruck ($\sim 30 \text{ mNm}^{-1}$)^[77] kann angenommen werden, dass das Protein/Peptid in der Lage ist spontan in Membranen zu insertieren.

2.2.1.3 Oberflächenaktivität von Proteinen/Peptiden

Die Oberflächenaktivitätsmessungen wurden ebenfalls in der runden Filmwaage durchgeführt (s.o.). Es wurde vor der Injektion der Protein/Peptidlösung kein Lipidfilm präpariert. Ferner gleicht der Versuchsaufbau dem der zeitabhängigen Adsorptionsmessungen an Lipidmonoschichten (s.o.).

2.2.2 Infrarot Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)

Das Verhalten von Lipidmodellmembranen und Peptid/Proteinfilmern kann mittels IR-Spektroskopie untersucht werden^[78-82]. So können sowohl qualitative als zum Teil auch quantitative Aussagen über die Struktur und das Phasenverhalten von Modell- und Biomembranen gewonnen werden.

Der theoretische Hintergrund dieser Methode liegt in der Anregung und Registrierung einzelner Molekülschwingungen der zu untersuchenden Verbindung. Dafür wird die Probe mit Licht aus dem infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums bestrahlt. Dabei werden diejenigen Wellenlängen dieses Teilspektrums absorbiert, die in der Lage sind, Schwingungsübergänge im Molekül anzuregen. Ein Absorptionsspektrum ist für die chemische Struktur des untersuchten Moleküls spezifisch. Kleine Änderungen in den Bindungsverhältnissen, wie Konformationsänderungen des Moleküls z. B. durch Wechselwirkungen mit einem Substrat, wirken sich auf die Schwingungsfrequenz aus und verändern damit die Wellenlänge des absorbierten Lichtes.

Bei der Betrachtung von Lipiden sind die C-H-Streckschwingungen ($3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$) für die Konformation der Kohlenwasserstoffketten und C=O-Streckschwingungen ($1200\text{-}1315 \text{ cm}^{-1}$) für die Hydratation der Kopfgruppe charakteristisch. Andere wichtige Schwingungsbanden sind in der Tab. 2.1 aufgelistet.

Zuordnung	Wellenzahl [cm^{-1}]	Symbol
C-H-Vinylschwingung	~3000	$\nu(\text{C}=\text{CH}_2)$
Methylstrettschwingung	2800 - 3000	$\nu(\text{CH}_3)$
Antisymmetrische Methylenstrettschwingung	2916 – 2936	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
Symmetrische Methylenstrettschwingung	2843 – 2863	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
Carbonylstrettschwingung	1800 - 1650	$\nu(\text{C}=\text{O})$
Methylendeformationsschwingung	1465 – 1473	$\delta(\text{CH}_2)_n$
C-O Strettschwingung	1315- 1200	$\nu(\text{C-O})$
Antisymmetrische SO_3 -Strettschwingung	1355 – 1340	$\nu_{\text{as}}(\text{SO}_3)$
Symmetrische SO_3 -Strettschwingung	1165 - 1150	$\nu_{\text{s}}(\text{SO}_3)$
Antisymmetrische PO_2^- -Strettschwingung	1200 – 1260	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
Symmetrische PO_2^- -Strettschwingung	1085 – 1110	$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$

Tab. 2.1: Zuordnung wichtiger IR-aktiver Schwingungsbanden von Lipiden^[81, 83].

Peptide bzw. Proteine weisen mehrere charakteristische Absorptionsbanden auf, von denen die aussagekräftigste die Amid I Bande ist ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$). Dieser Bande liegt im Wesentlichen die C=O Strettschwingung zugrunde. Die Frequenzlage und Bandenform hängen von der Sekundärstruktur des Peptids/Proteins ab (Tab. 2.2). Die Amid II Bande resultiert hauptsächlich aus den C-N-H-Deformationsschwingung und C-N Strettschwingung ($1580\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$) und enthält ebenfalls Informationen über die Sekundärstruktur des Moleküls.

Sekundärstruktur	Amid-I-Bande [cm^{-1}]	Amid-II-Bande [cm^{-1}]
Turns/Schleifen	1672 (1662 – 1682)	
α -Helix	1654 (1648 – 1657)	1546 (1545 – 1550)
ungeordnet	1654 (1642 – 1657)	
β -Faltblatt	1633 (1623 – 1641) 1684 (1674 – 1695)	1528 (1525 – 1532)

Tab. 2.2: Zuordnung der Amid I und II Banden zu verschiedenen Sekundärstrukturen von Proteinen/Peptiden in Wasser^[84].

Die in dieser Arbeit benutzte IRRA-Spektroskopie beruht auf dem Phänomen der äußeren Reflexion, d.h. der IR-Strahl trifft aus dem Medium der Luft kommend auf eine optisch dichtere Probe und wird dort reflektiert^[85, 86]. Mit der IRRA-Spektroskopie wurde erstmals von Dluhy & Cornell ein monomolekularer Oberflächenfilm an der Luft/Wasser-Grenzfläche untersucht^[87]. Es ist möglich Informationen über die Konformation und Orientierung der Acylketten von Lipiden, sowie über Wechselwirkungen der Lipidkopfgruppen in Monoschichten zu erhalten. Außerdem können die Sekundärstruktur und Orientierung von Proteinen/Peptiden sowohl an der Luft/Wasser-Grenzfläche als auch in Wechselwirkung mit Lipidmonoschichten untersucht werden. Die verwendete Technik macht die gleichzeitige Aufnahme von IRRA-Spektren und π/A -Isothermen möglich. Dadurch können IR-spektroskopischen Beobachtungen mit Phasenübergängen direkt verglichen werden.

Die IRRAS-Filmwaage besteht aus einem Proben- ($300 \times 60 \times 3 \text{ mm}^3$) und einem Referenztrög ($60 \times 60 \times 3 \text{ mm}^3$) aus Teflon (Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Deutschland) (Abb. 2.2). Für die Messungen wurde ein Equinox 55 FT-IR-Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Deutschland) mit schmalbandigen MCT-Detektor benutzt. Der IR-Strahl wird über ein System von Spiegeln in einen im Einfallswinkel verstellbaren Arm auf die Probenoberfläche gelenkt. Dabei wird der IR-Strahl durch einen KRS-5-Polarisator mit einer besonders hohen Güte der linearen Polarisation ($>98 \%$) geleitet. Nach der Reflexion an der Luft/Wasser-Grenzfläche wird der IR-Strahl über ein analog aufgebautes Spiegelsystem in einem zweiten Arm zu einem externen MCT-Detektor geführt. Die Reflexionsspektren wurden mit der Opus Software (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Deutschland) aufgenommen und ausgewertet.

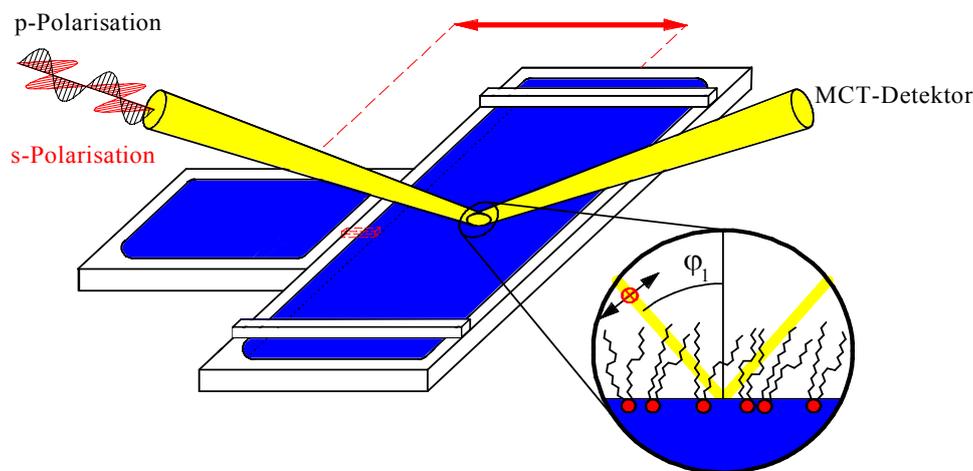


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des IRRA-spektroskopischen Versuchsaufbaus. Trögsystem mit Probentrög inkl. beweglicher Barrieren und Referenztrög. Vereinfachte Darstellung des IR-Strahlenganges mit schematischer Abbildung der Reflexion an der Grenzfläche^[69].

Das beschriebene Trogsystem ist auf einer fahrbaren Bühne montiert (Trog-Shuttle^[88]). Dadurch können der Proben- und Referenztrogs abwechselnd, computergesteuert in den IR-Strahlengang geschoben werden, um Proben- (R_0) bzw. Referenzspektren (R) aufzunehmen. Das Absorptions-Reflexionsspektrum (RA) wird dann mit

$$RA = -\log(R/R_0)$$

berechnet. Wegen des geringen zeitlichen Abstandes zwischen der Messung der Probe und der reinen Subphasenoberfläche werden die Rotationsschwingungsbanden des Wasserdampfes (zwischen 1400 und 1800 cm^{-1}) weitgehend kompensiert. Das ist die Voraussetzung für Beobachtungen der zeitlichen Änderung von Carbonylstreckschwingungs- und Amid-Banden.

Um einen immer gleichen Füllstand – sowohl über die Zeit als auch im Vergleich zwischen Proben- und Referenztrogs – zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Maßnahmen ergriffen. Zunächst waren beide Tröge durch Kanäle verbunden, was den Nachteil der freien Diffusion der Proteine/Peptide in den Referenztrogs hatte und dadurch Messungen zum Teil unbrauchbar wurden. Um die Diffusion zu unterbinden, wurden die Kanäle verschlossen und die Tröge durch einen Teflonschlauch verbunden. Theoretisch könnte auch durch diese Verbindung Protein/Peptid in den Referenztrogs gelangen. Durch den geringen Durchmesser und die Länge des Schlauches ist es allerdings unwahrscheinlich, dass die Moleküle diese Strecke während der Messung bewältigen. Für Langzeitmessungen war diese Maßnahme dennoch wenig geeignet, weil die Angleichung der Füllstände in den verschiedenen Trögen nicht genau genug war und damit die Spektrenqualität beeinträchtigte. Letztendlich bewährten sich die Installation eines Füllstandsensors und die damit verbundene, computergesteuerte Regulation des Füllstandes durch Pumpen. So wurde sowohl im Proben- als auch im Referenztrogs der Füllstand regelmäßig überprüft und der durch Verdampfung entstandene Wasserverlust durch Zupumpen von Reinstwasser ausgeglichen.

2.2.2.1 Druck/Flächen-Isothermen

Die Reinigung des Trogsystems und Vorbereitung der Messung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Nach dem Spreiten der Lipidlösung im Proben- und Referenztrogs und Abwarten der Equilibrierungszeit wurde der Film mit einer Geschwindigkeit von $0,02\text{ nm}^2\text{ Lipidmolekül}^{-1}\text{Minute}^{-1}$ bis zu einem lateralen Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} komprimiert und IRRA-Spektren in p-Polarisation bei einem Einfallswinkel von 40° aufgenommen. Jedes Spektrum wurde aus 2000 Scans, mit einer Auflösung von 8 cm^{-1} berechnet. Als Subphase wurde Reinstwasser verwendet.

2.2.2.2 IRRA-spektroskopische Untersuchung zeitabhängiger Adsorption von Proteinen/Peptiden an Lipidmonoschichten

Nach der Reinigung der Tröge und der Befüllung mit der entsprechenden Puffersubphase wurde der Lipidfilm im Probenrog gespreitet und bis zum gewünschten Oberflächendruck komprimiert, wobei gleichzeitig IRRA-Spektren des Lipidfilms aufgenommen wurden (Kap. 2.2.2.1). Die Protein/Peptidlösung wurde durch die Filmoberfläche in die Subphase injiziert. Dafür wurde eine Spritze mit einer sehr feinen Kanüle verwendet, um den Oberflächenfilm so wenig wie möglich zu stören. Da die Subphase nicht durchmischt wurde, wurde an mehreren Stellen injiziert, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Proteins/Peptides zu erreichen. Die zeitabhängige Änderung der Fläche pro Molekül sowie IRRA-Spektren wurden über einen Zeitraum von mindestens 12 h aufgenommen.

2.2.2.3 IRRA-spektroskopische Untersuchung von Proteinen/Peptiden an Luft/Wasser-Grenzflächen

Für die Messungen zur Bestimmung der Oberflächenaktivität der Proteine/Peptide wurde das Trogsystem nach der Reinigung mit der entsprechenden Subphase gefüllt. Die Injektion der Protein/Peptidlösungen erfolgte durch die Oberfläche in die Subphase des Referenztroges (Kap. 2.2.2.2). Es wurde die Druckänderung nach der Injektion als Funktion der Zeit verfolgt und IRRA-Spektren (Kap. 2.2.2.1) gemessen.

2.2.2.4 IRRA-spektroskopische Orientierungsmessungen

Zur Bestimmung der Orientierung der adsorbierten Protein/Peptidmoleküle wurden IRRA-Spektren bei verschiedenen Einfallswinkeln und sowohl in p- als auch s-Polarisation des IR-Lichtes aufgenommen. Der Einfallswinkel des IR-Strahls wurde von 32° bis 68° in 4°-Schritten variiert und bei jedem Winkel in p-Polarisation 2000 Scans aufgenommen. Für ein in s-Polarisation aufgenommenes Spektrum wurden nur 1000 Scans gemessen.

2.2.2.5 Spektren-Simulation

Für die Spektrensimulation wurde ein durch Dr. C. Schwieger (Institut für Chemie, physikalische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) geschriebenes MATLAB-Programm (MathWorks, Massachusetts, USA) verwendet, dem das optische Model von Kuzmin & Michailov zugrunde liegt^[89-91]. Um Spektren mit mehreren Banden zu simulieren, wurden Absorptionskoeffizient (k) und Brechungsindex (n) nach

$$k^{x,z} = \sum k_i^{x,z}$$

bzw.

$$n^{x,z} = n_{\max} - \sum n_i^{x,z}$$

berechnet. Dabei geben i die Nummer der Banden und n_{\max} den Brechungsindex des gespreiteten Films wieder, wobei n_i mit $n_i = 2\Delta k_{i,\max} \gamma / (4\Delta^2 + \gamma^2)$ berechnet wird. Für die Berechnung von n_i werden $\gamma = 2\pi c$ (fwhh) und $\Delta = 2\pi c (\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_0)$, wobei fwhh die Halbwertsbreite der Bande, c die Lichtgeschwindigkeit, $\tilde{\nu}_0$ das Wellenzahlmaximum und $\tilde{\nu}$ die Wellenzahl, für die die Berechnung gemacht wurde, eingesetzt. Der komplexe Brechungsindex (\tilde{n}) des Films wurde dann mit

$$\tilde{n}^{x,z} = n^{x,z} + ik^{x,z}$$

berechnet. Die optischen Konstanten für die wässrige Subphase wurden von Bertie et al. übernommen^[92, 93].

Die simulierten Spektren wurden durch einen globalen Fit an die experimentellen Daten angenähert, wobei alle bei unterschiedlichen Einfallswinkeln und Polarisierungen aufgenommenen Spektren über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate angepasst wurden. Zuerst wurden die OH-Streckschwingungsbanden unter Berücksichtigung der Amid A Bande angepasst, um die Schichtdicke (d) und den Brechungsindex des Films (n_{\max}) zu ermitteln. Danach wurden die Absorptionsbanden im Amid I und II Bereich angepasst, um Anteil und Neigungswinkel der Sekundärstrukturelemente des Moleküls zu ermitteln.

Berechnung der Filmschichtdicke

Zusätzlich zur Feststellung der Filmschichtdicke durch die Simulation der OH-Streckschwingungsbande (s.o.), wurde mit Hilfe des durch die Spektrensimulation im Amidbandenbereich ermittelten Neigungswinkels (θ) die Schichtdicke des Proteinfilms nach

$$d = b + (l - b)\cos\theta$$

berechnet, wobei (b) für die Breite und (l) für die Länge des Moleküls stehen. Die jeweiligen Werte wurden dann verglichen und diskutiert.

2.2.3 Epi-Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Lipidmonoschichten wurde ein „Axio Scope.A1 Vario“ Epi-Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland) verwendet. Zur speziellen Ausstattung des Mikroskops gehört ein Filmwaagetrog (305 x 99 x 3 mm³) aus Teflon mit zwei computergesteuerten Barrieren (Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Deutschland). Der Trog ist auf einem in x-y Richtung verstellbarem Tisch (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) montiert, um den Lipidfilm an unterschiedlichen Stellen

mikroskopisch betrachten zu können. Der Trog ist temperierbar und durch einen selbstgebauten Überbau aus Plexiglas abdeckbar. Das gesamte System steht auf einem vibrationsgedämpften, optischen Tisch (Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die x-y-z Verstellbarkeit für die Fokussierung gewährleistet ein MAC5000 System (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). Für die Bestrahlung wurde eine 100 Watt Quecksilberdampf Lampe benutzt und als Objektiv diente ein LD EC Epiplan-NEOFLUAR 50x. Um die entsprechende Anregungswellenlänge einzustellen, wurden verschiedene Filter (für BODIPY-C12-HPC: Zeiss Filtersatz 09, Anregung BP 450-490 nm, Strahlenteiler FT510 nm, Emission LP 515 nm; für Rhodamin-DHPE: Zeiss Filtersatz 20, Anregung BP 546/12 nm, Strahlenteiler FT 560 nm, Emission BP 575–640 nm) benutzt. Die Bilder wurden mit einer EMCCD Kamera (ImageEM C9100-13, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) aufgenommen und mit einer AxioVision Software (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland) ausgewertet.

Vor jeder Messung wurde der Trog, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, gereinigt, mit der entsprechenden Subphase befüllt und die Lipidlösung gespreitet.

Die Lipidlösungen wurden, wie in den Kapiteln 2.1.2.1 bzw. 2.1.2.2 beschrieben, hergestellt und mit 0,1 mol-% BODIPY-C12-HPC bzw. 0,01 mol-% Rhodamin-DHPE versetzt. Nach der Equilibrierungszeit wurde der Lipidfilm mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten (0,04; 0,08 bzw. 0,16 nm² Molekül⁻¹ min⁻¹) komprimiert bzw. expandiert.

3 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen mit dem Thylakoid-System

3.1 Physikalisch-chemische Charakterisierung von Thylakoidlipiden an der Luft/Wasser-Grenzfläche

3.1.1 Druck/Flächen-Isothermen durch Filmwaagemessungen

Zur Untersuchung des Phasenverhaltens der einzelnen Lipide sowie deren Lipidgemische wurde die durch die Verringerung der Fläche pro Lipidmolekül verursachte Druckänderung gemessen (π/A -Isothermen).

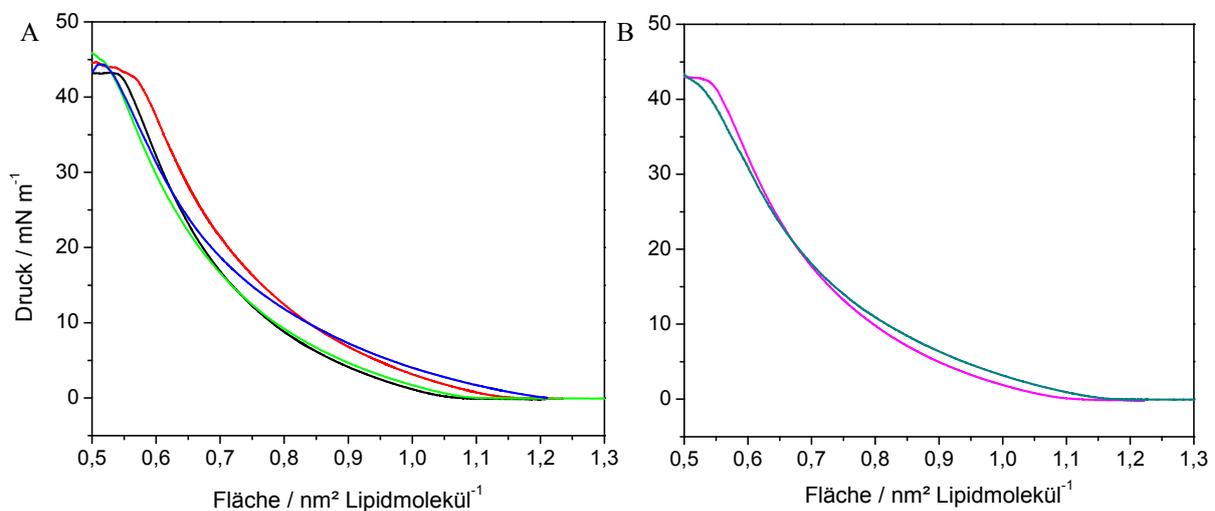


Abb. 3.1: π/A -Isothermen auf Wasser, bei 20°C. A: π/A -Isothermen der Einzellipide; Schwarz: MGDG, Rot: DGDG, Grün: SQDG, Blau: PG; B: π/A -Isothermen der Lipidgemische; Magenta: Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7:11 mol-%), Cyan: anionisches Lipidgemisch (SQDG/PG 39:61 mol-%).

Abb. 3.1 A zeigt π/A -Isothermen von MGDG, DGDG, SQDG und PG auf reinem Wasser, bei 20°C. Es wird deutlich, dass alle verwendeten Lipide ausschließlich in der flüssig-expandierten Phase vorlagen, wobei die Isothermen von MGDG und SQDG einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf aufwiesen. Diese beiden Lipide unterscheiden sich in ihrer Kopfgruppe ausschließlich durch eine Sulfonatgruppe, welche zu einer negativen Ladung der Kopfgruppe führt. Die Isotherme des DGDG lag insgesamt bei größeren Flächen pro Lipidmolekül. Das widerspricht den Ergebnissen von Bottier et al. und auch Gallant & Leblanc^[65, 94]. Hier wird beschrieben, dass MGDG Moleküle den größeren Flächenbedarf haben. Gzyl-Malchers Ergebnisse dagegen widerspiegeln die in der Abb. 3.1 gezeigten Resultate^[95]. Der minimale Flächenbedarf eines Lipidmoleküls wird vor allem durch den Grad der Sättigung der Acylketten, die Größe der Kopfgruppe und auch durch die Stärke der

Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen bestimmt. Der Sättigungsgrad der Fettsäureketten der in dieser Arbeit verwendeten Lipide ist nicht bekannt. Aufgrund der chemischen Strukturen der Kopfgruppen von MGDG und DGDG (Abb. 1.9) erscheint es jedoch plausibel, dass DGDG einen größeren Flächenbedarf pro Lipidmolekül aufweist. Die Isotherme des PG, dem einzigen Lipid, das keine Zuckerkopfgruppe trägt, zeigte einen Kurvenverlauf, der deutlich von denen der Galaktolipide abweicht. Der Anstieg der Isotherme war weniger steil und obwohl die Kopfgruppe viel kleiner ist als die der Galaktolipide, nahm das Einzelmolekül eine größere Fläche ein, was wahrscheinlich durch einen niedrigeren Sättigungsgrad der Acylketten verursacht wird. Alle Lipidfilme kollabierten bei sehr ähnlichen Flächen pro Lipidmolekül und lateralen Drücken.

Auf gleiche Weise wurde auch die Charakterisierung von Gemischen dieser Lipide vorgenommen (Abb. 3.1 B). Es wurde ein Gemisch aller Einzellipide im Verhältnis von MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7:11 mol-% (Thylakoid-Lipidgemisch)^[96] und ein Gemisch der negativ geladenen Lipide (anionisches Lipidgemisch, SQDG/PG 39:61 mol-%) verwendet. Wie zu erwarten, zeigte die π/A -Isotherme des Thylakoid-Lipidgemisches einen dem reinen MGDG ähnlichen Kurvenverlauf und damit ein flüssig-expandiertes Phasenverhalten. Auch die Isotherme des anionischen Lipidgemisches zeigte ein flüssig-expandiertes Phasenverhalten und einen Kurvenverlauf zwischen denen der Einzelkomponenten SQDG und PG.

3.1.2 IRRA-spektroskopische Untersuchung der Lipidmonoschichten

Da die späteren Adsorptionsstudien der Proteine/Peptide an Lipidmonoschichten bei einem lateralen Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} durchgeführt wurden, ist das Spektrum eines Lipidfilms unter diesen Bedingungen von besonderem Interesse. In Abb. 3.2 ist ein IRRA-Spektrum einer Monoschicht des Thylakoid-Lipidgemisches (Grün) abgebildet. Die beiden großen, positiven Banden bei Wellenzahlen von $\sim 3590 \text{ cm}^{-1}$ und $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ sind auf die OH-Streckschwingung $\nu(\text{OH})$ bzw. auf die H_2O -Deformationsschwingung $\delta(\text{H}_2\text{O})$ des Wassers zurückzuführen. Die Intensität dieser Banden enthält Informationen über die Schichtdicke des Lipidfilms. Kennzeichnend für Lipide sind vor allem die symmetrische und die antisymmetrische Methylenstreckschwingungsbande ($\nu_s(\text{CH}_2)$ und $\nu_{as}(\text{CH}_2)$) bei Wellenzahlen von $\sim 2855 \text{ cm}^{-1}$ und $\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$. Des Weiteren sind die Methylstreckschwingung $\nu(\text{CH}_3)$ bei $\sim 2965 \text{ cm}^{-1}$ und die C-H-Vinylstreckschwingung bei $\sim 3010 \text{ cm}^{-1}$ als kleine Banden sichtbar. Bei kleineren Wellenzahlen ($\sim 1460 \text{ cm}^{-1}$) erkennt man das Signal für die Methylendeformationsschwingung $\delta(\text{CH}_2)$. Ein weiteres Charakteristikum

von Lipidspektren ist die Carbonylstreckschwingungsbande $\nu(\text{C}=\text{O})$ bei $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$. Banden zwischen 1000 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} können auf die Streckschwingungen der C-O Bindungen ($\nu(\text{C}-\text{O})$), der S-O Bindungen ($\nu_{\text{as}}(-\text{SO}_3)$ zwischen $1355\text{-}1340 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu_{\text{s}}(-\text{SO}_3)$ zwischen $1165\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$) und oder der P-O Bindungen ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)$ bei $\sim 1220 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2)$ bei $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$) in den Lipidkopfgruppen zurückgeführt werden.

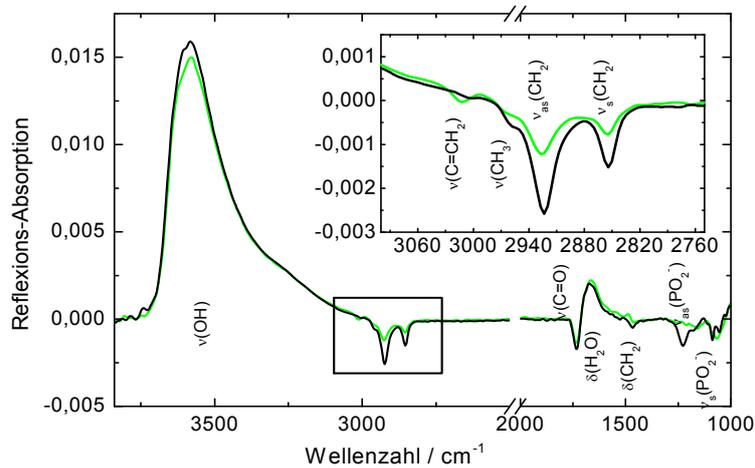


Abb. 3.2: IRRA-Spektren von Lipidmonoschichten bei 20 mN m^{-1} , auf Puffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Grün: Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG:DGDG:SQDG:PG 55: 27: 7: 11 mol-%); Schwarz: POPC; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Methylenstreckschwingungsbandenbereiches.

Auch das Lipid POPC wurde genauer untersucht. Es dient häufig als Modellmolekül für Interaktionsmessungen von Proteinen an Monoschichten. Es ist bekannt, dass es ebenfalls in der flüssig-expandierten Phase vorliegt. Das in der Abb. 3.2 abgebildete Spektrum von POPC (Schwarz) lässt die Unterschiede zum Spektrum des Thylakoid-Lipidgemisches erkennen. Deutliche Differenzen zeigt das Spektrum bei geringeren Wellenzahlen im Bereich der Phosphatbanden. Die antisymmetrischen und symmetrischen P-O Banden sind deutlich ausgebildet ($\sim 1225 \text{ cm}^{-1}$ und $\sim 1090 \text{ cm}^{-1}$). Auffällig ist auch, dass die Intensitäten der Methylenstreckschwingungsbanden deutlich größer sind. Die C-H-Vinylstreckschwingungsbande ist dagegen nicht zu erkennen, da nur eine Doppelbindung im Molekül vorhanden ist, während die Fettsäuren der pflanzlichen Lipide mehrfach ungesättigt sind.

3.1.3 Epi-fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Thylakoid-Lipidgemisches

Die Filmwaagemessungen zeigten, dass die Lipide des Thylakoid-Lipidgemisches in der flüssig-expandierten Phase vorliegen (Kap. 3.1.1). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das Gemisch eine homogene Monoschicht bildet und Domänenbildungen nicht erwartet werden können. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden epi-fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen während der Aufnahmen von π/A -Isothermen vorgenommen.

Es wurden verschiedene Messbedingungen gewählt um zu gewährleisten, dass induzierte Effekte, z.B. durch die Interaktion des Farbstoffes oder durch die in der Subphase gelösten Komponenten mit den Lipiden, ausgeschlossen werden können. Die Filme wurden auf Wasser bzw. auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) als Subphase gespreitet und mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten komprimiert bzw. expandiert, um zu testen, ob die Wahl der Geschwindigkeit einen Einfluss auf die Domänenbildung hat^[97]. Als Fluorophor wurden Rhodamin-DHPE und BODIPY-C12-HPC verwendet (Kap. 2.2.3). Beide Marker reichern sich in der fluiden Phase an, so dass expandierte Phasen hell und höher geordnete, kondensierte Phasen als dunkle Domänen erscheinen. Die Zugabe von Fluorophoren kann einen Einfluss auf die Eigenschaften der Lipidmonoschicht ausüben^[97]. Dies wurde zu verhindern versucht, indem möglichst geringe Anteile an Farbstoff (max. 0,1 mol-%) verwendet wurden^[98].

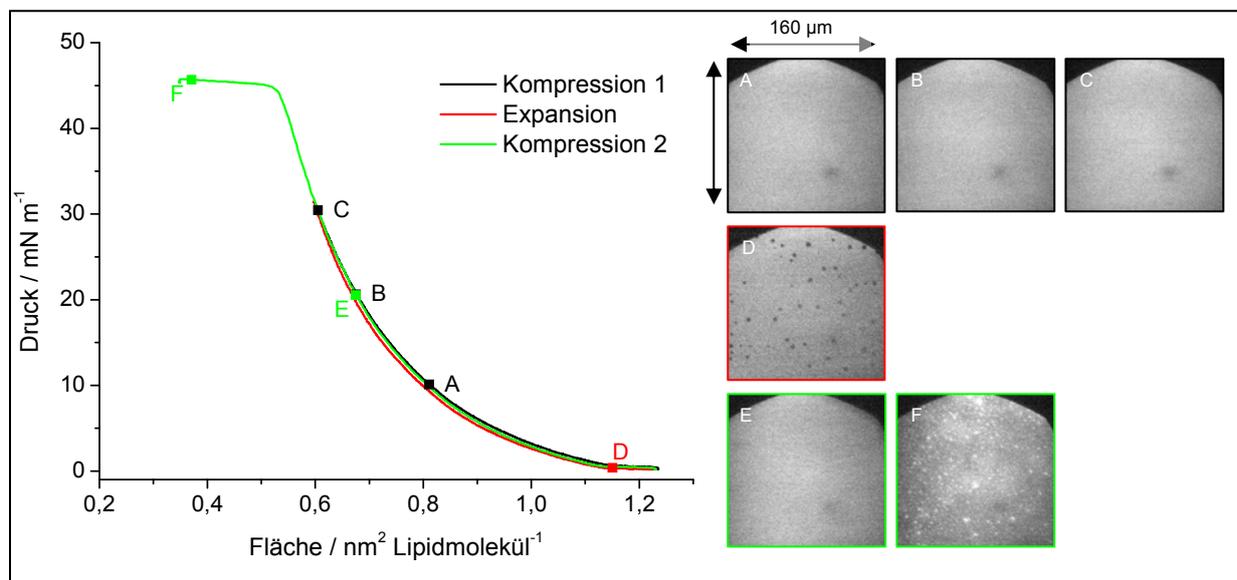


Abb. 3.3: π/A -Isothermen des Thylakoid-Lipidgemisches (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) mit BODIPY-C12-HPC (0,1 mol-%) auf Wasser bei 20 °C. Schwarz: Kompression 1 ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), A ($A = 0,81$; $\pi = 10,1$), B ($A = 0,67$; $\pi = 20,6$), C ($A = 0,60$; $\pi = 30,4$). Rot: Expansion ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), D ($A = 1,15$; $\pi = 0,4$). Grün: Kompression 2 ($v \sim 0,16 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), E ($A = 0,67$; $\pi = 20,5$), F ($A = 0,37$; $\pi = 45,7$). A [$\text{nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1}$] und π [mN m^{-1}].

Die Isothermen des Thylakoid-Lipidgemisches mit BODIPY-C12-HPC auf einer wässrigen Subphase, die mit unterschiedlichen Kompressions- bzw. Expansionsgeschwindigkeiten aufgenommen wurden, zeigten keine Unterschiede (Abb. 3.3). Die verschiedenen Geschwindigkeiten haben keinen sichtbaren Einfluss auf die Organisation der Lipidmoleküle. Außerdem zeigten die Experimente keine Hysterese. Die Monoschicht des Lipidgemisches ist im flüssig-expandierten Phasenzustand homogen (Abb. 3.3 A, B, C und E). Im Phasenübergangsgebiet zwischen gas-analogenem und flüssig-expandiertem Zustand wurden

beide Phasen gut separiert beobachtet (Schaumphase, Abb. 3.3 D). Die schwarzen, kreisrunden Bereiche zeigen wahrscheinlich die reine Wasseroberfläche. Die hellen Bereiche entsprechen dem noch nicht geschlossenen Lipidfilm im flüssig-expandierten Zustand. Durch die Kompression des Filmes bildete sich eine homogene Oberfläche, die auch durch mehrfache Expansions- und Kompressionszyklen bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten homogen blieb. Nach dem Kollaps des Filmes wurden sehr helle Domänen unregelmäßiger Größe beobachtet (Abb. 3.3 F).

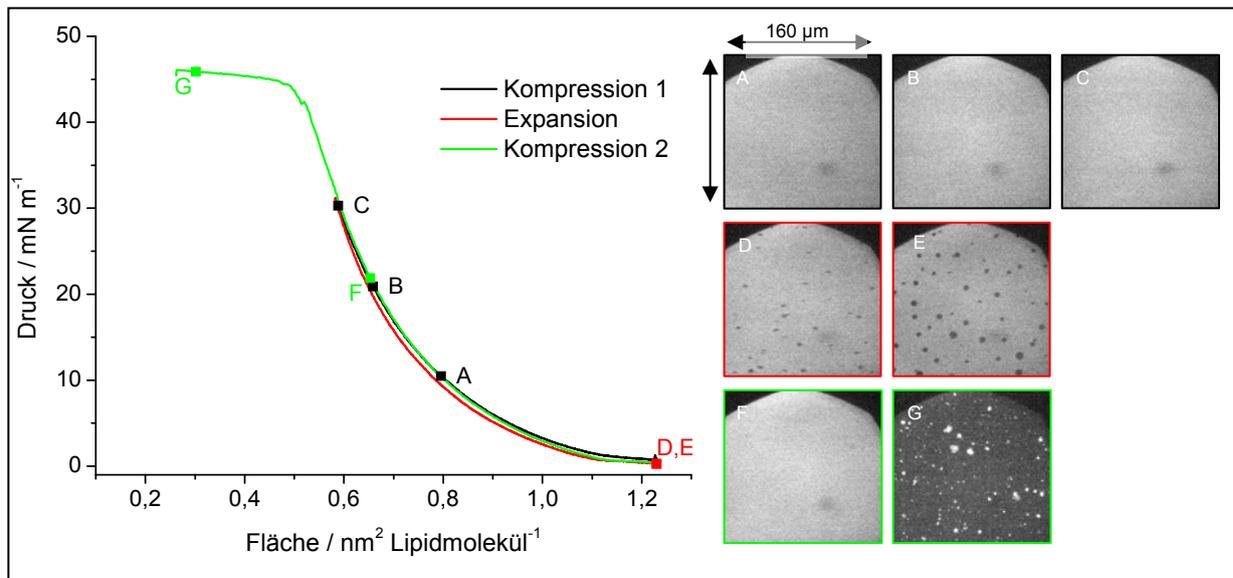


Abb. 3.4: π/A -Isothermen des Thylakoid-Lipidgemisches (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) mit BODIPY-C12-HPC (0,1 mol-%) auf Puffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,0) bei 20 °C. Schwarz: Kompression 1 ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), A ($A = 0,80$; $\pi = 10,5$), B ($A = 0,66$; $\pi = 20,9$), C ($A = 0,59$; $\pi = 30,3$). Rot: Expansion ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), D ($A = 1,23$; $\pi = 0,3$), E ($A = 1,23$; $\pi = 0,3$). Grün: Kompression 2 ($v \sim 0,16 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), F ($A = 0,65$; $\pi = 21,9$), G ($A = 0,3$; $\pi = 45,9$). A [$\text{nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1}$] und π [mN m^{-1}].

Sehr ähnliche Beobachtungen wurden auch bei den Experimenten mit Puffer als Subphase gemacht (Abb. 3.4). Im Phasenübergangsbereich zwischen gas-analogenem und flüssig-expandiertem Zustand erschien die bereits beschriebene Schaumphase (Abb. 3.4 D und E) und im Laufe der Kompression bildete sich eine homogene Oberfläche des Films (Abb. 3.4 A, B, C und F). Dieser Zustand blieb bis zum Kollaps erhalten. Nach dem Kollaps wurden ebenfalls helle, ungleich große Domänen sichtbar. Sie erschienen scharf gegen den dunkleren „Hintergrund“ abgegrenzt (Abb. 3.4 G).

Die Fluoreszenzmessungen mit dem Thylakoid-Lipidgemisch mit Rhodamin-DHPE als Fluoreszenzfarbstoff zeigten sehr ähnliche Ergebnisse wie die Experimente mit BODIPY-C12-HPC sowohl auf wässriger Subphase als auch auf Puffer als Subphase.

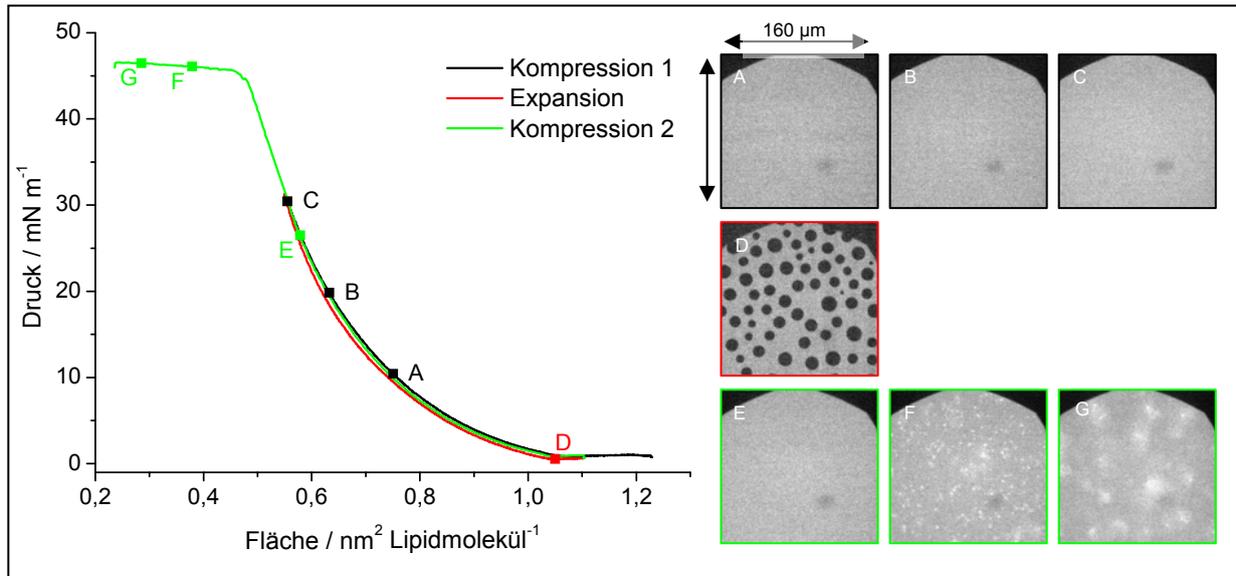


Abb. 3.5: π/A -Isothermen des Thylakoid-Lipidgemisches (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) mit Rhodamin-DHPE (0,01 mol-%) auf Wasser bei 20 °C. Schwarz: Kompression 1 ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), A ($A = 0,75$; $\pi = 10,4$), B ($A = 0,63$; $\pi = 19,8$), C ($A = 0,56$; $\pi = 30,4$). Rot: Expansion ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), D ($A = 1,05$; $\pi = 0,4$). Grün: Kompression 2 ($v \sim 0,16 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), E ($A = 0,58$; $\pi = 26,5$), F ($A = 0,38$; $\pi = 46,1$), G ($A = 0,29$; $\pi = 46,4$). A [$\text{nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1}$] und π [mN m^{-1}].

Die Abb. 3.5 und Abb. 3.6 zeigen, dass sowohl die π/A -Isothermen als auch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gut vergleichbar sind. Die Wahl des Fluorophors in den eingesetzten Konzentrationen beeinflusst die Organisation der Lipide der Monoschicht offensichtlich nicht.

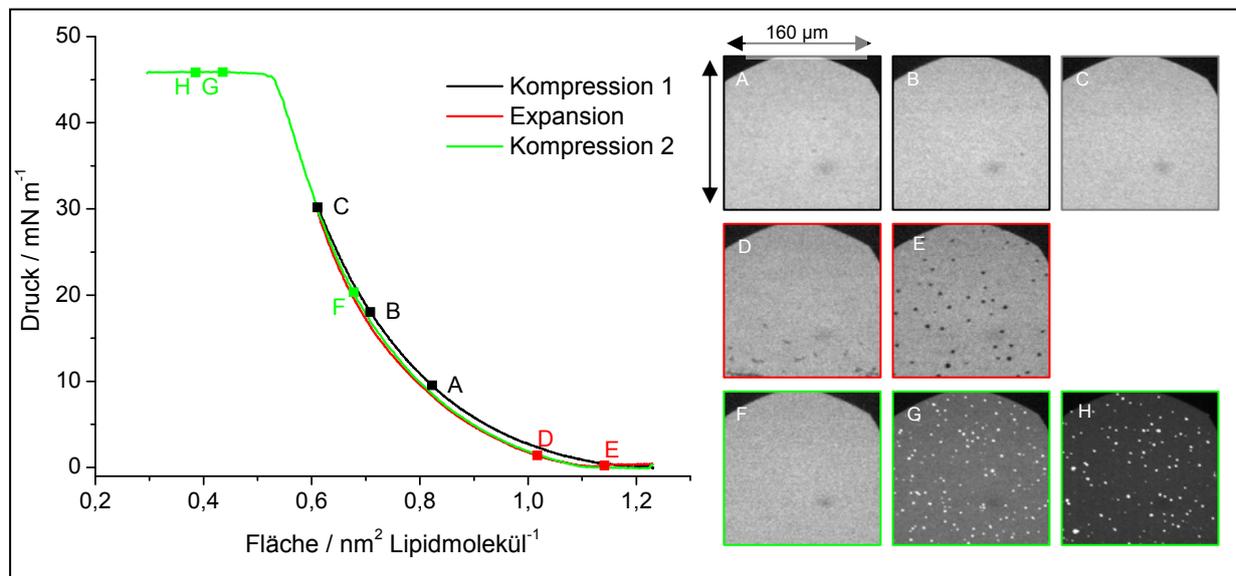


Abb. 3.6: π/A -Isothermen des Thylakoid-Lipidgemisches (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) mit Rhodamin-DHPE (0,01 mol-%) auf Puffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,0) bei 20 °C. Schwarz: Kompression 1 ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), A ($A = 0,82$; $\pi = 9,5$), B ($A = 0,71$; $\pi = 18,0$), C ($A = 0,61$; $\pi = 30,2$). Rot: Expansion ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), D ($A = 1,02$; $\pi = 1,4$), E ($A = 1,14$; $\pi = 0,2$). Grün: Kompression 2 ($v \sim 0,16 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), F ($A = 0,68$; $\pi = 20,3$), G ($A = 0,44$, $\pi = 45,7$), H ($A = 0,39$; $\pi = 45,9$). A [$\text{nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1}$] und π [mN m^{-1}].

Durch die physikalisch-chemische Charakterisierung der Lipide und Lipidgemische mittels Filmwaagetechnik wurde gezeigt, dass sowohl die verwendeten Einzelkomponenten als auch ihre Gemische bei 20°C in der flüssig-expandierten Phase vorliegen. Der Monolayer-Bilayer Äquivalenzdruck liegt bei $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$. Bei diesem Oberflächendruck verhalten sich die Lipide in der Monoschicht wie Lipidmoleküle in einer Membran^[77]. Aus den π/A -Isothermen kann daher abgeleitet werden, dass die Lipide der thylakoidalen Membran in der flüssig-expandierten Phase vorliegen. Das gleichbleibende Phasenverhalten über einen weiten Filmdruckbereich ist eine ideale Voraussetzung für Adsorptionsmessungen mit Substraten an Lipidmonoschichten. Die IRRA-spektroskopischen Aufnahmen des Lipidfilms mit einem Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} zeigten die erwarteten lipidspezifischen Banden. Die Einzellipide sind in den Monoschichten des Thylakoid-Lipidgemisches höchstwahrscheinlich homogen verteilt. Es ist also anzunehmen, dass die Adsorption, selbst wenn die Substrate die Interaktion mit einer bestimmten Lipidspezies eingehen, ebenfalls gleichmäßig über die Monoschicht verteilt ist.

3.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Die Oberflächenaktivität der verwendeten Proteine und des Peptides wurde durch die Messung des Oberflächendrucks bestimmt. Dazu wurde die Protein/Peptidlösung in die Subphase injiziert und die Änderungen des Oberflächendrucks in Abhängigkeit der Zeit beobachtet. Um den Einfluss der Zusammensetzung der Subphase auf das Adsorptionsverhalten zu klären, wurden Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen sowie Wasser als Subphase verwendet.

3.2.1 Adsorptionsverhalten der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche

3.2.1.1 Oberflächenaktivität des Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) und des chimären EGFP (i16/EGFP)

Der Vergleich der Oberflächenaktivitäten zwischen EGFP und dem Signalpeptid tragenden i16/EGFP soll den Einfluss der Peptidsequenz auf die Adsorptionsstärke des Proteins verdeutlichen.

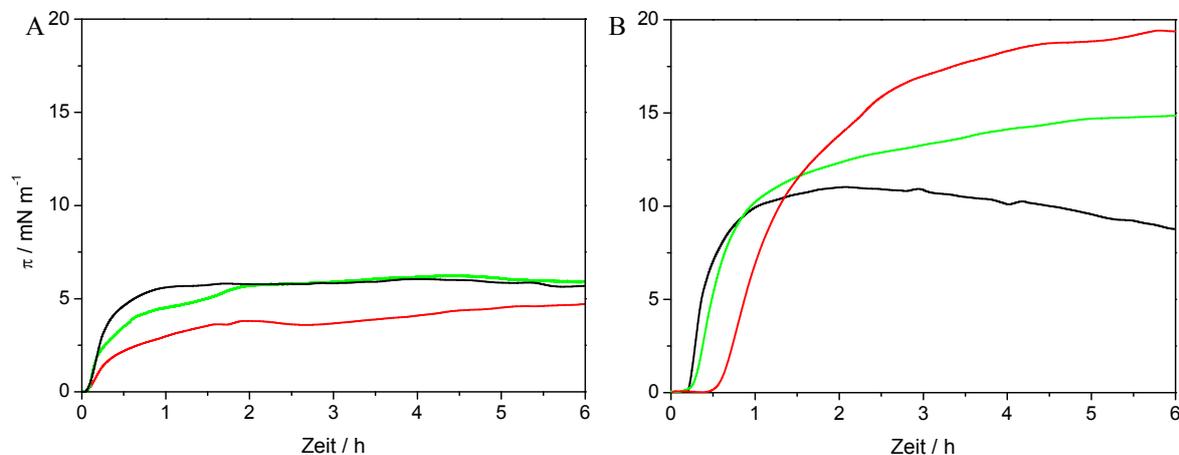


Abb. 3.7: Adsorptionsisothermen von EGFP (A) und i16/EGFP (B) mit einer jeweiligen Proteinkonzentration in der Subphase von 100 nM, mit unterschiedlichen Subphasen, bei 20 °C an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Schwarz: Wasser; Rot: Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0); Grün: Puffer II (20 mM Tris, pH 8,0).

Nach der Injektion der EGFP-Proteinlösung in die unterschiedlichen Subphasen zeigte sich ein Anstieg des Oberflächendrucks mit der Zeit, was auf eine Proteinfilmbildung an der Luft/Wasser-Grenzfläche hinweist. Kurz nach der Injektion der Proteinlösung (Zeit: $t = 0$ h) stieg der Oberflächendruck jeweils deutlich an (Abb. 3.7 A). Etwa 2 h nach der Injektion des Proteins in Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) schien sich ein Gleichgewicht

eingestellt zu haben ($\pi_{2h} = 3,8 \text{ mN m}^{-1}$). Im weiteren Messverlauf stieg der Oberflächendruck allerdings weiter langsam an ($\pi_{\max} = 5,4 \text{ mN m}^{-1}$). Wurden Puffer II (20 mM Tris, pH 8,0) bzw. Wasser als Subphase verwendet, kam es nach der Injektion der Proteinlösung zu schnelleren Anstiegen des Oberflächendrucks. Die maximale Druckänderung von $5,9 \text{ mN m}^{-1}$ weicht allerdings nicht stark von dem in Puffer I gemessenen Wert ab. Die Subphase scheint auf die Oberflächenaktivität des EGFP keine bedeutende Rolle zu spielen.

Die Oberflächenaktivität von i16/EGFP in Puffer I war mehr als doppelt so hoch ($\pi_{6h} = 19,4 \text{ mN m}^{-1}$) wie die des EGFP (vgl. Abb. 3.7 A und B). Da alle anderen Messbedingungen gleich waren, muss das Signalpeptid die Ursache für das veränderte Adsorptionsverhalten sein. Abb. 3.7 B zeigt, dass der Druckanstieg erst ~ 30 min nach der Injektion des Proteins begann und mehr als 5 h benötigt wurden um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Mit Puffer II als Subphase zeigte sich eine geringere Änderung des Oberflächendrucks ($\pi_{6h} = 14,9 \text{ mN m}^{-1}$). Der Druckanstieg begann früher, etwa nach zehnminütiger Inkubationszeit. Die Einstellung des Gleichgewichtes benötigte aber ebenso ~ 5 h. Der Kurvenverlauf der Adsorptionsmessung in reinem Wasser ähnelte zunächst der Messung mit Puffer II als Subphase. Der laterale Oberflächendruck stieg ebenfalls kurze Zeit nach der Injektion des Proteins. Ein Maximum wurde schon nach ~ 2 h erreicht ($\pi_{2h} = 11,0 \text{ mN m}^{-1}$), der Gleichgewichtszustand hielt nicht lange an. Der Oberflächendruck sank nach 3 h wieder ab.

3.2.1.2 Oberflächenaktivität des Signalpeptides (SP16)

Da das Signalpeptid in wässrigen Puffer in höheren Konzentrationen nicht löslich ist, wurde versucht eine Peptidlösung durch starke Verdünnung und die Zugabe von TFE herzustellen. Es wurde mit zwei verschiedenen, geringen TFE-Konzentrationen (0,2 mol-% bzw. 0,8 mol-%) experimentiert. Beide Lösungen erschienen klar und niederschlagsfrei. Es wurden Oberflächenaktivitätsmessungen nach der Injektion der jeweiligen Peptidlösung in Puffer bzw. reinem Wasser als Subphase mit einer resultierenden Peptidkonzentration im Trog von 100 nM durchgeführt. In allen Versuchen wurde keine Adsorption des Peptides an die Luft/Wasser-Grenzfläche festgestellt. Das kann bedeuten, dass das Signalpeptid nicht oberflächenaktiv ist oder dass es durch die Zugabe so geringer Mengen TFE in der Stammlösung nicht geglückt ist, eine homogene Peptidlösung herzustellen. Um das zu überprüfen, wurde das Signalpeptid ausschließlich in TFE gelöst. Die Stammlösung konnte so mit höherer Peptidkonzentration angefertigt werden. Somit verringerte sich das zu injizierende Volumen (um ~ 88 %) erheblich. Das Lösungsmittel sollte somit die

Adsorptionsexperimente nicht stören, da es bei der Injektion in das verhältnismäßig große Subphasenvolumen stark verdünnt wird (maximale TFE-Konzentration im Trog: 10 mM).

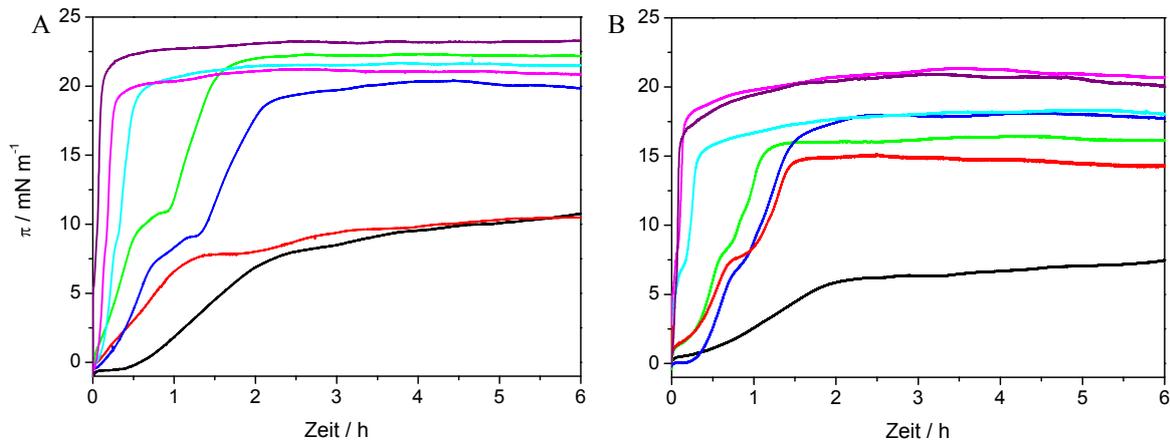


Abb. 3.8: Konzentrationsabhängige Adsorptionsisothermen des Signalpeptides (SP16) bei 20 °C. Proteinkonzentration in der Subphase – Schwarz: 100 nM; Rot: 175 nM; Grün: 200 nM; Blau: 250 nM; Cyan: 500 nM; Magenta: 1000 nM; Violett: 2000 nM. A: Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0); B: Puffer II (20 mM Tris, pH 8,0).

Nach der Injektion des in TFE gelösten Signalpeptides in Puffer I als Subphase zeigte der Anstieg des Oberflächendruckes die Adsorption des Peptides an die Luft/Wasser-Grenzfläche. In den ersten Stunden nach der Injektion erfolgte ein deutlicher Anstieg des lateralen Oberflächendruckes bis $\pi_{3h} \sim 8,5 \text{ mN m}^{-1}$, danach flachte die Kurve ab, stieg aber stetig an. Bei dieser Peptidkonzentration von 100 nM in der Subphase stellte sich auch nach 6 h kein Gleichgewicht ein (Abb. 3.8 A, Schwarz). Um die Sättigungskonzentration zu ermitteln, wurde die Konzentration in der Subphase schrittweise erhöht. Die Isothermen in Abb. 3.8 A zeigen, dass sich ab einer Konzentration von 200 nM die Adsorptionskinetik drastisch veränderte. Der Prozess wurde mehrstufig. Zunächst stieg der Oberflächendruck auf $\sim 7 \text{ mN m}^{-1}$. Der Kurvenverlauf flachte dann ab, wobei der Druck weiter auf $\sim 9 \text{ mN m}^{-1}$ stieg. Hier bildete sich ein kurzzeitiges Plateau, an dessen Ende ein erneuter Druckanstieg auf $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ erfolgte. Danach blieb der Druck konstant. Möglicherweise erfolgt im ersten Plateau eine Umorientierung der Moleküle, sodass eine weitere Adsorption an die Grenzschicht erfolgen kann. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Verhalten bei ausreichend langer Messdauer auch bei Messungen mit geringerer Peptidkonzentration auftritt. Der Umorientierungsprozess dauert hier möglicherweise länger. Bei einer Konzentration von mehr als 500 nM wurde der Adsorptionsprozess wieder einstufig, bzw. zu schnell um die einzelnen Stufen aufzulösen. Sofort mit der Injektion erfolgte ein starker Druckanstieg. Der maximale, laterale Oberflächendruck erreichte in allen Messungen mit 200 nM und höherer Peptidkonzentration $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die hohe Ionenstärke von Puffer I auf das Adsorptionsverhalten des Peptides hat, wurde die Oberflächenaktivität des Signalpeptides mit Puffer II (20 mM Tris, pH 8,0) als Subphase gemessen. Bei einer Peptidkonzentration von 100 nM in der Subphase stieg der Oberflächendruck nicht so stark wie zuvor beobachtet ($\pi_{3h} \sim 6 \text{ mN m}^{-1}$) (vgl. Abb. 3.8 A und B). Bei einer Peptidkonzentration von 175 nM wurde eine stärkere Oberflächenaktivität und die Kinetik eines mehrstufigen Adsorptionsvorgangs beobachtet, die bei der Subphase mit hoher Salzkonzentration erst ab 200 nM auftrat. Der maximal erreichte Oberflächendruck betrug allerdings nur $\sim 15 \text{ mN m}^{-1}$. Bis zu einer Peptidkonzentration von 500 nM ließ sich der zweistufige Adsorptionsverlauf beobachten. Der maximale Oberflächendruck stieg mit der Erhöhung der Peptidkonzentration auf $\sim 18 \text{ mN m}^{-1}$. Wurde die Konzentration des Signalpeptides weiter erhöht (1000 nM und 2000 nM), wurde ein maximaler Oberflächendruck von $\sim 21 \text{ mN m}^{-1}$ erreicht. Vor allem bei niedrigeren Peptidkonzentrationen wirkte sich die Ionenstärke der Subphase auf die Adsorptionsgeschwindigkeit und -stärke aus.

3.2.2 IRRA-spektroskopische Untersuchung der Protein/Peptidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Um weiterreichende Informationen wie Verhältnisse von Sekundärstrukturanteilen und Orientierung der Protein/Peptidmoleküle an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu erlangen, wurden Messungen mittels IRRA-Spektroskopie durchgeführt.

3.2.2.1 IRRA-spektroskopische Untersuchung des EGFP-Films

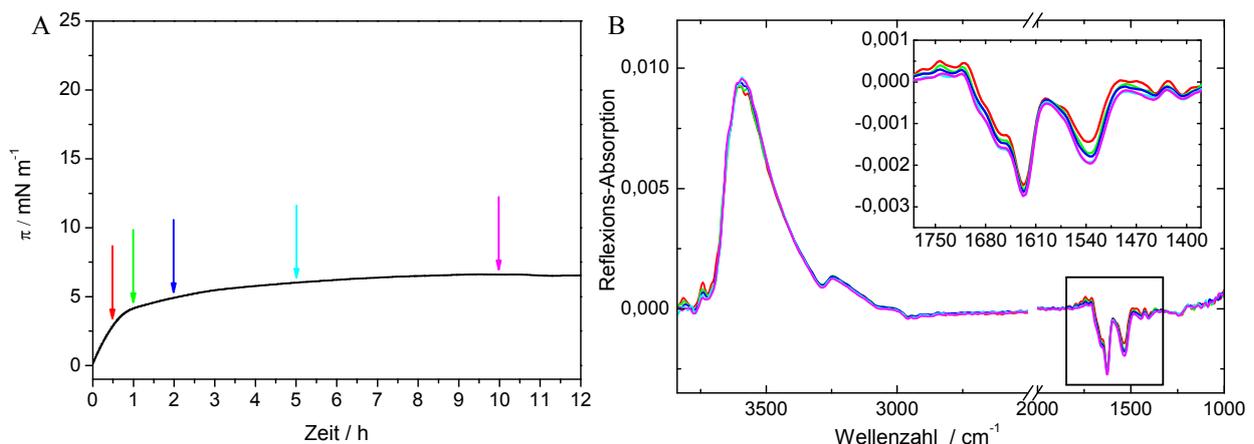


Abb. 3.9: Oberflächenaktivität von EGFP (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Abb. 3.9 A zeigt die zeitabhängige Oberflächendruckänderung nach der Injektion der Proteinlösung des EGFP in die Subphase des Puffer I.

Obwohl der Versuchsaufbau verschieden zu dem der reinen Oberflächenaktivitätsmessung war (vgl. Kap. 2.2.1.3 und 2.2.2.3), zeigten sich ähnliche Ergebnisse (vgl. Abb. 3.7 A). Allerdings wurde ein etwas höherer, maximaler Oberflächendruck und eine langsamere Ausbildung des Gleichgewichtszustandes ($\pi_{10h} = 6,6 \text{ mN m}^{-1}$) beobachtet.

Die simultan aufgenommenen IRRA-Spektren zeigten deutlich die Adsorption des Proteins an der Luft/Wasser-Grenzfläche (Abb. 3.9 B). Sofort nach der Injektion war die Entwicklung der OH-Streckschwingungsbande ($\nu(\text{OH})$ bei $\sim 3595 \text{ cm}^{-1}$) zu beobachten, welche die Ausbildung eines Proteinfilms an der Luft/Wasser-Grenzfläche anzeigt. Die vom Protein herrührenden Banden, wie die Amid A Bande bei $\sim 3285 \text{ cm}^{-1}$ und die Amid I und II Banden, wurden ebenfalls beobachtet. Die Positionen im Spektrum und die Form der Amid I und II Banden enthalten Informationen über die Sekundärstruktur des adsorbierten Moleküls. Die Amid I Bande zeigte eine asymmetrische Form mit einem Minimum bei 1627 cm^{-1} , was für eine β -Faltblattstruktur des Proteins spricht, und einer deutlichen Schulter bei 1659 cm^{-1} , die auf zusätzlich α -helikale Strukturelemente hinweist. Die Amid II Bande bei 1534 cm^{-1} bestätigt das Vorhandensein unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente. Bei Wellenzahlen von $\sim 2960 \text{ cm}^{-1}$ wurden CH_3 Streckschwingungsbanden des Proteins beobachtet. In Abb. 3.9 B ist zu erkennen, dass sich die Bandenlagen und -formen schon nach einer kurzen Inkubationszeit von $\sim 1\text{h}$ ausbildeten.

Es ist bekannt, dass EGFP als β -Barrel vorliegt (Abb. 1.3). Um die Orientierung des Proteins an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu bestimmen, wurden Spektren in Abhängigkeit des Einfallswinkels des IR-Strahls sowohl mit parallel als auch mit senkrecht polarisiertem Licht aufgenommen. Mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Programms (Kap. 2.2.2.5) wurden Spektren des Proteins an der Grenzfläche simuliert. Mit diesem Programm ist es möglich mehrere Banden gleichzeitig zu simulieren und außerdem den Umstand zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Sekundärstrukturelemente im Molekül vorkommen können. In Abb. 3.10 sind gemessene und simulierte Spektren bei einem Einfallswinkel des IR-Strahls von 40° bzw. 60° jeweils in p- und s-Polarization vergleichend dargestellt.

Durch die Simulation wurde eine Schichtdicke der adsorbierten Proteinschicht an der Luft/Wasser-Grenzfläche von $d = 1 \text{ nm}$ bestimmt. Die Berechnung der Schichtdicke (Kap. 2.2.2.5) aufgrund des ermittelten Neigungswinkels der β -Faltblätter ergab einen höheren Wert ($\sim 3,9 \text{ nm}$) und auch die Berücksichtigung der Abmessungen des EGFP ($\sim 3 \times 4 \text{ nm}$, Abb. 1.3) beweisen, dass eine Proteinschicht mit so geringer Schichtdicke nicht geschlossen sein kann.

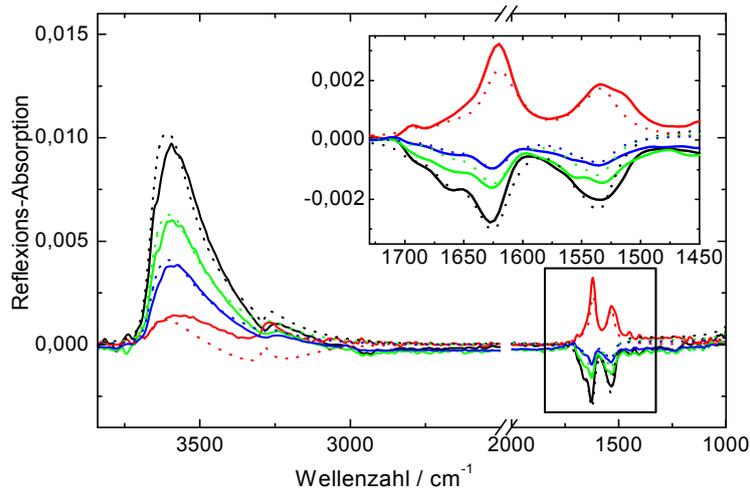


Abb. 3.10: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) IRRA-Spektren des EGFP Films an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0), bei 20 °C. Schwarz: p-pol, 40°; Rot: p-pol, 60°; Grün: s-pol 40°; Blau: s-pol 60°; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Für die Ausrichtung der β -Faltblätter wurde ermittelt, dass sie im Bezug zur Oberflächennormalen um 20 ° geneigt sind. Dieser Wert ist eine Mittelung über die Neigung aller im Molekül enthaltenen β -Faltblätter. Durch die spezielle Anordnung der β -Faltblätter in der Faserstruktur, ist eine einfache Abschätzung der Lage des Moleküls an der Grenzfläche mit Hilfe des ermittelten Neigungswinkels nicht möglich.

Da sich die Proteinstruktur während der Adsorptionsmessung nicht verändert, können durch die Ermittlung der Flächen unter den Kurven prozentuale Anteile der einzelnen Sekundärstrukturen ermittelt werden. Natürlich ist diese Berechnung nur eine grobe Einschätzung, kann aber zum Vergleich mit den Spektren des adsorbierten Moleküls des chimären Proteins herangezogen werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Extinktionskoeffizienten α -helikaler und β -Faltblattstrukturen nicht identisch sind. Buffeteau und Mitarbeiter haben sich mit der Ermittlung dieser Koeffizienten beschäftigt und gezeigt, dass das Verhältnis der α -helikalen bzw. β -Faltblatttextinktionskoeffizienten bei ungefähr 1 : 1,123 liegt ^[99]. Für die Berechnung der prozentualen Anteile wurden ausschließlich die Flächen der Amid I Bande herangezogen und die Flächenwerte der β -Faltblätter mit dem Betrag 1,123 gewichtet. Demnach entfallen ~71 % der Sekundärstruktur des EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf β -Faltblätter und entsprechend ~29 % auf α -Helices.

3.2.2.2 IRRA-spektroskopische Untersuchung des i16/EGFP-Films

Die Oberflächenaktivitätsmessungen der Vorversuche in Kap. 3.2.1.1 zeigten, dass die Proteine EGFP und i16/EGFP unterschiedliche Adsorptionsgeschwindigkeiten an die Luft/Wasser-Grenzfläche aufweisen und verschiedene, maximale Filmdrücke erreicht werden.

In Abb. 3.11 ist die zeitabhängige Druckänderung nach der Injektion der i16/EGFP-Proteinlösung während der IRRA-spektroskopischen Messung zu sehen. Ein Vergleich mit der reinen Oberflächenaktivitätsmessung zeigte eine gute Reproduzierbarkeit der Messdaten. Es wurde ein ähnlich hoher, maximaler Filmdruck gemessen, allerdings stellte sich ein Gleichgewicht erst nach einer längeren Inkubationszeit ein (Abb. 3.11 A).

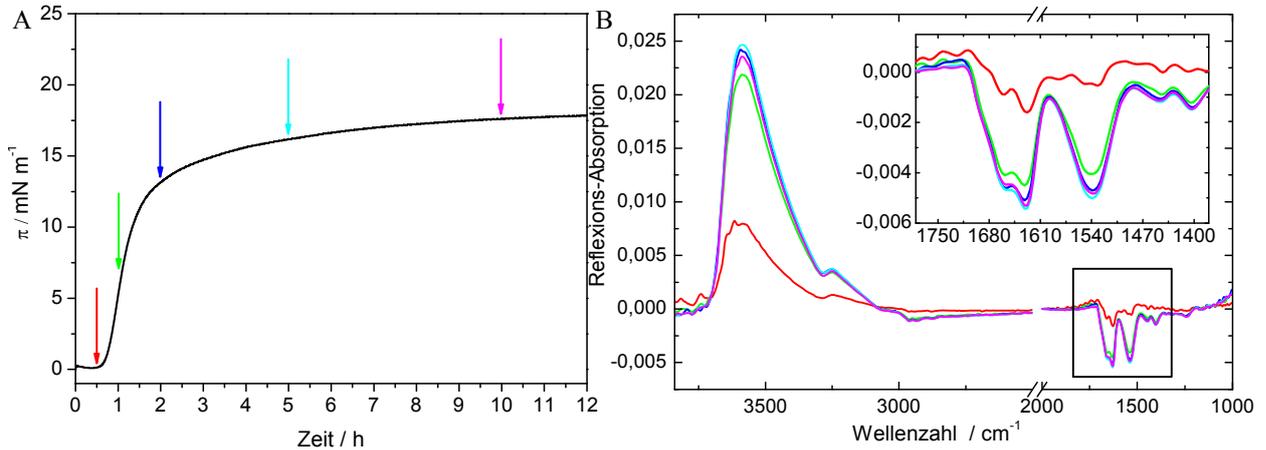


Abb. 3.11: Oberflächenaktivität von i16/EGFP (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die simultan aufgenommenen Spektren änderten sich drastisch innerhalb der ersten Stunde nach der Injektion (Abb. 3.11 B). Nach zweistündiger Adsorptionszeit wurden keine Veränderungen der Spektren mehr beobachtet obwohl der Oberflächendruck noch nicht das Gleichgewicht erreichte. Die Entwicklung der Schichtdicke des Films an der Luft/Wasser-Grenzfläche wurde anhand der Ausbildung der $\nu(\text{OH})$ Bande bei $\sim 3585 \text{ cm}^{-1}$ verfolgt. Die Amid I Bande zeigte sich als Doppelbande mit einem Minimum bei 1631 cm^{-1} und einem intensitätsschwächeren Minimum bei 1658 cm^{-1} . Diese Beobachtung spricht für eine Proteinstruktur, die hauptsächlich aus β -Faltblättern aufgebaut ist aber auch einen erheblichen α -helikalen Anteil besitzt. Da EGFP hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen besteht, kann geschlossen werden, dass die α -helikalen Strukturelemente vom Signalpeptid stammen, d.h. dass das Signalpeptid durch die Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche eine α -helikale Struktur annimmt. Denn aus CD-spektroskopischen Untersuchungen des i16/EGFP in Lösung ist bekannt, dass die Peptidsequenz unter diesen Bedingungen als Zufallsknäuel organisiert ist^[100].

Die winkelabhängig gemessenen Spektren des Proteinfilmes bildeten erneut die Grundlage zur Bestimmung der Orientierung der Moleküle an der Luft/Wasser-Grenzfläche und der unterschiedlichen Sekundärstrukturanteile.

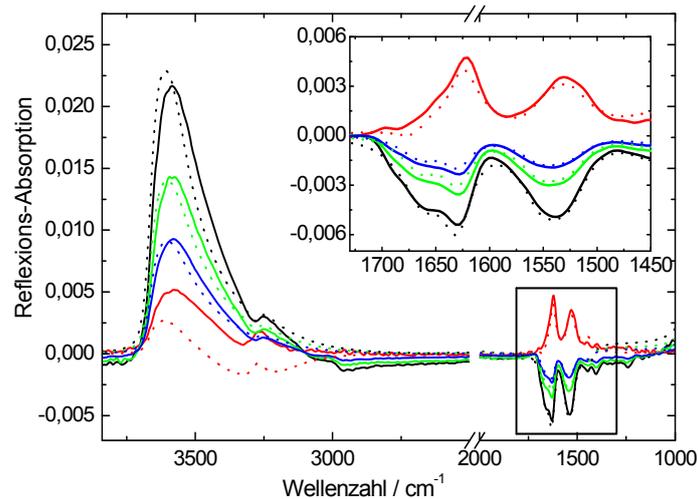


Abb. 3.12: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) Spektren des i16/EGFP Films an der Luft/Wasser-Grenzfläche bei 20 °C. Schwarz: p-pol, 40°; Rot: p-pol, 60°; Grün: s-pol 40°; Blau: s-pol 60°; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Durch die Simulation der OH-Streckschwingungsbande ergibt sich, dass die Schichtdicke im Vergleich zum EGFP-Film mehr als doppelt so groß ist ($d = 2,25$ nm). Dennoch ist diese Schichtdicke zu gering als das der Proteinfilm geschlossen vorliegen kann. Auf der Grundlage der Abmessungen des EGFP-Moleküls lag der berechnete Schichtdickenwert bei $\sim 3,8$ nm. Allerdings wird deutlich, dass durch den Einfluss des gebundenen Signalpeptides eine größere Anzahl von Molekülen adsorbiert. Zudem wurde ein Neigungswinkel der β -Faltblätter von 30° bestimmt, was bedeutet, dass auch die Orientierung der Moleküle verändert ist. Dieser Effekt könnte direkt durch das gekoppelte Peptid hervorgerufen oder indirekt durch die verstärkte Adsorption bewirkt worden sein.

Die Anteile der Sekundärstrukturen sind beinahe ausgeglichen. So entfallen $\sim 56\%$ auf β -Faltblätter und dementsprechend $\sim 44\%$ auf α -Helices. Die Zunahme des α -helikalen Anteils ist damit deutlich belegt.

In den Vorversuchen wurde gezeigt, dass die Ionenstärke der Subphase einen Einfluss auf die Adsorption der Proteinmoleküle hat. Aus diesem Grund wurde die Oberflächenaktivität des chimären EGFP zusätzlich in Puffer mit niedriger Ionenstärke gemessen. Abb. 3.13 A zeigt, dass der maximal erreichte Oberflächendruck nach der Injektion niedriger war als bei der Messung mit hoher Ionenstärke in der Subphase, in der möglicherweise die Ladungsabschirmung eine höhere Adsorption an der Grenzfläche zulässt (vgl. Abb. 3.11 A).

Die Spektren zeigen, dass die Adsorption des Proteinfilms außerdem langsamer erfolgte (Abb. 3.13 B). Erst mehr als 5 h nach der Injektion zeigte das Spektrum seine endgültige

Form. Die $\nu(\text{OH})$ Bande (3585 cm^{-1}) zeigte eine ähnlich starke Intensität, was auf eine ähnliche Schichtdicke hinweist. Auch die proteinspezifischen Banden zeigten ähnliche Positionen und Form, deren Intensitäten ebenfalls mit denen der oben beschriebenen Messung mit einer Subphase mit hoher Ionenstärke vergleichbar sind.

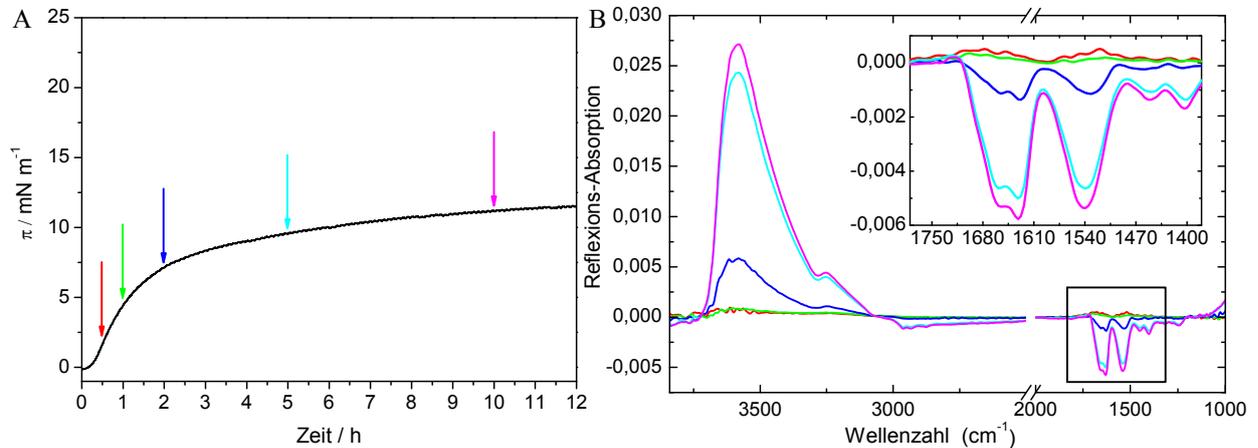


Abb. 3.13: Oberflächenaktivität von i16/EGFP (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer II (20 mM Tris, pH 8,0) bei 20°C . A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptionsspektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Zusammenfassend bedeuten die Ergebnisse, dass die Ionenstärke der Subphase Einfluss auf die Adsorptionsgeschwindigkeit hat aber der entstehende Proteinfilm eine ähnliche Organisation aufweist.

3.2.2.3 IRRA-spektroskopische Untersuchung des Signalpeptidfilms

Um IRRA-Spektren mit gutem Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurde zunächst eine hohe Peptidkonzentration von 1000 nM verwendet.

Während der Injektion des Signalpeptides wurde ein sofortiger Anstieg des Oberflächendruckes auf $\sim 7 \text{ mN m}^{-1}$ beobachtet (Abb. 3.14 A). Möglicherweise blieben während der Injektion durch die Pufferoberfläche Peptidmoleküle direkt an der Grenzfläche hängen. Es ist dennoch anzunehmen, dass der größte Teil der Peptidlösung in die Subphase gelangte. Nach der Injektion folgte zunächst eine geringe Abnahme des Oberflächendruckes auf $\sim 6 \text{ mN m}^{-1}$. Die Ursache kann eine zumindest partielle Desorption von Peptidmolekülen sein. Nach $\sim 1 \text{ h}$ stieg der Oberflächendruck wieder stark an. Die Ursache für den verzögerten Adsorptionsbeginn könnte das fehlende Rühren der Subphase sein. Der Oberflächendruck betrug nach $\sim 12 \text{ h}$ $\sim 27 \text{ mN m}^{-1}$. Verglichen mit dem Ergebnis des Vorversuches (Abb. 3.8 A, Magenta) ist der erreichte Oberflächendruck im Gleichgewicht $\sim 7 \text{ mN m}^{-1}$ höher. Diese

Differenz entspricht dem durch die Injektion verursachten Druckanstieg zu Beginn der Messung.

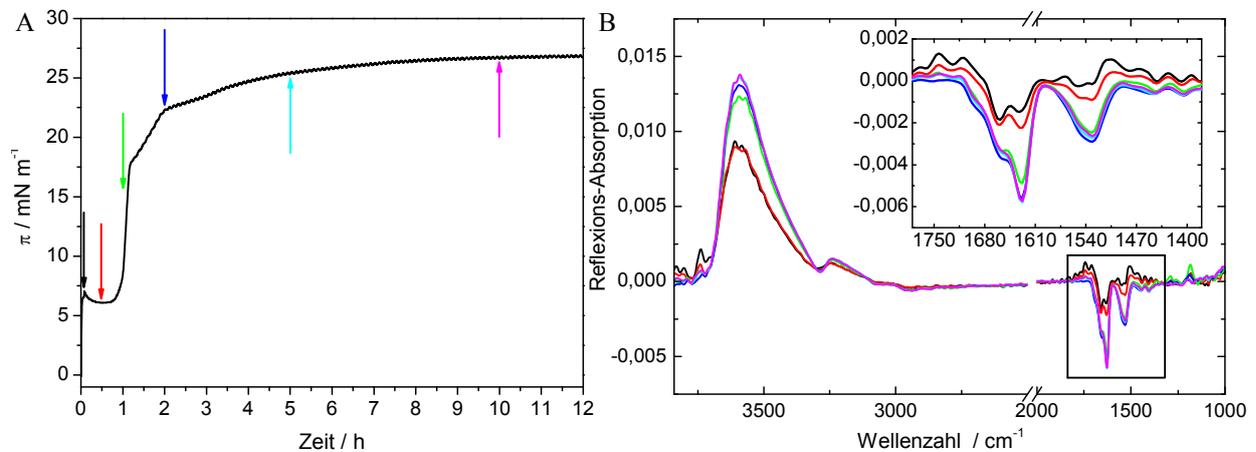


Abb. 3.14: Oberflächenaktivität von SP16 (1000 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Schon kurz nach der Injektion des Signalpeptides zeigten sich im Spektrum charakteristische, peptidspezifische Banden. Das bestätigt, dass der sprunghafte Druckanstieg während der Injektion durch die Bildung eines Peptidfilmes an der Luft/Wasser-Grenzfläche hervorgerufen wurde. Die $\nu(\text{OH})$ Bande war deutlich schwächer in ihrer Intensität als es für die Proteinfilme beobachtet wurde, was auf eine geringere Schichtdicke hindeutet. Zunächst wies die Amid I Bande zwei Minima auf. Das intensitätsstärkere Minimum (1659 cm^{-1}) zeigt α -helikale Strukturen an, während die intensitätsschwächere Bande (1632 cm^{-1}) die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen anzeigt. Nach ~ 30 min verschob sich das Intensitätsverhältnis zugunsten der β -Faltblattstrukturen. Die intensitätsschwachen Banden bei 1291 cm^{-1} und 1184 cm^{-1} wurden durch TFE hervorgerufen. Dass diese Signale positiv sind, liegt an dem senkrecht zur Wasseroberfläche ausgerichteten Übergangsdipolmoment der C-F Bindungen der CF_3 -Gruppe im Molekül. Nach ~ 1 h nahm die Intensität der proteinspezifischen Banden stark zu. Die Amid I Bande entwickelte sich zu einer asymmetrischen Bande mit einem Minimum bei 1623 cm^{-1} und einer Schulter bei 1657 cm^{-1} . Das β -Faltblatt scheint die vorherrschende Sekundärstruktur des Peptides an der Luft/Wassergrenzfläche zu sein. Im Gegensatz zur Intensitätszunahme der peptidspezifischen Banden, gingen die TFE Banden zurück.

In der Gleichgewichtsphase wurden Spektren in Winkelabhängigkeit des einfallenden IR-Strahls gemessen (Abb. 3.15). Durch die Simulationen dieser Spektren wurde ermittelt, dass im Gleichgewicht $\sim 59\%$ der Peptidstrukturen als β -Faltblatt vorkommen, die flach an der Oberfläche liegen. Die α -helikalen Strukturelemente sind um $\sim 90^\circ$ geneigt, was auf eine

ebenfalls flach liegende Helix hinweist. Für die Schichtdicke wurde ein Wert von $d = 1,4$ nm bestimmt, was auf einen geschlossenen Peptidfilm hindeutet.

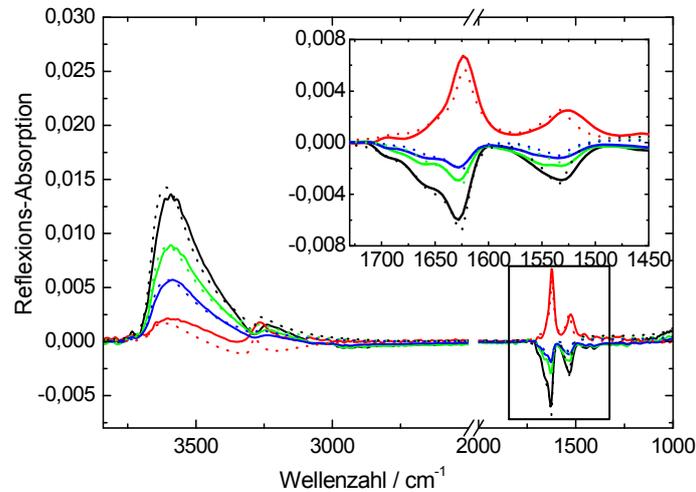


Abb. 3.15: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) Spektren des SP16 Films an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Schwarz: p-pol, 40°; Rot: p-pol, 60°; Grün: s-pol 40°; Blau: s-pol 60°; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Es ist bekannt, dass das Lösungsmittel TFE die Ausbildung α -helikaler Strukturen im Peptid erleichtert^[101]. Dass das Signalpeptid auch in der Subphase als α -Helix vorliegt und sich als solche an die Luft/Wasser-Grenzfläche gelangt, ist dennoch unwahrscheinlich. Nach der Injektion der Peptidlösung wird das Lösungsmittel so stark verdünnt, dass es keinen Einfluss mehr auf die Peptidstruktur haben sollte. Durch die Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche organisiert sich das Peptid zunächst in α -Helices und verändert seine Konformation hin zu β -Faltblättern. Dieser Prozess könnte sterische Gründe haben. So kommt es wahrscheinlich durch die Anordnung einer großen Anzahl von Peptidmolekülen zur Aggregation.

Um dieses Phänomen als Ursache der Konformationsänderung zu untersuchen, wurde eine Messung mit gestaffelter Proteinzugabe durchgeführt. Nach der ersten Injektion resultierte eine Peptidkonzentration von 100 nM in der Subphase. Durch den Injektionsvorgang stieg der Oberflächendruck schnell an, sank aber innerhalb weniger Sekunden wieder auf 2 mN m^{-1} ab (Abb. 3.16 A). Das Spektrum in Abb. 3.16 B zeigt deutlich die Bildung des Peptidfilmes an der Luft/Wasser-Grenzfläche auch bei so geringer Peptidkonzentration. Die Amid I Bande lag bei 1659 cm^{-1} , was für eine α -helikale Sekundärstruktur spricht. Die durch TFE verursachten Banden bei 1290 cm^{-1} und 1180 cm^{-1} waren in den ersten Spektren ebenfalls deutlich zu sehen, nahmen während der Messung stetig ab und waren schließlich nicht mehr zu erkennen.

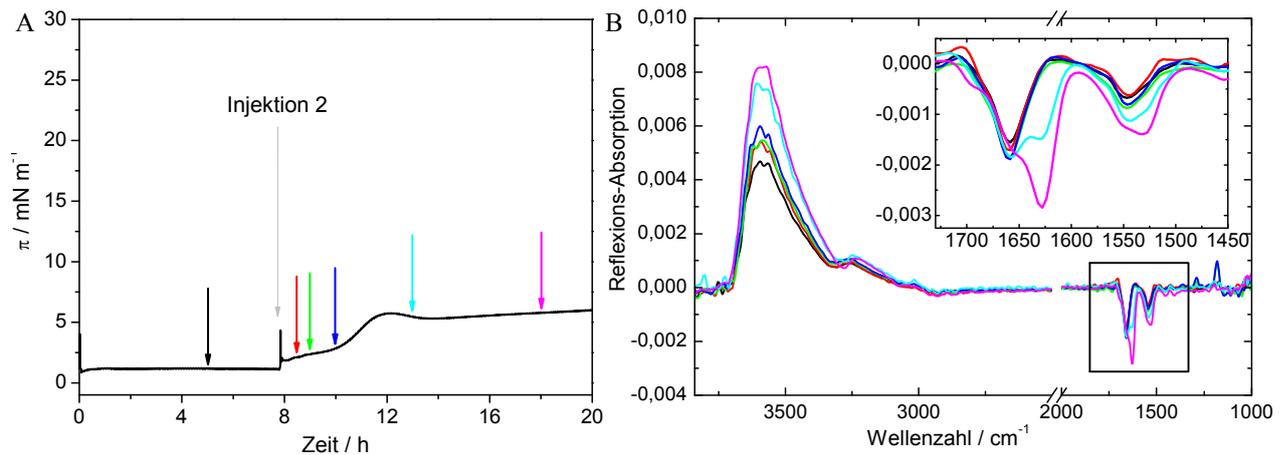


Abb. 3.16: Oberflächenaktivität von SP16 (100 nM und 200 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion 1 (Zeit = 0 h) und Injektion 2 (Zeit = 7:50 h, grauer Pfeil), farbige Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Nach einer Messzeit von 8 h wurde erneut Peptidlösung injiziert. Die Konzentration des Signalpeptides im Trog wurde somit auf ~200 nM erhöht. Durch den Injektionsprozess kam es wieder zu einer Druckzunahme gefolgt von einem leichten Druckabfall. Auch hier wurde der Ausgangsdruck nicht wieder erreicht. Ein Gleichgewicht stellte sich allerdings nicht ein, sondern die Druckänderung durchlief ein Maximum (Abb. 3.16 A). Zunächst zeigten sich keine Veränderung des Spektrums durch die erneute Zugabe von Signalpeptid, mit Ausnahme der TFE Banden (Abb. 3.16 B). Erst ~5 h nach der zweiten Injektion nahm die Intensität der $\nu(\text{OH})$ Bande zu, was auf eine Erhöhung der Schichtdicke des Peptidfilmes schließen lässt. Die deutlichsten Veränderungen erfuhren die Amid I und II Banden. Aus der symmetrischen Amid I Bande entwickelte sich zunächst eine Doppelbande (1660 cm^{-1} und 1628 cm^{-1}), was die Ausbildung von zusätzlichen β -Faltblattstrukturen zeigt. Im weiteren Adsorptionsverlauf bildete sich eine asymmetrische Bande mit einem Minimum bei 1628 cm^{-1} und nur noch einer schwachen Schulter bei 1660 cm^{-1} . Die Entstehung von β -Faltblattstrukturen spiegelte sich auch in der Verbreiterung und schließlich der Verschiebung (von 1547 cm^{-1} zu 1531 cm^{-1}) der Amid II Bande wieder. Die Amid A Bande verschob sich von $\sim 3320\text{ cm}^{-1}$ zu $\sim 3280\text{ cm}^{-1}$, was ebenfalls auf die Konformationsänderung zurückzuführen ist. Auch in der Isotherme (Abb. 3.16 A) ist die Umwandlung von α -Helices zu β -Faltblättern in Form des Maximums der Druckänderung nachzuvollziehen.

Die Resultate lassen darauf schließen, dass die Bildung von β -Faltblattstrukturen tatsächlich durch die erhöhte Peptidkonzentration beeinflusst wird.

Mittels Filmwaagemessungen wurde gezeigt, dass sowohl die Proteine als auch das Peptid oberflächenaktiv sind und Protein- bzw. Peptidfilme an der Grenzfläche ausbilden. Außerdem wurde festgestellt, dass für i16/EGFP und SP16 die Erhöhung der Ionenstärke der Subphase einen Anstieg der Adsorptionsaktivität bewirkt.

Die IRRA-spektroskopischen Messungen der Protein/Peptidfilme erlaubten Einblicke in die Sekundärstrukturen und die Orientierungen der adsorbierten Moleküle. Wie erwartet, wurde gezeigt, dass EGFP vorwiegend aus β -Faltblattstrukturen aufgebaut ist. Das chimäre Protein zeigte zusätzlich einen deutlich höheren α -helicalen Anteil, der wahrscheinlich durch das Signalpeptid hervorgerufen wird. Das Signalpeptid hat außerdem Einfluss auf die Orientierung des EGFP-Moleküls. Es wurde ermittelt, dass die β -Faltblätter des reinen EGFP einen Neigungswinkel von 20° aufweisen, wohingegen die des i16/EGFP um 30° geneigt sind. Für beide Proteine konnte durch die Berechnung der Schichtdicke ermittelt werden, dass die ausgebildeten Proteinfilm nicht geschlossen vorliegen. Filmwaagemessungen zur Adsorption des Peptides an die Luft/Wasser-Grenzfläche zeigten, bei der Verwendung geringer Peptidkonzentrationen, einen zweistufigen Adsorptionsprozess, der darauf schließen lässt, dass es nach der Anordnung der ersten Moleküle an der Grenzschicht zu einer Umorientierung kommt. Dadurch wird die Möglichkeit der Anlagerung weiterer Moleküle geschaffen. Dieser Prozess kann mittels IRRA-Spektroskopie ebenfalls beobachtet werden. Bei geringer Peptidkonzentration sind die adsorbierten Peptidmoleküle zunächst hauptsächlich α -helikal strukturiert. Durch die Erhöhung der Konzentration und damit der Adsorption weiterer Moleküle ändert sich die Struktur hin zu β -Faltblättern. Nach dieser Umformung liegen die Faltblätter in einem geschlossenen Peptidfilm flach an der Grenzfläche. Allerdings besteht die Peptidschicht nicht ausschließlich aus Faltblättern. Zu geringeren Anteilen sind auch α -helikale Strukturen erhalten, die sich ebenfalls flach an der Grenzfläche anordnen. Für die Adsorptionsmessungen an Lipidmonoschichten bedeutet das, dass möglichst geringe Peptidkonzentrationen verwendet werden sollten um die Aggregation zu β -Faltblättern zu unterbinden.

3.3 Adsorption der Proteine und des Peptides an Lipidmonoschichten

Nach der Charakterisierung der Lipide und der Untersuchung der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche war es von Interesse Interaktionen zwischen diesen beiden Molekülspezies zu analysieren. Im den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Interaktionsuntersuchungen mittels Filmwaage und IRRS-Spektroskopie vorgestellt.

3.3.1 Zeitabhängige Adsorption der Proteine und des Peptides an Monoschichten des Thylakoid-Lipidgemisches

Von besonderem Interesse waren die Interaktionsstudien der verschiedenen Proteine und des Peptides mit einer der Zusammensetzung der Thylakoidmembran nachempfunden Monoschicht (Kap. 3.1.1).

3.3.1.1 Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstanter Fläche

Adsorptionsexperimente wurden bei konstant gehaltener Fläche und unterschiedlichen Ausgangsdrücken des gespreiteten Lipidfilms durchgeführt und die zeitabhängige Druckänderung nach der Injektion der Protein/Peptidlösungen verfolgt.

Adsorption von EGFP an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Nach der Injektion der EGFP-Proteinlösung zu einem Thylakoid-Lipidfilm mit einem lateralen Oberflächendruck von etwa $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ wurde keine Veränderung des Druckes festgestellt, was bedeutet, dass das Protein in der zugegebenen Konzentration von 100 nM nicht mit den Lipiden in Wechselwirkung tritt. Auch bei einem Filmdruck von $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ wurde keine Interaktion zwischen EGFP und den Lipiden gemessen. Wurde eine Monoschicht mit noch geringerem Ausgangsdruck ($\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$) vorgelegt, stieg kurz nach der Injektion der Proteinlösung der Oberflächendruck leicht an.

Aus einer Auftragung von $\Delta\pi$ gegen π_{initial} kann der maximale Oberflächendruck π_{krit} der Monoschicht abgeschätzt werden, bei dem noch ein Einbau des Proteins erfolgt (Kap. 2.2.1.2). Für EGFP ergab sich ein maximaler Einbaudruck von $33,5 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 3.17 A), was bedeuten würde, dass EGFP spontan in Membranen integrieren kann. Allerdings ist π_{krit} mit Fehlern behaftet, da die Adsorption bei nur drei Ausgangsdrücken gemessen wurde. Aufgrund der geringen Adsorptionsstärke bei einem Oberflächendruck von 30 mNm^{-1} ist nicht eindeutig zu entscheiden, ob EGFP in eine Membran insertieren kann. Auf Grund der Struktur und der geringen Oberflächenaktivität ist jedoch davon auszugehen, dass kein Membraneinbau stattfindet.

Adsorption von i16/EGFP an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Die Ergebnisse der Oberflächenaktivitätsmessungen zeigten, dass das an EGFP gekoppelte Signalpeptid Einfluss auf das Adsorptionsverhalten an die Luft/Wasser-Grenzfläche hat (Kap. 3.2.1.1 und 3.2.2.2). Möglicherweise beeinflusst es auch die Interaktion mit Lipiden.

Die Adsorptionsmessungen des i16/EGFP an Thylakoidmonoschichten zeigten, dass $\Delta\pi$ mit der Erniedrigung des Ausgangsdruckes π_{initial} stieg (Abb. 3.19 A). Bei einem hohem Ausgangsdruck ($\sim 28 \text{ mN m}^{-1}$) wurde ein geringer Druckanstieg gemessen ($\Delta\pi_{2\text{h}} = 1,6 \text{ mN m}^{-1}$). Bei einem Ausgangsdruck von $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ stieg der Druck 2 h nach der Injektion um $5,1 \text{ mN m}^{-1}$ und bei einem noch kleineren lateralen Druck von 10 mN m^{-1} um $10,6 \text{ mN m}^{-1}$. In allen Messungen fiel der Druck schon kurze Zeit nach Erreichen der maximalen Druckänderung wieder ab.

Die Ermittlung des maximalen Einbaudruckes ergab einen Wert von $\sim 31,0 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 3.17 A). Die Ergebnisse zeigen, dass i16/EGFP wahrscheinlich in der Lage ist sich spontan in eine Membran einzubauen.

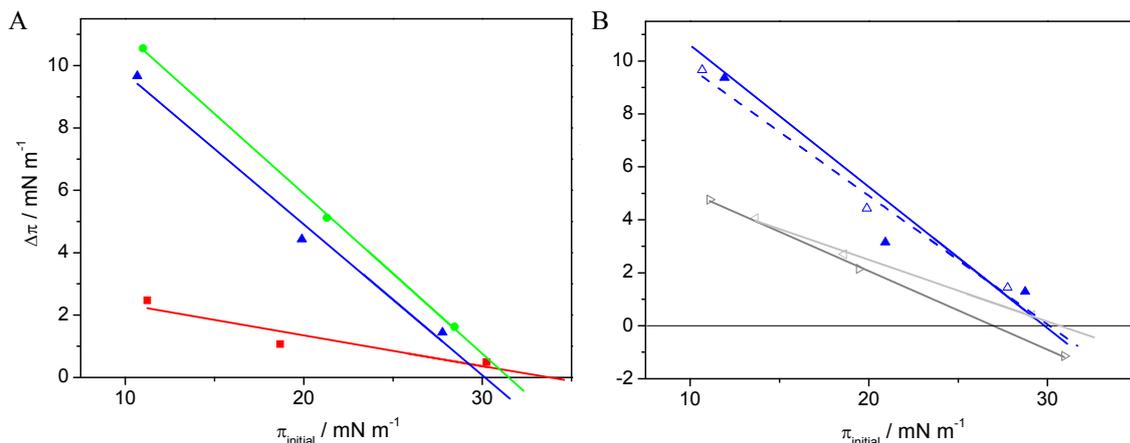


Abb. 3.17: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG:DGDG:SQDG:PG 55: 27: 7: 11 mol-%) durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion der Proteine bzw. des Peptides, auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Protein/Peptidkonzentration: 100 nM Rot: EGFP; Grün: i16EGFP; Blau: SP16. B: Adsorption des Signalpeptides mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen, Blau: 100 nM; Blau gestrichelt: 500 nM; bzw. unterschiedlichen Peptidstammlösungen Grau: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 + 0,8 % TFE; Hellgrau: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0 + 0,2 % TFE.

Adsorption des Signalpeptides (SP16) an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Es wurde die Interaktionsfähigkeit des in Puffer gelösten Signalpeptides, denen 0,2 mol-% bzw. 0,8 mol-% TFE zugegeben waren, untersucht. Die Ergebnisse beider Messreihen zeigten vor allem bei niedrigeren Initialdrücken von 10 und 20 mN m^{-1} sehr ähnliche Ergebnisse. Bei einem Ausgangsdruck von 30 mN m^{-1} wurden stärkere Abweichungen der Adsorptionsstärke beobachtet (Abb. 3.17 B). Es wurden maximale Einbaudrucke von $\sim 30,5 \text{ mN m}^{-1}$ für die

Messreihe mit geringer TFE-Konzentration bzw. von $\sim 27 \text{ mN m}^{-1}$ für die Messreihe mit höherer TFE-Konzentration ermittelt (Abb. 3.17 B).

Eine stärkere Druckänderung nach der Injektion wurde beobachtet, wenn das Signalpeptid ausschließlich in TFE gelöst war. Nach der Injektion der Peptidlösung zu einem Thylakoidlipidfilm mit einem Ausgangsdruck von $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ stieg der Druck in den ersten 2 h um $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ und blieb dann im Gleichgewicht. Wurde der Ausgangsdruck auf $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ eingestellt, stellte sich ein Gleichgewicht erst ~ 5 h nach der Injektion ein. Die Druckänderung betrug dann $\sim 6 \text{ mNm}^{-1}$. Nach der Zugabe des Signalpeptides unter eine Lipidschicht mit einem lateralen Filmdruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ war nach 1,5 h der maximale Druckanstieg von $1,5 \text{ mN m}^{-1}$ erreicht. Die Gleichgewichtsphase war sehr kurz, ~ 2 h nach der Injektion begann der Druck deutlich zu sinken. Die Ermittlung des maximalen Einbaudruckes ergab, dass auch das in TFE gelöste Signalpeptid bei einer Konzentration von 100 nM nur unterhalb von 30 mN m^{-1} in Monoschichten eingebaut wird.

Durch die Vorversuche zur Ermittlung der Oberflächenaktivität des Peptides wurde festgestellt, dass eine Konzentration über 100 nM eingesetzt werden muss um eine Sättigung in der Subphase zu erreichen und damit das Entstehen eines geschlossenen Peptidfilmes im betrachteten Zeitraum zu gewährleisten. Daher wurden zusätzlich Adsorptionsmessungen an Lipidmonoschichten mit einer Signalpeptidkonzentration von 500 nM angefertigt. Verglichen mit den Untersuchungen mit geringen Peptidkonzentrationen waren die maximal erreichten Druckwerte sehr ähnlich. In den Adsorptionsverläufen ließen sich allerdings Unterschiede feststellen. Die Druckanstiege nach der Injektion der Peptidlösungen zu Lipidfilmen mit Ausgangsdrücken von 10 bzw. 20 mNm^{-1} waren wesentlich steiler. Lag eine Lipidmonoschicht mit einem Oberflächendruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ vor, stieg der Druck nach der Injektion der Peptidlösung kontinuierlich, bis sich nach ~ 3 h ein Gleichgewicht ausbildete. Die Extrapolation der Daten ergab auch hier einen Wert des maximalen Einbaudruckes von unter 30 mN m^{-1} (Abb. 3.17 B).

3.3.1.2 Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstantem Druck

Die Messungen bei konstant gehaltenem Druck dienten als Vorversuche der IRRA-spektroskopischen Messungen. Sie sollten helfen geeignete, einheitliche Untersuchungsbedingungen für die Adsorptionsstudien der verschiedenen Substrate (EGFP, i16/EGFP, SP16) zu finden. In diesem experimentellen Aufbau wurde der Oberflächendruck des Thylakoidlipidfilms konstant gehalten und nach der Injektion der Proteinlösung die zeitabhängige Änderungen der Fläche beobachtet (2.2.1.2).

Adsorption von EGFP an Thylakoid-Lipidmonoschichten

In Kap. 3.3.1.1 wurde gezeigt, dass EGFP nur schwach mit Lipidmonoschichten interagiert. Bei einem hohen Oberflächendruck von 30 mN m^{-1} wurde nach der Proteininjektion erwartungsgemäß keine Flächenänderung festgestellt. In Messungen mit niedrigeren, lateralen Filmdrücken wurden Flächenänderungen beobachtet. Wurde ein Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} vorgelegt, stellte sich nach $\sim 4 \text{ h}$ ein Gleichgewicht bei einer Flächenänderung von $>3 \%$ ein ($\Delta A_{4\text{h}} = \sim 3,5 \%$). Die Flächenänderung nach der gleichen Inkubationszeit bei der Messung mit dem geringsten Filmdruck von 10 mN m^{-1} betrug $\sim 10 \%$. Ein Gleichgewicht wurde in der betrachteten Zeit nicht erreicht.

Adsorption von i16/EGFP an Thylakoid-Lipidmonoschichten

In den Experimenten mit i16/EGFP wurden bei jedem vorgelegtem Oberflächendruck Flächenänderungen nach der Proteininjektion beobachtet. Bei einem lateralen Filmdruck von 30 mN m^{-1} erfolgte eine geringe Zunahme der Fläche pro Lipidmolekül ($\Delta A_{4\text{h}} = \sim 4 \%$). In der betrachteten Messzeit wurde kein Gleichgewicht erreicht. Wurden Monoschichten mit geringeren Oberflächendrücken vorgelegt, war eine deutliche Zunahme der Flächen pro Lipidmolekül zu erkennen. Messungen bei einem Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} zeigten, dass sich nach $\sim 4 \text{ h}$ Gleichgewichtsbedingungen einstellten. Die Flächenänderungen lagen dann zwischen 14% und 18% . Bei geringerem Oberflächendruck von 10 mN m^{-1} nahm die Fläche nach der Injektion rasant zu. Die maximale Flächenänderung konnte nicht ermittelt werden, da die maximal zur Verfügung stehende Fläche erreicht wurde, bevor sich ein Gleichgewicht einstellte.

Adsorption des Signalpeptides (SP16) an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Das Signalpeptid (100 nM) verursachte keine Flächenänderung, wenn es zu einer Lipidmonoschicht mit einem Oberflächendruck von 30 mN m^{-1} zugegeben wurde. Bei einem Filmdruck von 20 mN m^{-1} zeigte sich eine schwache Interaktion ($\Delta A_{\text{max}} = <3 \%$). Lag der Oberflächendruck von nur 10 mN m^{-1} vor, wurde eine schnelle Flächenzunahme beobachtet. Der Maximalwert konnte auch in diesem Fall nicht ermittelt werden.

3.3.1.3 Zeitabhängigen Adsorption bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

Die Vorversuche aus Kapitel 3.3.1.2 lassen darauf schließen, dass mit IRRA-spektroskopischen Untersuchungen bei einem lateralen Filmdruck von 20 mN m^{-1} detaillierte Informationen über die Adsorption der verschiedenen Substrate an Lipidmonoschichten gewonnen werden könnten. Dafür wurde die Protein/Peptidlösung nach

der Kompression des Filmes zu einem Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} durch die Oberfläche injiziert und die zeitabhängige Flächenänderung, sowie IRRA-Spektren beobachtet.

Adsorption von EGFP an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Während der Injektion der EGFP-Proteinlösung verkleinerte sich zunächst die Fläche pro Lipidmolekül, was wahrscheinlich durch die mechanische Störung der Lipidschicht hervorgerufen wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass beim Injektionsprozess mit der Injektionsspritze einzelne Lipidmoleküle mit in die Subphase gezogen wurden. Nach dem Injektionsvorgang wurde eine sehr geringe Flächenzunahme beobachtet (Abb. 3.18 A), was die Ergebnisse aus den Vorversuchen bestätigt. Nach etwa zehnstündiger Inkubationszeit stieg die Geschwindigkeit der Flächenzunahme. Der langsame Adsorptionsprozess in diesem Versuchsaufbau kann dadurch erklärt werden, dass die Subphase nicht durchmischt wurde.

Die während der Messung aufgenommenen IRRA-Spektren zeigten zunächst keine proteinspezifischen Banden (Abb. 3.18 B). Nach langer Inkubationszeit ($\sim 10 \text{ h}$) traten Änderungen im Spektrum auf, die allerdings darauf hinweisen, dass Protein in den Referenztrug gelangte und dort an die Grenzfläche adsorbierte. Das ist durch die Entstehung von positiven Banden in der Amid I und II Region des Spektrums zu erkennen. Außerdem wurde auch eine Intensitätsabnahme der $\nu(\text{OH})$ Bande beobachtet, was durch die Verrechnung des durch den entstandenen Proteinfilm verfälschten Referenzspektrums verursacht wird. Auch die Änderung der $\nu_s(\text{C}=\text{CH}_2)$ Bande, der symmetrischen und antisymmetrischen $\nu(\text{CH}_2)$ Banden und der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande können so erklärt werden.

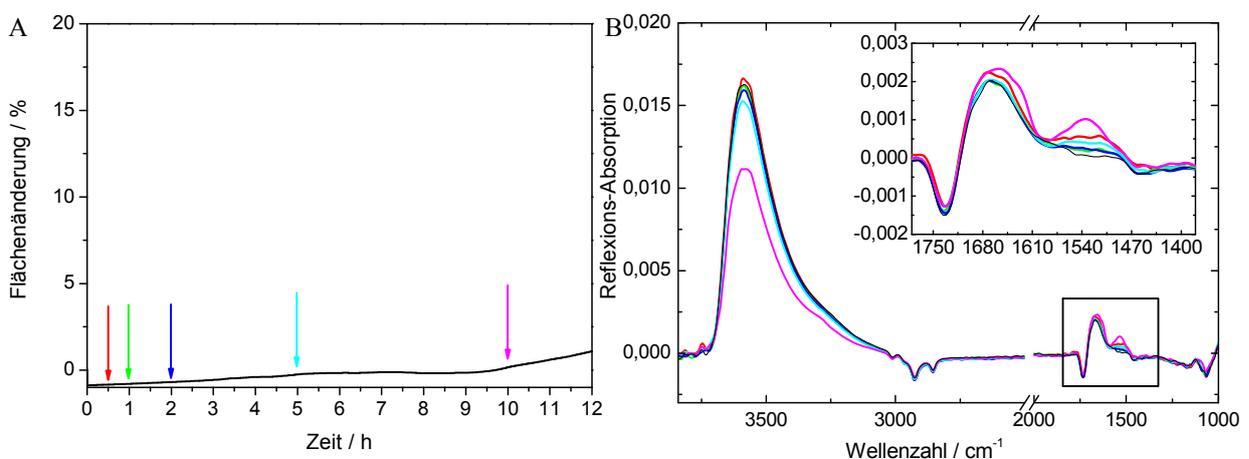


Abb. 3.18: Adsorption von EGFP (100 nM) an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20°C . A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Allgemein passen die Ergebnisse dennoch in das Bild eines nicht zur Interaktion oder Insertion mit bzw. in Lipidmonoschichten neigenden Proteins. Es wird deutlich, dass es eher dazu neigt an Luft/Wasser-Grenzflächen einen Proteinfilm auszubilden.

Adsorption von i16/EGFP an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Nach der Injektion der i16/EGFP-Proteinlösung wurde zunächst keine Flächenänderung pro Lipidmolekül festgestellt und auch in den entsprechenden Spektren sind keine Veränderungen im Bezug auf das Spektrum der reinen Lipidschicht zu erkennen (Abb. 3.19). Nach ~ 90 min begann die Flächenzunahme und erreichte nach 12 h ~ 30 % (Abb. 3.19 A).

Etwa 2 h nach der Injektion zeigten sich auch im IRRA-Spektrum deutliche Veränderungen, die durch den Einbau der Proteinmoleküle in die Lipidmonoschicht verursacht wurden. Die Schichtdicke nahm zu, was durch die Intensitätszunahme der $\nu(\text{OH})$ Bande ($\sim 3585 \text{ cm}^{-1}$) abgeleitet werden kann. Ursache ist die Einlagerung der Proteine in die Monoschicht. Proteinspezifische Banden wurden erst nach längerer Inkubationszeit beobachtet. Die Amid I Bande war als Doppelbande ausgeprägt (mit Minima bei 1652 cm^{-1} und 1629 cm^{-1}). Diese Bandenpositionen zeigen, dass α -helikale und β -Faltblattstrukturen vorliegen. Da EGFP die Struktur eines β -Barrels mit geringem α -helikalen Anteilen hat, muss das Signalpeptid in α -helikaler Form vorliegen. Die Wechselwirkung des i16/EGFP mit der Lipidmonoschicht erhöht offensichtlich die Tendenz des Signalpeptides zur Ausbildung einer α -helikalen Struktur.

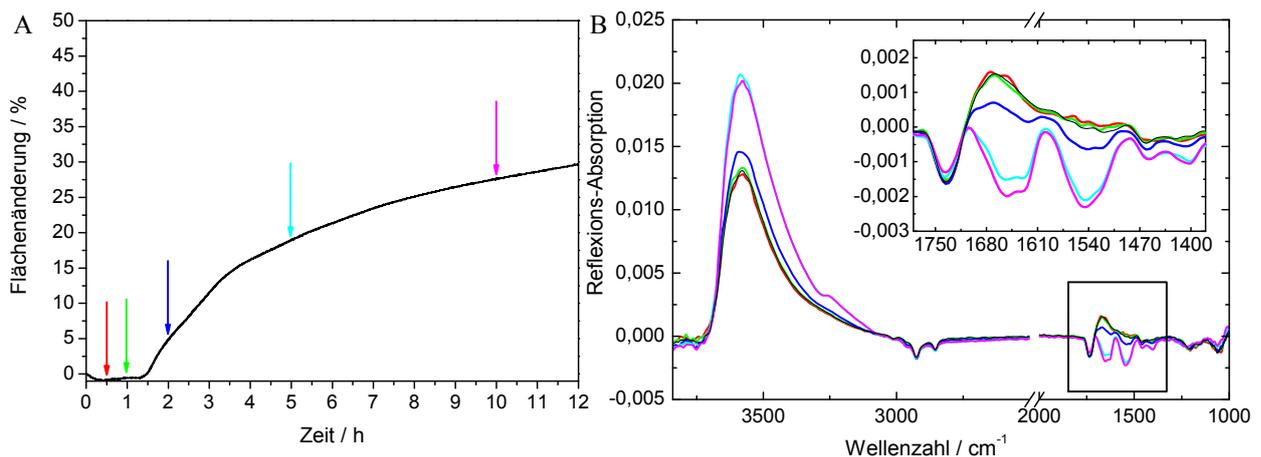


Abb. 3.19: Adsorption von i16/EGFP (100 nM) an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20°C . A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Am Ende der Messung wurden Spektren vom Protein/Lipidfilm in Abhängigkeit des IR-Einfallswinkels sowohl in p- als auch in s-Polarisation aufgenommen. In Abb. 3.20 sind

ausgewählte, gemessene und simulierte Spektren des adsorbierten i16/EGFP an die Thylakoidlipidschicht miteinander verglichen. Durch die Simulation wurde ein Neigungswinkel der β -Faltblätter von $\sim 50^\circ$ ermittelt. Das zeigt im Vergleich zur Adsorption des Proteins an die Luft/Wasser-Grenzfläche, dass die Interaktion des Proteins mit Lipiden einen Einfluss auf dessen Orientierung hat.

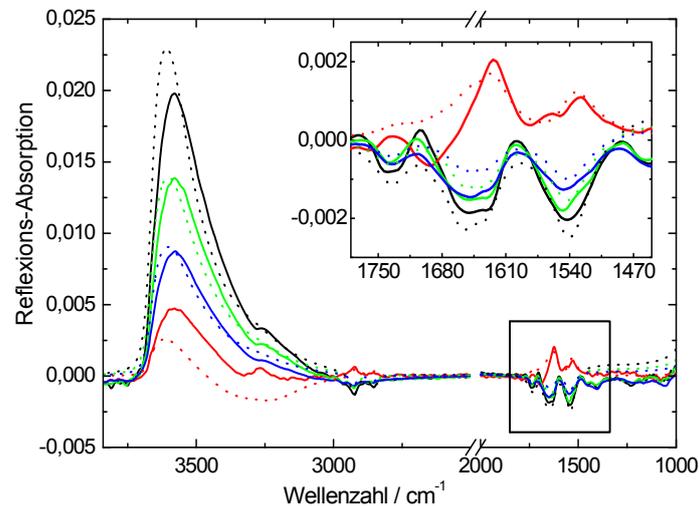


Abb. 3.20: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) Spektren des adsorbierten i16/EGFP an der Thylakoid-Lipidmonoschicht. Schwarz: p-pol, 40° ; Rot: p-pol, 60° ; Grün: s-pol 40° ; Blau: s-pol 60° ; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die Schichtdickenbestimmung durch die Simulation der OH-Bande des Protein/Lipidfilms ergab einen Wert von $d = 2,2$ nm und weist damit einen ähnlichen Wert auf, wie er für den reinen Proteinfilm ermittelt wurde (Kap. 3.2.2.2). Die Schichtdicke des reinen Lipidfilms bei 20 mN m^{-1} wurde separat mit $d = 1,44$ nm bestimmt. Die geringe Zunahme der Schichtdicke durch die Adsorption des Proteins zeigt deutlich eine Insertion in die Monoschicht. Durch eine Anlagerung des Proteins an die Lipidschicht würde eine stärkere Zunahme erwartet werden.

Adsorption des Signalpeptides (SP16) an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Die Adsorptionsmessung mit dem Signalpeptid wurden durch stufenweise Injektion zur Erhöhung der Peptidkonzentration vorgenommen (Abb. 3.21).

Bei jedem Injektionsvorgang wurde ein rasanter Druckanstieg, gefolgt von einem sofortigen Abfall des Druckes, beobachtet. Auch die Fläche pro Lipidmolekül vergrößerte sich sprunghaft durch die Injektion. Beide Beobachtungen können auf die mechanische Störung des Systems bzw. auf das Hängenbleiben von Peptidmolekülen während des Injektionsvorganges in der Grenzschicht zurückgeführt werden.

Die erste Injektion unter die Lipidmonoschicht bei einem lateralen Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} resultierte in einer Peptidkonzentration von 100 nM in der Subphase. Durch den Injektionsvorgang vergrößerte sich die Fläche um $\sim 1 \%$. Nach $\sim 2 \text{ h}$ begann eine geringe Flächenzunahme um nochmals $\sim 1,5 \%$. Dort stellte sich ein Gleichgewicht ein. Die simultan aufgenommenen Spektren zeigten keine peptidspezifischen Banden. Ausschließlich die durch das TFE verursachten Banden (1291 cm^{-1} und 1181 cm^{-1}) während der frühen Inkubationszeit wurden beobachtet.

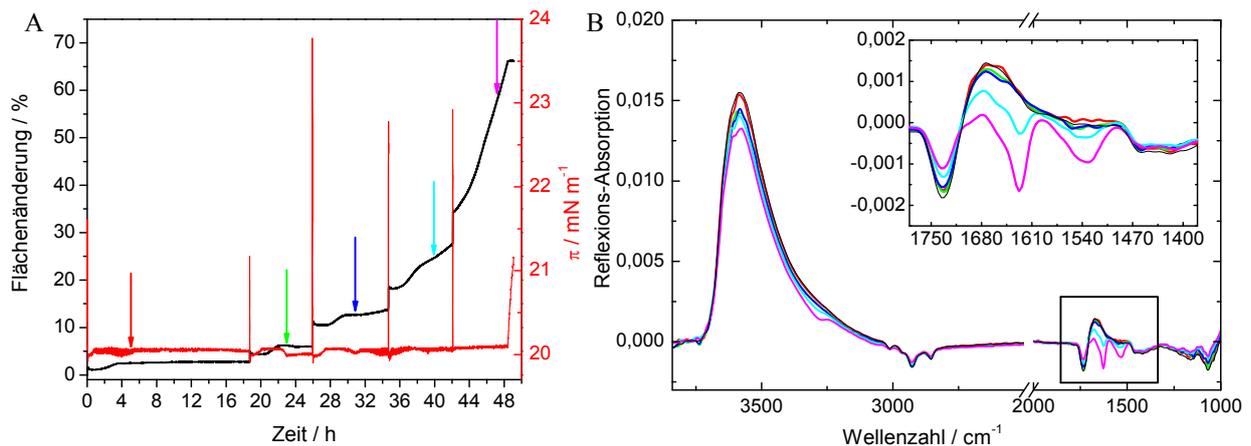


Abb. 3.21: Adsorption von SP16 ($100, 200, 300, 400$ bzw. 500 nM) an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG $55: 27: 7: 11 \text{ mol-\%}$) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer I (20 mM Tris , 500 mM NaCl , $\text{pH } 8,0$) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. A: Zeitabhängige Druck- und Flächenänderung nach stufenweise Erhöhung der Peptidkonzentration um jeweils 100 nM , Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Durch die zweite Injektion erhöhte sich die Peptidkonzentration auf 200 nM in der Subphase. Die relative Flächenänderung betrug $\sim 6 \%$. Es zeigte sich eine Intensitätsverringering der $\nu(\text{OH})$ Bande, was auf eine Schichtdickenabnahme und damit auf einen Einbau der kleinen Peptide in die Lipidmonoschicht hindeutet. Peptidspezifische Banden wurden nicht beobachtet.

Der dritte Injektionsvorgang (Peptidkonzentration von 300 nM) verursachte eine Flächenzunahme von $\sim 13 \%$. In den ersten Spektren nach der Zugabe des Peptides wurden TFE-Banden beobachtet. Nach fünfstündiger Inkubationszeit wurden außerdem sehr geringe Änderungen im Bereich der Amid I und II Banden beobachtet.

Durch die vierte Injektion stieg die Fläche pro Lipidmolekül deutlich an (bis $\sim 28 \%$). Kurz nach der Injektion bildeten sich deutlich Banden im Amid I und II Bereich aus, die hauptsächlich auf β -Faltblattstrukturen schließen lassen. Im weiteren Verlauf nahmen diese peptidspezifischen Banden zunächst ab, dann wieder zu. Diese Fluktuation ist wahrscheinlich auf peptidreiche und peptidarme Bereiche im Lipidfilm zurückzuführen. Durch die Mobilität

des heterogenen Filmes auf der Subphase gelangen die unterschiedlich zusammengesetzten Bereiche in den Fokus des IR-Strahlenganges.

Die letzte Injektion, die in einer Peptidkonzentration von 500 nM resultiert, verursachte einen schnellen Anstieg der Fläche pro Lipidmolekül bis die maximal verfügbare Fläche erreicht wurde. Die Spektren zeigten die Ausbildung einer deutlichen Amid I Bande bei 1628 cm^{-1} , was auf aggregierte β -Faltblattstrukturen hindeutet. Die Intensität der $\nu(\text{OH})$ Bande nahm leicht ab, was eine leichte Abnahme der Filmschichtdicke zeigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass EGFP nur schwach mit Monoschichten bestehend aus den Hauptbestandteilen der Thylakoidmembran interagiert. Dagegen zeigten sowohl das chimäre Protein (i16/EGFP) als auch das Signalpeptid (SP16, gelöst in TFE) deutliche Wechselwirkungen mit den Lipiden. Eine Erhöhung der Peptidkonzentration hat lediglich Einfluss auf die Geschwindigkeit der Adsorption, nicht aber auf die Maximalwerte der hervorgerufenen Druckänderung oder den maximalen Einbaudruck. Die Abschätzung des maximalen Einbaudruckes zeigte, dass eine spontane Insertion in Membranen sowohl des i16EGFP als auch des Peptides wahrscheinlich nur in geringem Ausmaß stattfindet.

Durch die starke Verdünnung des Peptides und die Zugabe der geringen Mengen TFE, ist es nicht gelungen, eine praktikable Stammlösung herzustellen. Die Beeinflussung der Struktur des Peptides durch das Lösen in reinem TFE wurde durch das geringe Injektionsvolumen in den Messungen und damit einer starken Verdünnung in der Subphase entgegengewirkt.

Die IRRA-spektroskopische Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von EGFP an eine Lipidmonoschicht ergab, dass kein Einbau des Proteins zwischen die Lipidmoleküle erfolgt. Für das chimäre Protein (i16/EGFP) wurde gezeigt, dass sich der α -helikale Strukturanteil des Proteins in Wechselwirkung mit Lipiden, verglichen mit dem reinen Proteinfilm, vergrößert. Außerdem wirkt sich die Interaktion mit Lipiden auch auf den Neigungswinkel der β -Faltblätter im Molekül aus ($\theta \sim 50^\circ$). Wurde das Signalpeptid in geringen Konzentrationen für die Adsorptionsmessungen eingesetzt, wurden keine Wechselwirkungen beobachtet. Durch Erhöhung der Konzentration zeigte sich eine deutliche Wechselwirkung zwischen Peptid und den Lipiden, wobei das Peptid an der Grenzfläche aggregiert.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass das gekoppelte Signalpeptid nicht nur für die spezifische Bindung an die Proteine des Translokationskomplexes essentiell ist, sondern auch eine vorhergehende Interaktion des zu transportierenden Proteins mit der Membran begünstigt. Shanmugham et al. zeigte durch die Kopplung Sec- und Tat-spezifischer

Signalpeptide an GFP, dass diese Peptidsequenzen eine Bindung des Proteins an Lipide ermöglichen^[102]. Auch mit dem in dieser Arbeit verwendeten Signalpeptid, allerdings gekoppelt an ein anderes Protein, wurden solche Beobachtungen gemacht^[103] und bestätigen damit die beschriebenen Ergebnisse und dass für die Wechselwirkung mit den Lipiden hauptsächlich das Signalpeptid verantwortlich ist.

3.3.1.4 Der Einfluss der Ionenstärke der Subphase auf die Adsorption der Proteine und des Peptids an Lipidmonoschichten

In den Oberflächenaktivitätsmessungen der Proteine und des Peptides wurde unter anderem das Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Subphase untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Ionenstärke den größten Einfluss auf die Adsorption des i16/EGFP hat (Kap. 3.2.1.1 und Abb. 3.7). Es wurde untersucht, ob es einen ähnlichen Einfluss die Ionenstärke der Subphase auf die Wechselwirkung der Proteine und des Peptides mit den Lipiden der Monoschicht gibt.

Filmwaagemessungen

EGFP zeigte keine Wechselwirkungen mit den Lipiden, wenn die Ionenstärke der Subphase niedrig ist.

Die Adsorptionsstärke von i16/EGFP an die Thylakoidlipidschicht unter Verwendung eines Puffers mit geringer Ionenstärke war im Vergleich zu den Messungen mit hoher Ionenstärke in der Subphase geringer. Es ergab sich aus der Extrapolation der Daten ein höherer maximaler Einbaudruck von $\sim 34 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 3.22). Allerdings ist dieser mit einem hohen Fehler behaftet und daher wenig aussagekräftig.

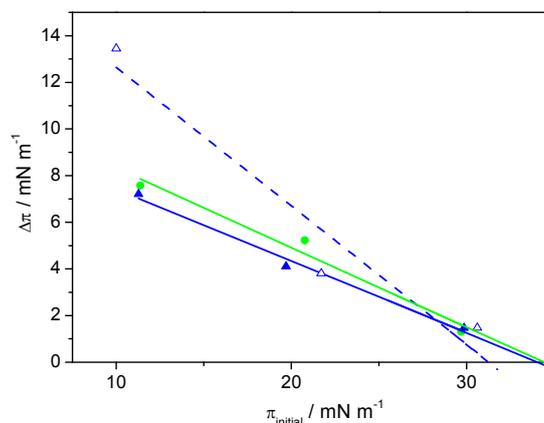


Abb. 3.22: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG:DGDG:SQDG:PG 55: 27: 7: 11 mol-%) durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion des Proteins bzw. des Peptides, auf Puffer II (20 mM Tris, pH 8,0) bei 20 °C; Grün: i16EGFP (100 nM); Blau: SP16 (100 nM); Blau gestrichelt: SP16 (500 nM).

In den Adsorptionsmessungen mit dem Signalpeptid an Thylakoidmonoschichten auf einer Subphase mit geringer Ionenstärke zeigten sich geringere Wechselwirkungen als in den Experimenten mit salzhaltiger Subphase. Auch für das Signalpeptid wurde ein höherer maximaler Einbaudruck ($\sim 34 \text{ mN m}^{-1}$) ermittelt, welcher aufgrund der hohen Fehlerquote ebenfalls wenig repräsentativ ist. Wie gezeigt wurde (Kap. 3.3.1.1 und Abb. 3.17), hat die Zugabe des Signalpeptides in einer höheren Konzentration von 500 nM keine Auswirkungen auf die Interaktion mit Lipiden. Bei einer Puffersubphase mit geringerer Ionenstärke bestätigte sich diese Beobachtung nicht. Bei der Messung mit einem lateralen Oberflächendruck von $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ wurde eine fast doppelt so hohe Druckänderung durch die Zugabe des Peptides beobachtet. Der Adsorptionsprozess war hier zweistufig. Ein solches Verhalten wurde auch für die Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche beobachtet (Kap. 3.2.1.2). Der geringe Oberflächendruck erlaubt eine Umorientierung des adsorbierenden Peptides und damit die Anlagerung zusätzlicher Moleküle. Die Druckänderungen, die bei höheren Filmdrücken (20 bzw. 30 mN m^{-1}) gemessen wurden, unterscheiden sich nach der Zugabe der unterschiedlichen Mengen des Signalpeptides kaum.

IRRA-Spektroskopie

Mittels IRRA-Spektroskopie sollte festgestellt werden, ob neben der Adsorptionsstärke auch die Orientierung oder Konformation des mit den Lipiden interagierenden Proteins/Peptides beeinflusst wird. Da der Einfluss der Ionenstärke auf die Stärke der Adsorption von i16/EGFP an Lipidmonoschichten besonders deutlich war, wurde für die IRRA-spektroskopische Untersuchung dieses Protein verwendet.

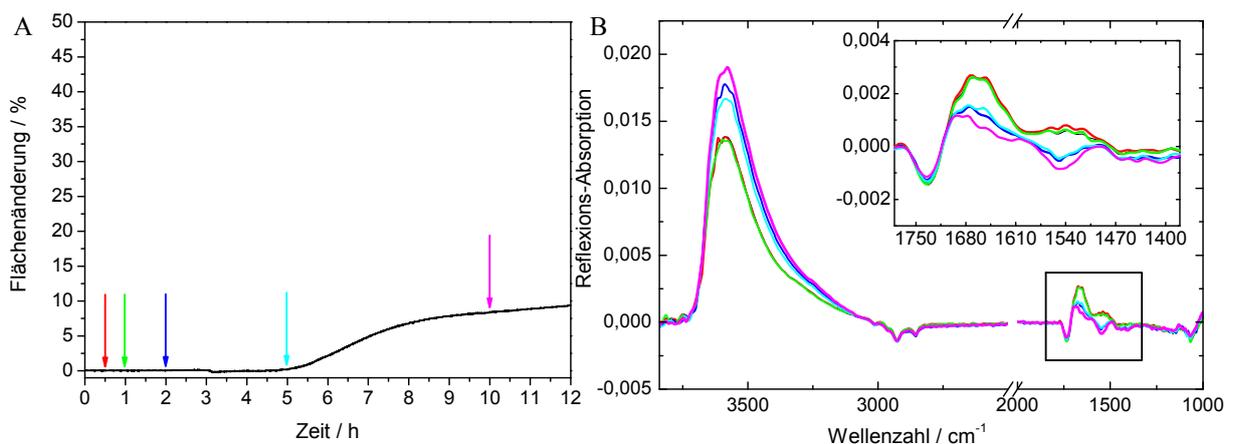


Abb. 3.23: Adsorption von i16/EGFP (100 nM) an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer II (20 mM Tris, pH 8,0) bei 20°C . A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Es zeigte sich, dass der Adsorptionsprozess langsamer erfolgt verglichen mit der Messung auf salzhaltigem Puffer (vgl. Abb. 3.19 und Abb. 3.23). Die Fläche pro Lipidmolekül vergrößerte sich erst nach langer Inkubationszeit (~5 h) und war im Vergleich zu Abb. 3.19 nicht so stark. Die Signalintensitäten der Amidbanden in den Spektren waren ebenfalls geringer. Dennoch ließ sich eine hauptsächlich aus β -Faltblättern aufgebaute Sekundärstruktur erkennen, die von α -helikalen Elementen begleitet wird.

Die Ergebnisse der Adsorptionsmessungen an Lipidmonoschichten unter Verwendung einer Subphase mit geringer Ionenstärke zeigen, dass die Adsorption von EGFP an Lipidmonoschichten dadurch nicht beeinflusst wurde. Durch Untersuchungen mit der Filmwaage wurde eine geringere Wechselwirkung mit den Lipiden für i16/EGFP beobachtet. IRRA-spektroskopische Messungen zeigten, dass die Ionenstärke zwar einen Einfluss auf die Adsorptionsgeschwindigkeit hat, wahrscheinlich aber nicht auf die Sekundärstruktur des Proteins. Bei geringen Peptidkonzentrationen wurde für SP16 eine geringere Adsorption an Lipide festgestellt als in den Messungen mit hoher Ionenstärke beobachtet wurde. Bei höherer Peptidkonzentration wurde allerdings eine stärkere Wechselwirkung mit Lipidmonoschichten mit einem geringen Oberflächendruck von 10 mN m^{-1} gemessen. In den Messungen mit einem lateralen Druck von 20 bzw. 30 mN m^{-1} wurde kein Unterschied in der Stärke der Adsorption zwischen den beiden eingesetzten Peptidkonzentrationen festgestellt. Da auch für die Messungen, in denen Puffer mit hoher Ionenstärke verwendet wurde, kaum Unterschiede in der Adsorptionsstärke bei Verwendung unterschiedlicher Peptidkonzentrationen beobachtet wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Adsorptionsmessung auf Puffer mit geringer Ionenstärke und einem geringen lateralen Oberflächendruck des Lipidfilms artifiziell und damit nicht repräsentativ ist.

3.3.2 *Adsorption der Proteine und des Peptides an PG/SQDG- und an MGDG-Monoschichten*

Adsorptionsexperimente an das aus negativ geladenen Lipidkomponenten zusammengesetzte Gemisch (anionisches Lipidgemisch: PG und SQDG 61:39 mol-%) und an die Hauptkomponente der Thylakoidmembran MGDG wurden angefertigt um zu untersuchen, ob und welche der Komponenten der thylakoidalen Lipide für die Wechselwirkung besonders wichtig sind.

Nach der Zugabe des EGFP zu stärker negativ geladenen Monoschichten bzw. zu MGDG bei den unterschiedlichen Ausgangsdrücken von 10 , 20 und 30 mN m^{-1} , wurde in allen Fällen ein

sehr schwacher und langsamer Druckanstieg beobachtet. Es ist offensichtlich, dass EGFP auch in diese Monoschichten nicht inseriert (Abb. 3.24).

Das Signalpeptid tragende i16/EGFP zeigte eine deutliche Wechselwirkung mit den Lipidfilmen des anionischen Lipidgemisches und MGDG, besonders bei niedrigen Ausgangsdrücken. Bei einem Ausgangsdruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ bewirkte die Zugabe des Proteins jedoch nur einen sehr schwachen Druckanstieg. Die Ermittlung des maximalen Einbaudruckes in die negativ geladene Monoschicht ergab einen Wert von $\sim 31 \text{ mN m}^{-1}$ und liegt damit im gleichen Bereich wie für einen Einbau in die Monoschicht bestehend aus dem Thylakoidlipidgemisch. Für die Insertion des Proteins in den MGDG-Lipidfilm ist der maximale Einbaudruck mit $\sim 29 \text{ mN m}^{-1}$ geringer als für die Interaktionen mit den gemischten Lipidschichten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass elektrostatische Kräfte einen Einfluss auf die Interaktion des Proteins mit den Lipiden haben. Die Monoschicht bestehend aus MGDG ist ungeladen. Das Thylakoidlipidgemisch und das anionische Gemisch bilden Monoschichten mit negativer Ladung, wobei letztere stärker geladen ist. Da der maximale Einbaudruck für beide geladenen Monoschichten ähnlich ist, scheint eine stärkere negative Ladung der Lipidschicht die Akkumulation von i16/EGFP an den Grenzflächen nicht zu erhöhen.

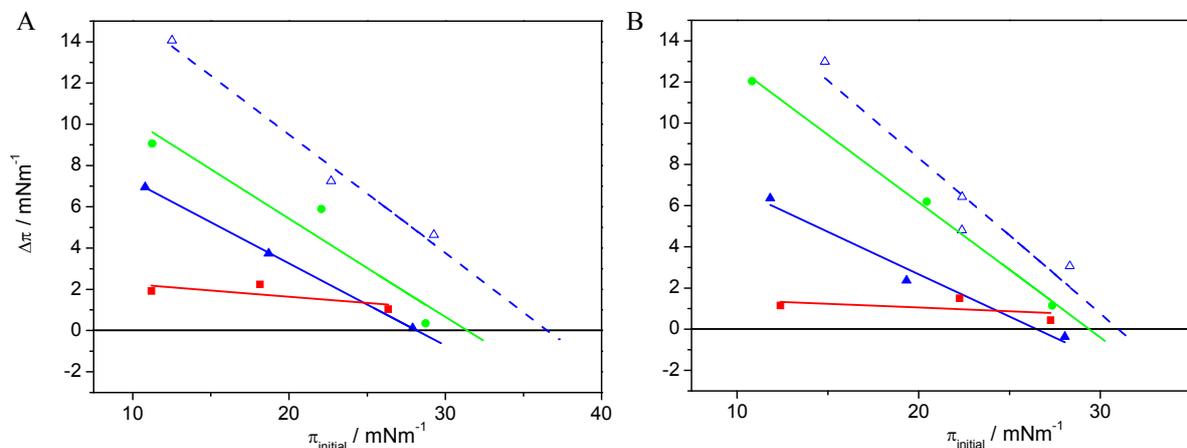


Abb. 3.24: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an Lipidmonoschichten durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion der Proteine bzw. des Peptides, auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C; Rot: EGFP (100 nM); Grün: i16EGFP (100 nM); Blau: SP16 (100 nM) Blau gestrichelt: SP16 (500 nM). A: Adsorption an das anionische Lipidgemisch (SQDG:PG 39: 61 mol-%); B: Adsorption an MGDG.

Mit dem in TFE gelösten Signalpeptid wurden Adsorptionsexperimente mit einer Peptidkonzentration von 100 nM und 500 nM an Monoschichten bestehend sowohl aus MGDG als auch aus dem anionischen Lipidgemisch vorgenommen. Die Messungen bei niedriger Peptidkonzentration zeigten an beiden Monoschichten gleiche Druckänderungen.

Bei einem Ausgangsdruck von 30 mN m^{-1} wurde keine Änderung des Druckes gemessen. Die maximalen Einbaudrucke lagen jeweils knapp unterhalb von 30 mN m^{-1} und sind damit gut vergleichbar mit π_{krit} in eine Monoschicht des Thylakoidlipidgemisches.

Die Adsorptionsmessungen mit einer Peptidkonzentration von 500 nM zeigten dagegen auch bei einem Ausgangsdruck von 30 mN m^{-1} eine deutliche Zunahme des Druckes. Die maximalen Einbaudrucke lagen über dem kritischen Wert von 30 mN m^{-1} . Für MGDG wurde ein maximaler Einbaudruck von $\sim 31 \text{ mN m}^{-1}$ gefunden, für das anionische Lipidgemisch sogar ein Wert von $\sim 36,5 \text{ mN m}^{-1}$. Dass eine verstärkte Wechselwirkung bei höherer Peptidkonzentration an das Thylakoidlipidgemisch nicht beobachtet werden konnte, liegt möglicherweise an der Lipidkomponente DGDG. Es hat eine große Kopfgruppe (Abb. 1.9) und könnte dadurch ein sterisches Hindernis für die adsorbierenden Peptidmoleküle darstellen.

Die beiden Proteine EGFP und i16/EGFP zeigten weder eine besondere Affinität zur Hauptkomponente (MGDG) der thylakoidalen Membran noch zu stärker negativ geladenen Monoschichten. Bei geringen Peptidkonzentrationen lässt sich ebenfalls keine Präferenz im Adsorptionsverhalten feststellen. Messungen mit höheren Peptidkonzentrationen zeigten allerdings eine verstärkte Interaktion mit negativ geladenen Monoschichten, was beweist, dass elektrostatische Wechselwirkungen zumindest teilweise an der Bindung mit Lipiden beteiligt sind.

3.3.3 Zeitabhängige Adsorption der Proteine und des Peptides an POPC

Die in Kap. 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Experimente wurden mit Lipidmonoschichten durchgeführt, die aus Lipiden bestanden, wie sie in Thylakoidmembranen vorkommen. Dabei zeigte sich, dass i16/EGFP sowohl an geladene als auch an ungeladene Monoschichten bindet. Daraus lässt sich schließen, dass hydrophobe Wechselwirkungen bei der Bindung eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden Messungen mit einem anderen, typisch zwitterionischen Phospholipid - POPC - durchgeführt, um zu testen, ob hydrophobe Wechselwirkungen bei der Bindung auftraten.

EGFP zeigte erwartungsgemäß keine Wechselwirkungen mit POPC-Monoschichten (Abb. 3.25 A, Rot).

Die Zugabe des chimären Proteins zu POPC-Monoschichten bewirkte, unabhängig vom lateralen Oberflächendruck des Lipidfilms, einen jeweils fast identischen Anstieg des Druckes (Abb. 3.25 A, Grün). Daraus resultierte für den maximalen Einbaudruck einen Wert über dem

kritischen Oberflächendruck von 30 mN m^{-1} , was bedeutet, dass i16/EGFP spontan in POPC-Membranen interkalieren können sollte (Abb. 3.25 C).

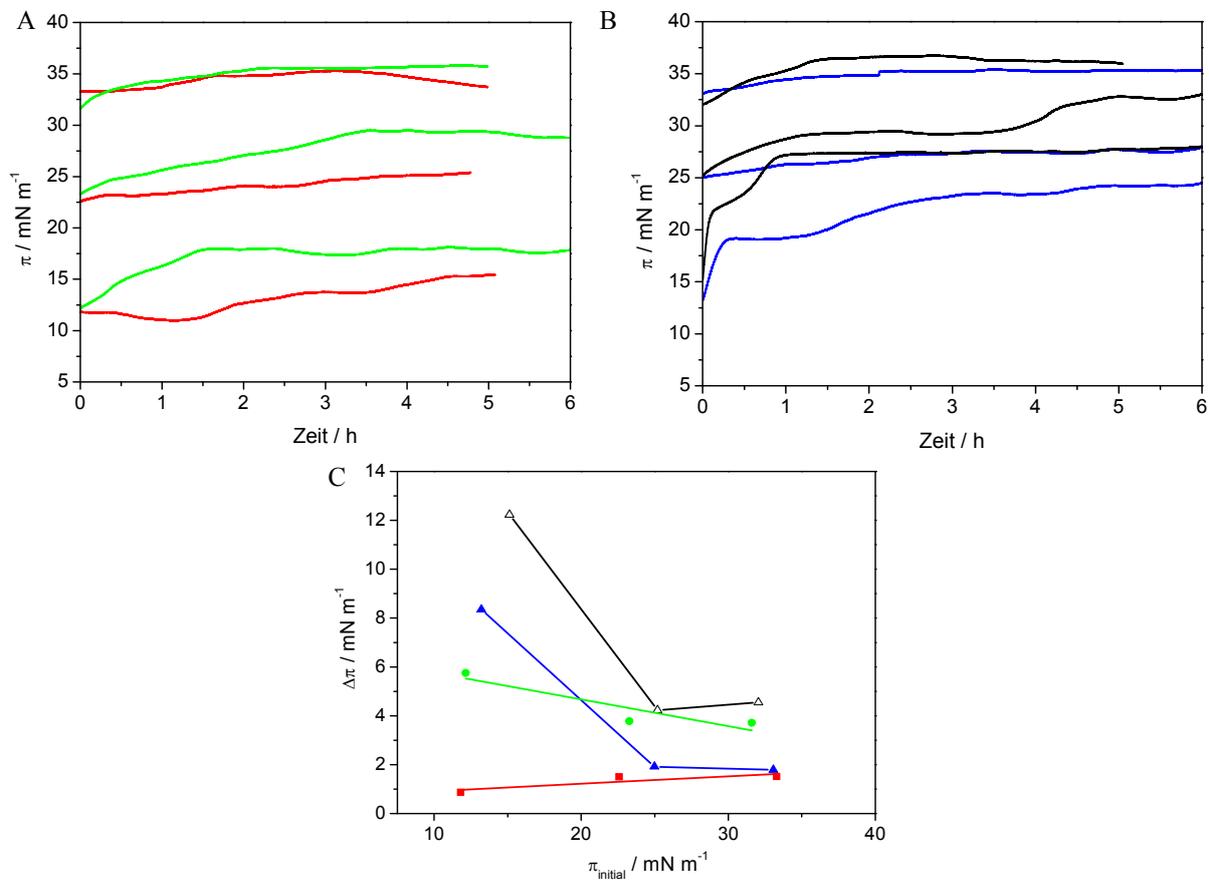


Abb. 3.25: Adsorptionsisothermen der Proteine bzw. des Peptides an POPC auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20°C . A: Rot: EGFP (100 nM); Grün: i16/EGFP (100 nM). B: Blau: SP16 (100 nM); Schwarz: SP16 (500 nM). C: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an POPC durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion der Proteine bzw. des Peptides.

Mit dem Signalpeptid wurden Adsorptionsmessungen an POPC-Monoschichten mit den unterschiedlichen Peptidkonzentrationen von 100 nM bzw. 500 nM vorgenommen.

Nach der Zugabe des Peptides in geringer Konzentration wurden schwache, fast gleiche Druckänderungen bei den höheren Initialdrücken von ~ 20 und $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ beobachtet. Bei einem geringeren Ausgangsdruck von $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ wurde eine deutlich stärkere, zweistufige Druckzunahme gemessen (Abb. 3.25 B, Blau). Die stufenweise Erhöhung des Oberflächendruckes nach der Injektion bei geringen Initialdrücken macht die Ermittlung des maximalen Einbaudruckes unmöglich. Die Datenpunkte können nicht durch die bisher verwendete lineare Regression ausgewertet werden (Abb. 3.25 C).

Wurde eine Peptidkonzentration von 500 nM zugegeben, wurden stärkere Druckänderungen beobachtet. Die Druckänderungen in den Messungen mit Initialdrücken von ~ 20 bzw. $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ unterschieden sich kaum. Es wurden mehrstufige Verläufe der Adsorption des

Peptides an Monoschichten mit Oberflächendrücken von 20 bzw. 10 mN m⁻¹ beobachtet (Abb. 3.25 B, Schwarz). Dieses Adsorptionsverhalten ist wahrscheinlich das Ergebnis von Umorientierungen der Peptide in der Monoschicht. Dieser Prozess scheint vom Initialdruck und von der Peptidkonzentration in der Subphase abhängig zu sein. Auch hier ist die Ermittlung des maximalen Einbaudruckes durch eine lineare Regression nicht möglich (Abb. 3.25 C).

Das reine EGFP wechselwirkt ebenso wenig mit der POPC-Monoschicht wie mit den Thylakoidlipiden. Allerdings zeigten die Messungen mit i16/EGFP und dem Signalpeptid, dass diese Substrate nicht nur mit den thylakoidspezifischen Lipiden interagieren. Das chimäre Protein interagiert allerdings weniger stark mit der POPC-Monoschicht als mit den Thylakoidlipiden bzw. deren Mischungen. Die Interaktionen des Signalpeptides zeigten bei niedrigen Oberflächendrücken der Lipidmonoschichten bzw. höheren Peptidkonzentrationen ein mehrstufiges Adsorptionsverhalten, was auf Umorientierungsprozesse der Peptidmoleküle in der Grenzschicht hindeutet. Ein solches Verhalten wurde auch für die Oberflächenaktivität des Peptides festgestellt. Bei Adsorptionen an die thylakoidspezifischen Lipide trat im betrachteten Messzeitraum keine Umorientierung der Peptide auf. Entweder erfolgt dieser Prozess in Wechselwirkung mit den thylakoidalen Lipiden bzw. Lipidgemischen schneller und konnte mit den eingesetzten Untersuchungsmethoden nicht aufgelöst werden oder der Prozess ist sehr viel langsamer und dauert länger als die Messungen verfolgt wurden.

3.4 Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von EGFP-Chimären mit komplexeren Peptidsequenzen

Neben der Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens des Tat-spezifischen Signalpeptides war auch die Untersuchung anderer Peptide mit Signalfunktion von Interesse.

Bevor Proteine über die thylakoidale Membran transportiert werden können, müssen sie zunächst die Chloroplastenmembran passieren. Auch für diese Translokation besitzt das Protein eine vermittelnde Peptidsequenz, welche nach dem Transport abgespalten wird. Auch Proteine, die nicht mittels des Tat-Transporters über die thylakoidale Membran transportiert werden sondern z.B. via Sec-Transporter, verfügen vor dem Transport über die Chloroplastenmembran über ein solches Transitpeptid.

Von Interesse war die Interaktion zwischen den Transitpeptid tragenden Proteinen und einer modellartigen Chloroplastenlipidschicht. Dafür wurden die Hauptbestandteile der Chloroplastenmembran MGDG, DGDG, SQDG, PG von Spinatpflanzen und PC aus Soja im Verhältnis 18:31:6:11:34 gemischt.

3.4.1 Adsorption von 16/EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten

In Abb. 3.26 ist die Sequenz von 16/EGFP gezeigt. Die am EGFP (Schwarz) aminoterminal gebundene Peptidsequenz unterteilt sich in die stromadirigierende (Rot) und die thylakoiddirigierende Domäne (Grün) mit dem „Twin arginin“ Motiv. Verknüpft sind das Peptid und das Protein durch eine kurze Linkerregion (Blau). Am carboxyterminalen Ende des EGFP befindet sich ein Hexa-Histidin-Tag (Braun).

```

MAQAMASMAGLRGASQAVLEGLSQISGSNRLSGPTTSRVAVPKMGLNIRAQQVSAEAETS
RRAMLGFVAAGLASGSFVKAVLAGIHRPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFS
VSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFSAM
PEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN
VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKD
PNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKHHHHHH

```

Abb. 3.26: Aminosäuresequenz des 16/EGFP. Rot: stromadirigierende Domäne; Grün: thylakoiddirigierende Domäne; Blau: Linkerregion zwischen Transitpeptid und EGFP (Schwarz); Braun: Histidin-Tag.

3.4.1.1 Adsorption und IRRA-spektroskopische Untersuchung von 16/EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Die Filmwaagemessungen zur Untersuchung der Oberflächenaktivität zeigten einen starken Druckanstieg ~ 30 min nach der Injektion der Proteinlösung in die Puffersubphase (Proteinkonzentration 100 nM). Erst nach 6 h stellte sich, nach einer Druckänderung von $\sim 19,5 \text{ mN m}^{-1}$, ein Gleichgewicht ein (nicht gezeigt).

In der IRRA-spektroskopischen Messung erfolgte der Druckanstieg sofort nach der Injektion (Abb. 3.27 A). Die maximale Druckänderung war etwas geringer als im Vorversuch und wurde erst nach langer Inkubationszeit erreicht ($\Delta\pi_{15\text{h}} = 15,6 \text{ mN m}^{-1}$). Die Unterschiede im Versuchsaufbau (wie in Kap. Beschrieben) waren die Ursache für diese Abweichungen zwischen der reinen Filmwaagemessung und der mit IRRA-Spektroskopie gekoppelten Messung.

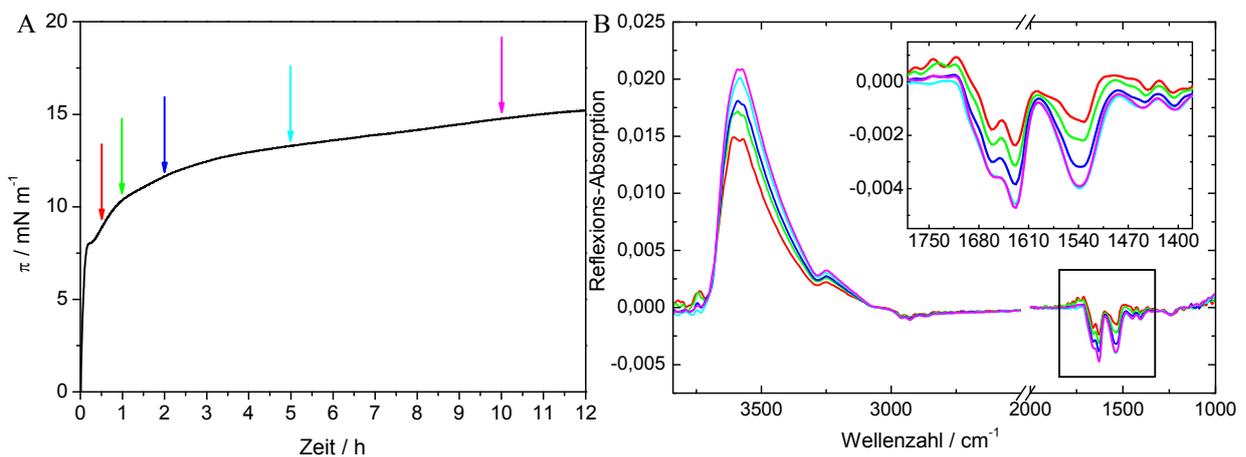


Abb. 3.27: Oberflächenaktivität von 16/EGFP (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die nach der Injektion aufgenommenen IRRA-Spektren zeigten, dass sich der Proteinfilm relativ schnell ausbildete. Die Amid I Bande zeigte sich zunächst als Doppelbande (mit Minima bei 1661 cm^{-1} und 1629 cm^{-1}), was auf α -helikale und β -Faltblattstrukturen hinweist, wobei letztere einen größeren Anteil im Protein haben. Im Laufe der Adsorption nahm der Anteil an β -Faltblättern noch zu, was durch die Verschiebung zu einer asymmetrischen Bande beobachtet wurde, in der nur noch eine Schulter den α -helikalen Anteil des Proteins repräsentierte. Es war eine Intensitätszunahme der verschiedenen Banden während des Adsorptionsvorganges bis ~ 10 h nach der Injektion des Proteins zu beobachten. Danach änderte sich das Spektrum nicht mehr, obwohl der Oberflächendruck immer noch leicht anstieg.

Am Ende der Adsorptionsmessung wurden Spektren in Abhängigkeit des IR-Einfallswinkels des Proteinfilmes aufgenommen. Der Vergleich von winkelabhängig gemessener Spektren und der entsprechenden Simulationen sollte vor allem Unterschieden bzw. Gemeinsamkeiten dieses Proteins zu dem Transportintermediat i16/EGFP aufzeigen.

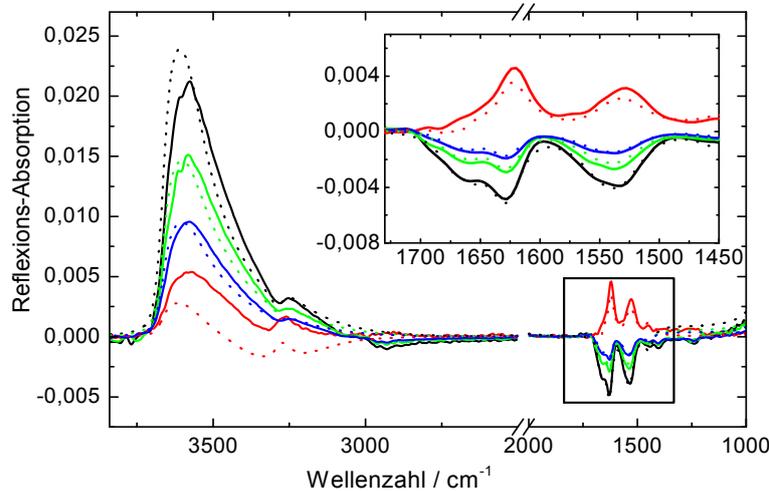


Abb. 3.28: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) Spektren des 16/EGFP Films an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Schwarz: p-pol, 40°; Rot: p-pol, 60°; Grün: s-pol 40°; Blau: s-pol 60°; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

In Abb. 3.28 sind einige der gemessenen Spektren mit den dazugehörigen Simulationen abgebildet. Es wurde ermittelt, dass das Verhältnis zwischen den Sekundärstrukturelementen beider Proteine ähnlich ist. Etwa 59 % entfallen hier auf β -Faltblätter und damit ~ 41 % auf α -Helices. Für i16/EGFP lag das Verhältnis bei 56:44. Der Neigungswinkel der β -Faltblätter wurde mit $\sim 36^\circ$ bestimmt und zeigt damit eine große Ähnlichkeit zu i16/EGFP ($\theta \sim 30^\circ$). Die Ermittlung der Schichtdicke von 2,35 nm durch die Simulation der OH-Streckschwingungsbande ergab einen ähnlichen Wert wie für i16/EGFP ($d = 2,25$ nm). Auch in diesem Fall lag kein geschlossener Proteinfilm an der Luft/Wasser-Grenzfläche vor.

3.4.1.2 Adsorption von 16/EGFP an Chloroplasten-Lipidmonoschichten

Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstanter Fläche

Adsorptionsexperimente von 16/EGFP an eine der Chloroplastenmembran nachempfundenen Monoschicht zeigten starke Druckanstiege bei allen vorgelegten Ausgangsdrücken von 10, 20 und 30 mN m^{-1} . Der Anstieg des Druckes erfolgte jeweils direkt nach der Injektion der Proteinlösung. Je geringer der Ausgangsdruck, desto stärker war die Druckänderung und desto später stellte sich ein Gleichgewicht ein (Abb. 3.29 A). Es ergab sich ein sehr hoher maximaler Einbaudruck im Bereich von >50 mN m^{-1} , was auf die Fähigkeit des Proteins einer spontanen Insertion in eine Chloroplastenmembran hinweist (Abb. 3.29 B).

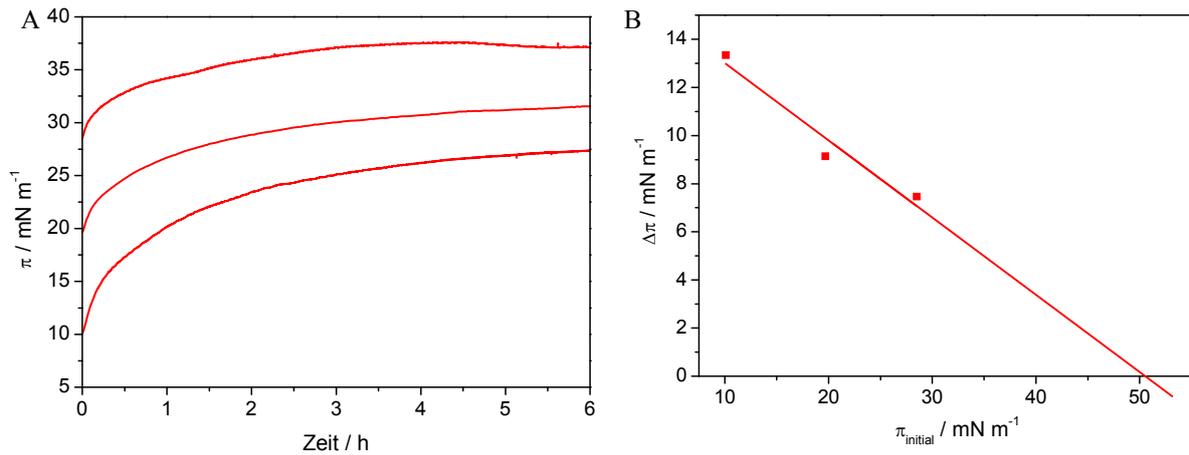


Abb. 3.29: A: Zeitabhängige Druckänderung nach der Injektion von 16/EGFP (100 nM) an das Chloroplasten-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG/PC 18: 31: 6: 11: 34 mol-%) bei unterschiedlichen Ausgangsdrücken auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. B: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion des 16/EGFP an das Chloroplasten-Lipidgemisch.

Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

IRRA-spektroskopische Untersuchungen wurden bei einem konstanten Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} vorgenommen. Nach der Injektion der Proteinlösung durch die Monoschicht in die Subphase kam es zu einer sofortigen, sprunghaften Flächenzunahme um etwa 17 %. Im weiteren Verlauf wurde die Flächenzunahme langsamer, stieg aber auf über 40 % (Abb. 3.30 A). Auch nach sechzehnständiger Inkubation stellte sich kein Gleichgewicht ein.

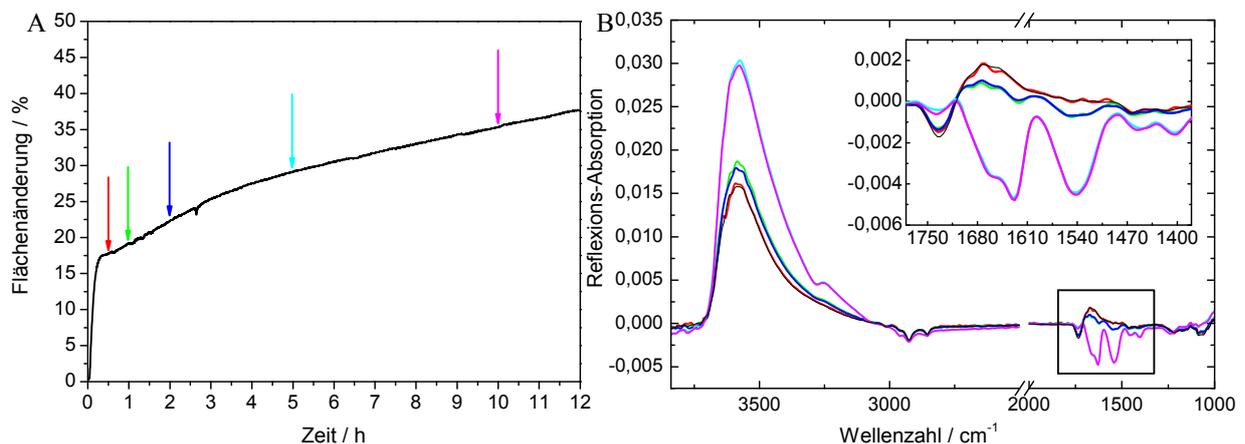


Abb. 3.30: Adsorption von 16/EGFP (100 nM) an das Chloroplasten-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG/PC 18: 31: 6: 11: 34 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

In den simultan aufgenommenen Spektren war $\sim 1 \text{ h}$ nach der Injektion eine Intensitätszunahme der OH-Streckschwingungsbande bei 3585 cm^{-1} zu beobachten, was für

eine Zunahme der Schichtdicke durch die An- bzw. Einlagerung des Proteins spricht (Abb. 3.30 B). Im weiteren Adsorptionsverlauf kam es zu einer weiteren drastischen Intensitätszunahme der $\nu(\text{OH})$ Bande und auch proteinspezifische Banden wurden beobachtet. Obwohl die Fläche noch zunahm, kam es nach einer Inkubationszeit von ~ 5 h zu keinen Änderungen im Spektrum mehr. Die Amid I Bande stellte sich als asymmetrische Bande (mit einem Minimum bei 1630 cm^{-1}) mit einer Schulter bei 1660 cm^{-1} dar. Mit fast gleicher Intensität erschien die symmetrische Amid II Bande bei 1542 cm^{-1} . Sehr ähnliche Bandenformen wurden auch bei den adsorbierten Proteinmolekülen an der Luft/Wasser-Grenzfläche beobachtet. Das bedeutet, dass die Interaktion der Proteinmoleküle mit den Lipiden deren Sekundärstruktur an der Grenzfläche nicht beeinflussen.

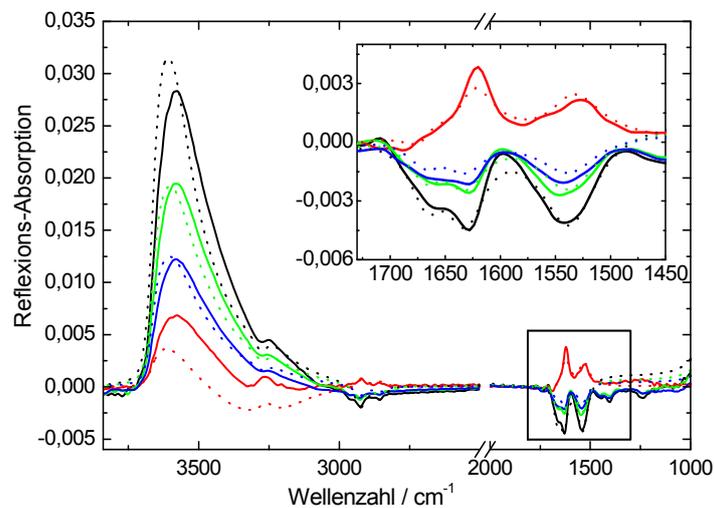


Abb. 3.31: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) Spektren des adsorbierten 16/EGFP an der Chloroplasten-Lipidmonoschicht. Schwarz: p-pol, 40° ; Rot: p-pol, 60° ; Grün: s-pol 40° ; Blau: s-pol 60° ; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Um die Änderungen der Orientierung des mit Lipiden interagierenden Proteins zu dokumentieren, wurden die winkelabhängig gemessenen Spektren des Lipid/Proteinfilms mit simulierten Spektren verglichen (Abb. 3.31). Für die β -Faltblätter wurde ein größerer Neigungswinkel ermittelt ($\sim 50^\circ$) als für die Proteine an der reinen Luft/Wasser-Grenzfläche. Die Interaktion mit den Lipiden der Monoschicht hat also hauptsächlich Einfluss auf die Anordnung des β -Barrels an der Grenzfläche. Für die Schichtdicke des Protein/Lipidfilms wurde ein Wert von $d = 3,1\text{ nm}$ ermittelt. Unter der Annahme, dass ein reiner Chloroplastenlipidfilm bei 20 mN m^{-1} eine ähnliche Schichtdicke aufweist wie ein Thylakoidlipidfilm unter den gleichen Bedingungen ($d = 1,44\text{ nm}$), ist die Zunahme der Schichtdicke deutlich stärker als bei der Adsorption von i16/EGFP an die Thylakoidmonoschicht. Ein möglicher Grund ist die stärkere Adsorption der 16/EGFP-

Moleküle. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich ein Teil der Proteine nicht in die Monoschicht ein- sondern nur anlagert und damit die Schichtdicke erhöht.

3.4.1.3 Adsorption von 16/EGFP an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstanter Fläche

Um zu überprüfen, ob die Wechselwirkung von 16/EGFP mit einer Lipidmonoschicht der Zusammensetzung der Chloroplastenmembran besonders stark ist, wurden die Adsorptionsmessungen an eine Monoschicht des Thylakoidlipidgemisches bei konstant gehaltener Fläche wiederholt.

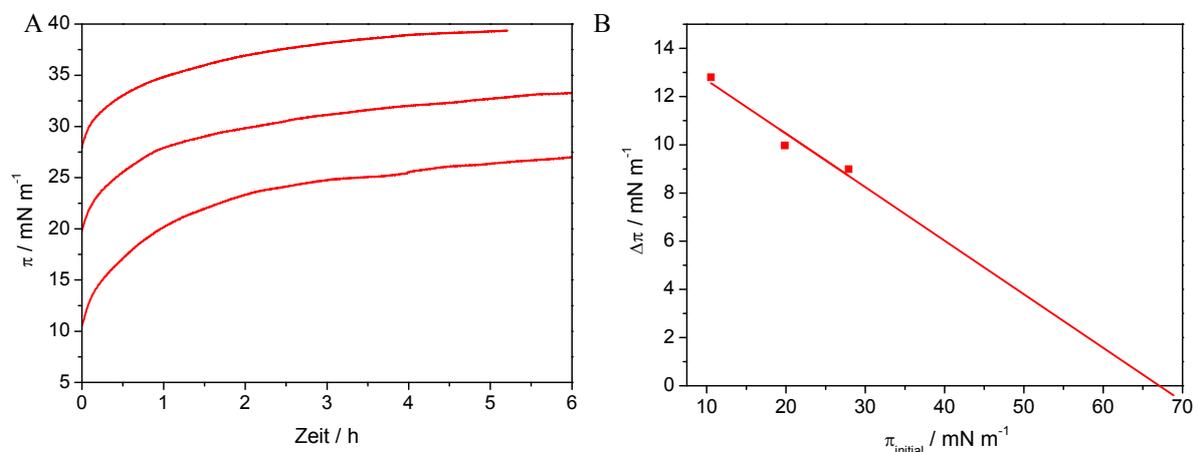


Abb. 3.32: A: Zeitabhängige Druckänderung nach der Injektion von 16/EGFP (100 nM) an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) bei unterschiedlichen Ausgangsdrücken auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. B: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an das Thylakoid-Lipidgemisch durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion des 16/EGFP.

Es zeigte sich dabei, dass sich das Protein in eine solche Monoschicht ähnlich gut, bei einem hohen Ausgangsdruck von 30 mN m^{-1} sogar stärker einbaut (Abb. 3.32 A). Ein ungewöhnlich hoher maximaler Einbaudruck von $\sim 67 \text{ mN m}^{-1}$ wurde ermittelt (Abb. 3.32 B).

Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

In der mit IRRA-Spektroskopie gekoppelten Messung kam es durch die Injektion der Proteinlösung zu einer starken, sprunghaften Flächenzunahme um $\sim 23 \%$. Danach nahm die Fläche weiter langsam und kontinuierlich zu (Abb. 3.33 A). In einem Messzeitraum von 20 h wurde kein Gleichgewicht erreicht.

In der ersten Stunde der Adsorption änderten sich die IRRA-Spektren stark (Abb. 3.33 B). Die Spektren ähnelten denen, die zuvor mit der Monoschicht der Chloroplastenlipide aufgenommen wurden (vgl. Abb. 3.30 B und Abb. 3.33 B). Lediglich die Bandenintensitäten waren etwas geringer.

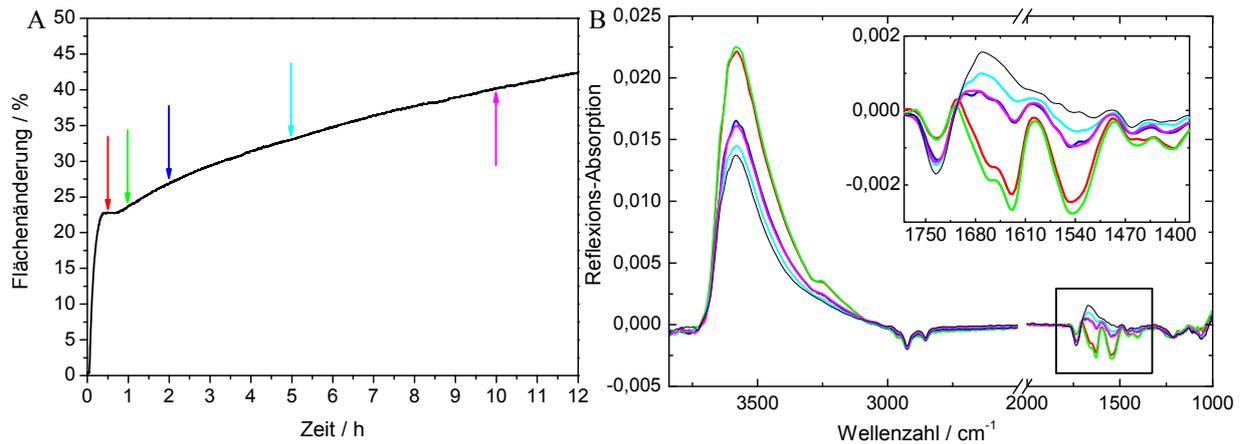


Abb. 3.33: Adsorption von 16/EGFP (100 nM) an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Im weiteren Adsorptionsprozess nahmen die proteinspezifischen Banden an Intensität ab, obwohl es weiterhin zu einer Zunahme der Fläche pro Lipidmolekül kam. Die Amid A Bande verschwand. Im Amid I Bereich blieb eine symmetrische Bande bei 1625 cm^{-1} zurück, was auf aggregierte β -Faltblätter schließen lässt. Die Schichtdicke ging ebenfalls zurück. Die Intensitäten der lipidspezifischen Banden nahmen dagegen zu. In Anbetracht der immer noch andauernden Flächenzunahme ist nicht anzunehmen, dass das Protein wieder desorbiert. Wahrscheinlich adsorbierten die Proteinmoleküle lokal, insertierten in die Monoschicht und es bildeten sich proteinreiche und proteinarme Regionen im Film. Da es sich um ein fluides System handelt und der Fokus starr auf einen Punkt gerichtet ist, gelangen im zeitlichen Verlauf der Messung verschiedene Bereiche des Films in den IR-Strahlengang und verursachen so die Fluktuation der Banden über den betrachteten Zeitraum.

Die zusätzliche Peptidsequenz im 16/EGFP im Vergleich zum i16/EGFP hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche bzw. an Lipidmonoschichten. In den Oberflächenaktivitätsmessungen zeigte sich eine deutlich schnellere Adsorption. Insgesamt war aber der maximal erreichte Oberflächendruck etwas geringer. In den IRRA-Spektren waren die Intensitäten der proteinspezifischen Banden ebenfalls weniger intensiv. Auch die Entwicklung der Banden dauerte länger. Die ermittelten Schichtdicken der Proteinfilm unterscheiden sich kaum (i16/EGFP $d = 2,25 \text{ nm}$ bzw. 16/EGFP $d = 2,35 \text{ nm}$), zeigten aber in beiden Fällen einen nicht geschlossenen Film an. Die Orientierungen der β -Faltblätter der Fasstruktur des EGFP waren ähnlich (i16/EGFP $\approx 30^\circ$

bzw. 16/EGFP è ~36 °), was aber nicht bedeutet, dass auch das Gesamtmolekül in gleicher Weise an der Luft/Wasser-Grenzfläche vorliegt. Die Sekundärstrukturanteile schienen ebenfalls ähnlich verteilt zu sein. 16/EGFP wies einen etwas geringeren α -helikalen Anteil auf. In Interaktion mit Lipidmonoschichten war vor allem auffällig, dass für 16/EGFP ein sehr viel höherer maximaler Einbaudruck ermittelt wurde als für i16/EGFP. Ein weiterer deutlicher Unterschied betrifft die Sekundärstruktur. In 16/EGFP war der β -Faltblattanteil stärker ausgeprägt. Er unterschied sich kaum von dem in 16/EGFP-Molekülen an der Luft/Wasser-Grenzfläche, wohingegen bei der Adsorption des i16/EGFP eine deutliche Zunahme des α -helikalen Anteil durch die Interaktion mit Lipiden beobachtet wurde. Das Transitpeptid organisiert sich offensichtlich nicht als α -Helix in der Lipidmonoschicht.

3.4.2 Adsorption von PC/EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten

Ein weiteres mit einem Transitpeptid ausgestattetes Modellprotein ist PC/EGFP. Es wird nicht, wie die bisher untersuchten Proteine, mittels des Tat-Weges über die thylakoidale Membran transportiert, sondern weist in seiner thylakoiddirigierenden Domäne (Grün) ein Signal für den Sec-Transporter auf. Auch dieses Transitpeptid verfügt über einen chloroplastendirektierenden Bereich (Rot). Das Protein ist durch eine Linkerregion (Blau) an das Peptid gekoppelt und mit einem carboxyterminalen Hexa-Histidin Tag (Braun) versehen (Abb. 3.34).

```

MATVASSAAVAVPSFTGLKASGSIKPTTAKIIPTTAVPRLSVKASLKNVGAADVATAAAG
LLAGNAMAGIHRPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKL
TLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKD
DGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIK
VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLE
FVTAAGITLGMDELYKHHHHHH

```

Abb. 3.34: Aminosäuresequenz des PC/EGFP. Rot: stromadirigierende Domäne; Grün: thylakoiddirigierende Domäne; Blau: Linkerregion zwischen Transitpeptid und EGFP (Schwarz); Braun: Histidin-Tag.

3.4.2.1 Adsorption und IRRA-spektroskopische Untersuchung von PC/EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Zunächst wurde die Oberflächenaktivität von PC/EGFP bestimmt. Etwa 10 min nach der Injektion kam es zu einem schnellen, starken Druckanstieg. Es lag ein Proteinfilm mit einem lateralen Druck von $21,5 \text{ mN m}^{-1}$ vor, nachdem sich ein Gleichgewicht nach ~4,5 h eingestellt hatte (nicht gezeigt).

In der IRRA-spektroskopischen Messung begann der Druckanstieg sofort mit der Injektion des Proteins (Abb. 3.35 A). Das Gleichgewicht stellte sich später ein und der laterale Filmdruck war etwas niedriger ($\Delta\pi_{12h} = 19,5 \text{ mN m}^{-1}$) als im Vorversuch.

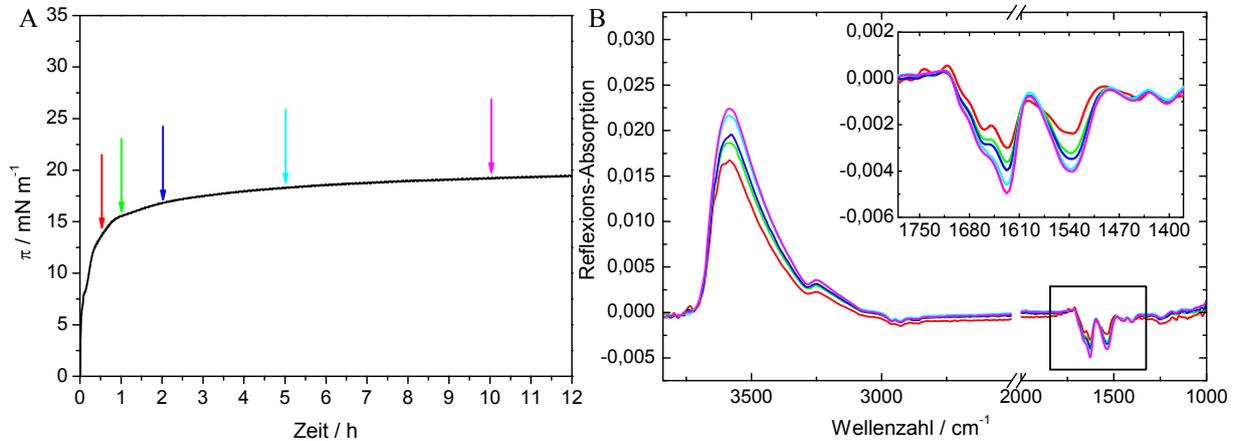


Abb. 3.35: Oberflächenaktivität von PC/EGFP (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die IRRA-Spektren zeigten die Ausbildung eines Proteinfilmes durch die Entwicklungen der OH-Streckschwingungsbande ($\nu(\text{OH})$ bei 3584 cm^{-1}) sowie der Amid I und II Banden (Abb. 3.35 B). Die Amid I Bande besaß zunächst zwei Minima (1659 cm^{-1} und 1628 cm^{-1}), die im weiteren Adsorptionsverlauf zu einer asymmetrischen Bande verschmolzen. Der Hauptanteil der Sekundärstruktur entfällt auf β -Faltblätter (Minimum der Amid I Bande bei 1628 cm^{-1}). Dennoch sind auch α -helikale Anteile vorhanden, was die Schulter bei 1659 cm^{-1} deutlich zeigte.

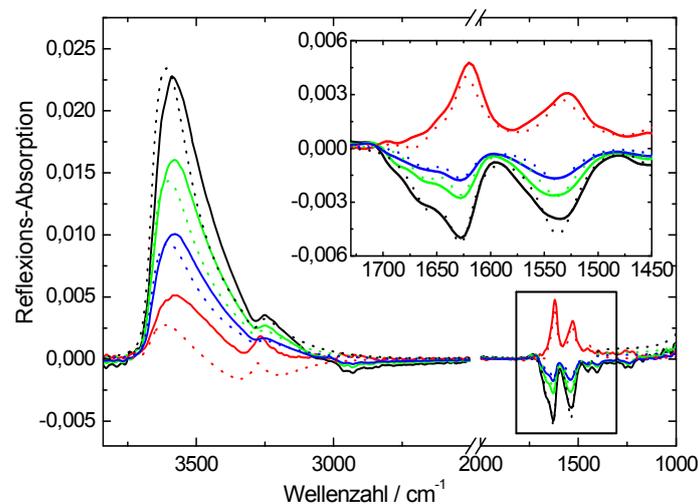


Abb. 3.36: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) Spektren des PC/EGFP Films an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Schwarz: p-pol, 40°; Rot: p-pol, 60°; Grün: s-pol 40°; Blau: s-pol 60°; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

In der Gleichgewichtsphase wurden Spektren in Abhängigkeit des Einfallswinkels des IR-Strahls gemessen. Einige dieser Spektren wurden mit simulierten Spektren verglichen (Abb. 3.36). Es zeigte sich, dass die β -Faltblätter des PC/EGFP Moleküls im Mittel einen Neigungswinkel von $\sim 24^\circ$ aufweisen. Das Verhältnis der Strukturanteile wurde als fast ausgeglichen ermittelt (β -Faltblatt 53 %, α -Helix 47 %) und weist damit den größten Anteil an α -Helices aller untersuchten Varianten des EGFP auf. Die ermittelte Schichtdicke von $d = 2,3$ nm ähnelte dagegen den schon beschriebenen peptidtragenden Proteinen (i16/EGFP und 16/EGFP) und weist damit ebenfalls auf einen nicht geschlossenen Proteinfilm hin.

3.4.2.2 Adsorption von PC/EGFP an Chloroplasten-Lipidmonoschichten

Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstanter Fläche

Die Ergebnisse der Adsorptionsmessung an Chloroplastenmonoschichten zeigten eine starke Affinität von PC/EGFP zu den Lipiden (Abb. 3.37 A). Bei allen drei Ausgangsdrücken (10, 20 bzw. 30 mN m^{-1}) kam es nach der Injektion der Proteinlösung zu deutlichen Druckanstiegen. Für den maximalen Einbaudruck ergab sich ein Wert von ~ 47 mN m^{-1} (Abb. 3.37 B). Das Protein sollte demnach in der Lage sein spontan in Chloroplastenmembranen zu inserieren.

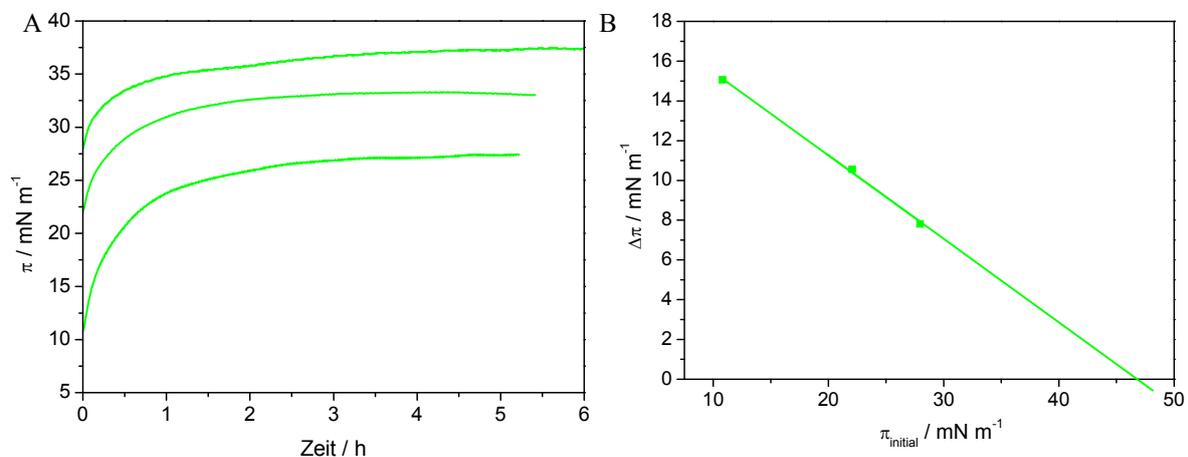


Abb. 3.37: A: Zeitabhängige Druckänderung nach der Injektion von PC/EGFP (100 nM) an das Chloroplasten-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG/PC 18: 31: 6: 11: 34 mol-%) bei unterschiedlichen Ausgangsdrücken auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. B: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an das Chloroplasten-Lipidgemisch durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion des PC/EGFP.

Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

In der IRRA-spektroskopischen Messung bei einem konstanten Oberflächendruck des Lipidfilms von 20 mN m^{-1} wurde eine Flächenvergrößerung von >50 % nach der Injektion der Proteinlösung beobachtet. Im betrachteten Zeitraum von 12 h stellte sich kein Gleichgewicht ein (Abb. 3.38 A).

Die gleichzeitig aufgenommenen IRRA-Spektren zeigten kontinuierliche Änderungen während der Adsorption. Nach kurzer Inkubationszeit wurden proteinspezifische Banden beobachtet. Bandenlage und -form der Amid I und II Banden ähnelten stark denen des an der Luft/Wasser-Grenzfläche adsorbierten Proteins (vgl. Abb. 3.35 B und Abb. 3.38 B). Die Sekundärstruktur der PC/EGFP-Moleküle wird durch die Interaktion mit Lipiden offensichtlich nicht beeinflusst.

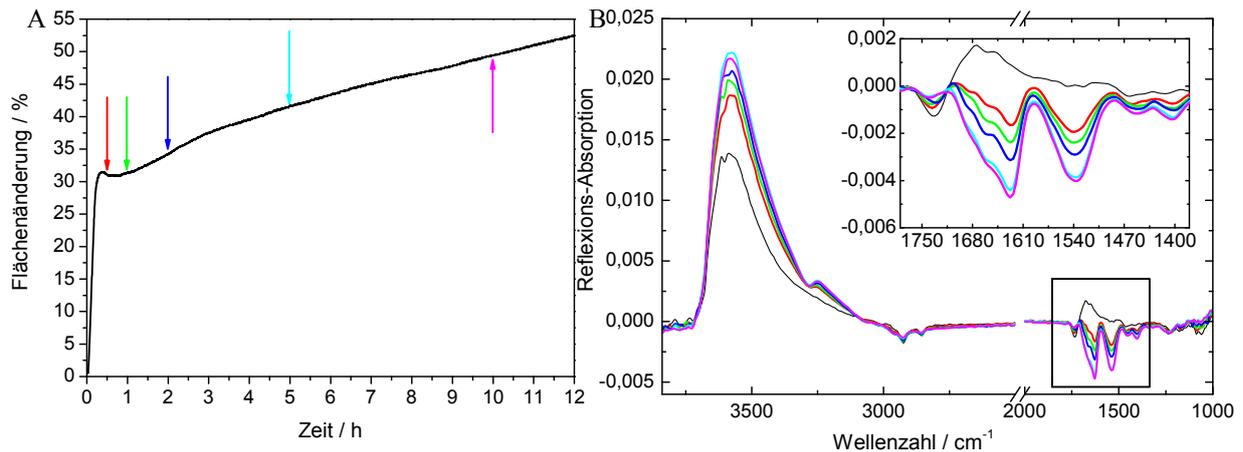


Abb. 3.38: Adsorption von PC/EGFP (100 nM) an das Chloroplasten-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG/PC 18: 31: 6: 11: 34 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Als Abschluss dieser Adsorptionsmessung wurden winkelabhängig gemessenen Spektren des Protein/Lipidfilms aufgenommen um sie, zur Ermittlung der Proteinorientierung, mit simulierten Spektren zu vergleichen (Abb. 3.39).

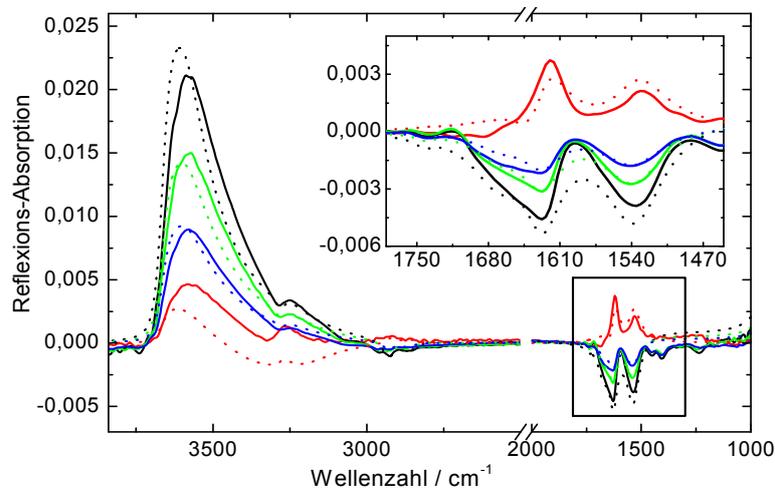


Abb. 3.39: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) Spektren des adsorbierten PC/EGFP an der Chloroplasten-Lipidmonoschicht. Schwarz: p-pol, 40°; Rot: p-pol, 60°; Grün: s-pol 40°; Blau: s-pol 60°; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Der Neigungswinkel der β -Faltblätter ergab sich zu $\sim 50^\circ$, was beweist, dass die Interaktion mit Lipiden einen Einfluss auf die Orientierung des Moleküls hat. Aufgrund einer sehr starken Flächenzunahme kann vermutet werden, dass eine starke Adsorption von PC/EGFP-Molekülen an die Lipidschicht erfolgt. Die ermittelte Schichtdicke des Protein/Lipidfilms betrug $d = 2,3$ nm und wies damit den gleichen Wert auf, wie er für den reinen Proteinfilm ermittelt wurde (Kap. 3.4.2.1).

3.4.2.3 Adsorption von PC/EGFP an Thylakoid-Lipidmonoschichten

Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstanter Fläche

Die Absorptionsmessungen von PC/EGFP an das Thylakoidlipidgemisch zeigten sehr ähnliche Ergebnisse wie an das Chloroplastenlipidgemisch. Die Druckerhöhung nach der Injektion bei den unterschiedlichen Ausgangsdrücken waren etwa gleich stark. Es wurde auch ein ähnlicher maximaler Einbaudruck von ~ 46 mN m⁻¹ ermittelt (Abb. 3.40, Grün).

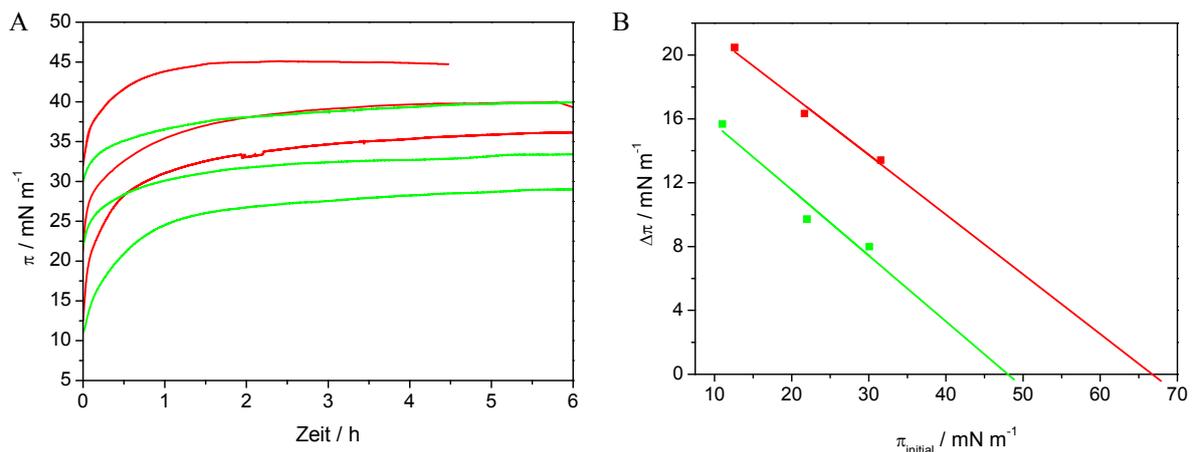


Abb. 3.40: A: Zeitabhängige Druckänderung nach der Injektion von PC/EGFP (100 nM) an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) bei unterschiedlichen Ausgangsdrücken auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. Grün: Charge I; Rot: Charge II. B: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an das Thylakoid-Lipidgemisch durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion des PC/EGFP.

An dieser Stelle muss ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass bei den Studien mit unterschiedlichen Proteinchargen erhebliche Unterschiede in den Messergebnissen auftraten. In Abb. 3.40 sind Daten von Adsorptionsmessungen einer zweiten Proteincharge an Monoschichten des Thylakoidlipidlipidgemisches dargestellt (Rot). Es ist deutlich zu sehen, dass die Wechselwirkung der Probe aus dieser ersten Präparation deutlich höher war. Da alle anderen Bedingungen und Komponenten für die Messungen gleich waren, können die Unterschiede nur durch die Proteinlösung hervorgerufen worden sein. Eine Erklärung wäre eine Verunreinigung durch Octylglycosid, was dem Extraktionspuffer zugesetzt war und durch unzureichende Dialyse nicht vollständig entfernt wurde.

Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

Weiterführende Messungen wurden mit der zuerst beschriebenen Proteinlösung durchgeführt. In der IRRA-spektroskopischen Messung wurde ein ähnlicher Adsorptionsverlauf und auch eine ähnliche Wechselwirkungsstärke wie im Versuch mit dem Chloroplastenlipidgemisch beobachtet (vgl. Abb. 3.38 A und Abb. 3.41 A).

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Adsorption von PC/EGFP an eine Monoschicht des Chloroplastengemisches nahm die Schichtdicke durch die Zugabe des Proteins nicht so stark zu. Die Intensitäten der proteinspezifischen Banden waren ebenfalls geringer, wobei Bandenlage und -form denen der Messung mit der Chloroplastenmonoschicht ähnlich waren (vgl. Abb. 3.38 B und Abb. 3.41 B). Es wurden Fluktuationen der Amid I und II Bandenintensität im Verlauf der Messung beobachtet, obwohl die Fläche pro Lipidmolekül kontinuierlich zunahm. Das deutet darauf hin, dass das Protein bei dem Einbau in die Monoschicht nicht homogen an der Oberfläche verteilt ist. Da der Film mobil auf der Subphase ist, wird nicht fortwährend die gleiche Stelle der Monoschicht betrachtet, sodass, bei ungleichmäßiger Verteilung der einzelnen Komponenten, mit der Zeit proteinärmere und proteinreichere Bereiche abwechselnd in den Fokus gelangen.

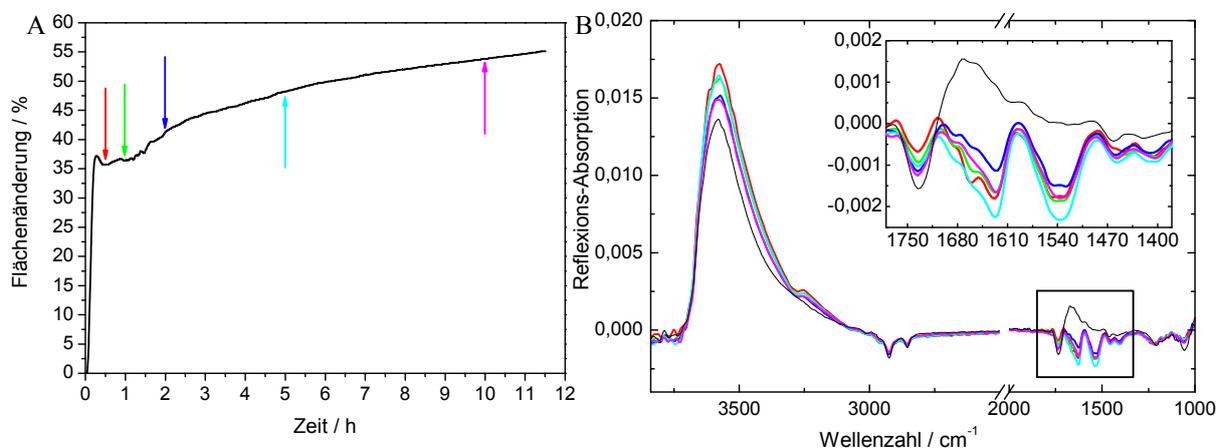


Abb. 3.41: Adsorption von PC/EGFP (100 nM) an das Thylakoid-Lipidgemisch (MGDG/DGDG/SQDG/PG 55: 27: 7: 11 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer I (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Um die Lage des Proteins in der Monoschicht zu bestimmen, wurden Messungen in Abhängigkeit des IR-Einfallswinkels durchgeführt und mit simulierten Spektren verglichen. In Abb. 3.42 ist eine Gegenüberstellung einiger dieser Spektren gezeigt. Die Auswertung ergab, dass die β -Faltblätter des PC/EGFP $\sim 40^\circ$ geneigt vorliegen. Es wurde eine sehr geringe Schichtdicke des Protein/Lipidfilms ermittelt ($d = 1,5 \text{ nm}$). Hier muss allerdings unbedingt berücksichtigt werden, dass auch während der winkelabhängigen Messung ein

heterogener Film vorlag. Da die ermittelte Schichtdicke der des reinen Thylakoidlipidfilms ($d = 1,44 \text{ nm}$) ähnlich ist, kann angenommen werden, dass die in Winkelabhängigkeit gemessenen Spektren in einem proteinarmen Bereich des Films aufgenommen wurden. Die ermittelten Daten zur Orientierung der Sekundärstrukturen im Protein sind dadurch wahrscheinlich mit einem großen Fehler behaftet.

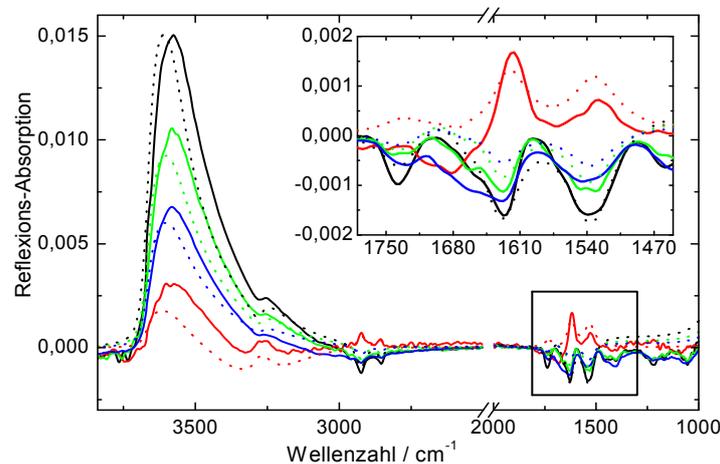


Abb. 3.42: Gemessene (durchgezogen) und simulierte (gepunktet) Spektren des adsorbierten PC/EGFP an der Thylakoid-Lipidmonoschicht. Schwarz: p-pol, 40°; Rot: p-pol, 60°; Grün: s-pol 40°; Blau: s-pol 60°; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

In den Adsorptionsmessungen an die Luft/Wasser-Grenzfläche wurden kaum Unterschiede zwischen dem 16/EGFP (inkl. der Tat-spezifischen, thylakoiddirigierenden Domäne) und dem PC/EGFP (inkl. der Sec-spezifischen thylakoiddirigierenden Domäne) festgestellt. Adsorptionsverlauf und auch der maximal erreichte Oberflächendruck der Proteinfilme waren ähnlich. Allerdings wies PC/EGFP einen höheren α -helikalen Anteil der Sekundärstruktur auf. Auch der Neigungswinkel der β -Faltblätter von $\sim 24^\circ$ war eher dem des EGFP ($\theta \sim 20^\circ$) ähnlich als dem des 16/EGFP ($\theta \sim 36^\circ$). Die Interaktion des PC/EGFP an das Chloroplastenlipidgemisch zeigte eine stärker Flächenzunahme und damit einen stärkeren Einbau des Proteins als es mit 16/EGFP beobachtet wurde. Allerdings wurde eine geringere Schichtdicke ermittelt (PC/EGFP $d = 2,3 \text{ nm}$, 16/EGFP $d = 3,1 \text{ nm}$), was möglicherweise durch die stärkere Insertion der Proteinmoleküle in die Monoschicht zu begründen ist, während 16/EGFP sich wahrscheinlich auch an den Lipidfilm anlagert. Der Neigungswinkel der β -Faltblätter ist in beiden Fällen mit $\sim 50^\circ$ ermittelt worden. Außerdem ist dieser Wert mit dem ermittelten Neigungswinkel der β -Faltblätter des i16/EGFP in Wechselwirkung mit einer Thylakoidlipidmonoschicht identisch, was auf eine ähnliche Orientierung der drei Proteine in Wechselwirkung mit Lipiden hinweist.

3.5 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse des Thylakoid-Systems

Die physikalisch-chemische Charakterisierung der verwendeten thylakoidalen Lipide ergab, dass sowohl die Einzellipide als auch die Gemische flüssig-expandiertes Phasenverhalten aufweisen. IRRA-spektroskopische Aufnahmen zeigten alle erwarteten lipidspezifischen Banden. Die epi-fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die Einzelkomponenten in Monoschichten des Thylakoidlipidgemisches höchstwahrscheinlich homogen verteilt sind.

Die Untersuchung der einzelnen Proteine und des Peptides ergab, dass sie alle oberflächenaktiv sind und Protein/Peptidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche bilden. Die Anwesenheit des Signalpeptides im chimären Protein (i16/EGFP) verstärkte die Adsorptionsfähigkeit an die Grenzfläche im Vergleich zum reinen EGFP. Es hatte auch Einfluss auf die Orientierung und die Sekundärstruktur des adsorbierten Proteins. Bei i16/EGFP war der Anteil der α -helikalen Strukturelemente erhöht, wobei es natürlich hauptsächlich wie EGFP aus β -Faltblättern aufgebaut ist, die das β -Barrel bilden. Der Neigungswinkel dieser β -Faltblätter betrug 30° , wohingegen die β -Faltblätter im reinen EGFP um 20° geneigt vorlagen. Außerdem zeigte sich eine Abhängigkeit der Oberflächenaktivität des i16/EGFP von der Ionenstärke der Subphase, wohin gegen die Grenzflächenaffinität des EGFP davon nicht beeinflusst wurde. Das Signalpeptid ist ebenfalls oberflächenaktiv und zeigte deutliche Unterschiede im Adsorptionsverlauf in Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration. Bei geringen Peptidkonzentrationen lagen die Moleküle α -helikal strukturiert vor. Wurden höhere Konzentrationen verwendet, kam es zu einer Konformationsänderung zu aggregierten β -Faltblättern. Die Oberflächenaktivität des Signalpeptides schien ebenfalls von der Ionenstärke der Subphase beeinflusst zu werden.

Auch die Wechselwirkung mit Lipiden wird durch die Kopplung des Signalpeptides an EGFP begünstigt. Während das reine EGFP nur schwach mit Lipidmonoschichten interagiert, zeigte das chimäre Protein eine deutlich stärkere Wechselwirkung. Die Interaktion mit den Lipiden hatte auch Auswirkungen auf die Sekundärstruktur und die Orientierung des Proteins. Der α -helikale Strukturanteil des i16/EGFP wurde durch die Adsorption an Lipide verstärkt und der Neigungswinkel der β -Faltblätter betrug 50° gegenüber 30° wenn das Protein an der Luft/Wasser-Grenzfläche vorlag. Die Wechselwirkung des Signalpeptides mit der Lipidmonoschicht konnte IRRA-spektroskopisch nur verfolgt werden, wenn es in höheren Konzentrationen eingesetzt wurde. Es schien an der Grenzfläche zu aggregieren. Die

Ermittlung des maximalen Einbaudruckes zeigte, dass eine spontane Insertion sowohl der untersuchten Proteine als auch des Peptides in thylakoidale Membranen wahrscheinlich nur in geringem Maße stattfindet. Die Ionenstärke der Subphase schien lediglich die Geschwindigkeit der Adsorption von i16/EGFP und des Signalpeptides an Lipidmonoschichten zu beeinflussen, wohingegen die Interaktion von EGFP dadurch nicht verändert wurde.

Auch mit einer stärker negativ geladenen Monoschicht sowie mit der Hauptkomponente der thylakoidalen Membran (MGDG) zeigte EGFP kaum Wechselwirkungen. Für das chimäre Protein i16/EGFP wurden nur geringe Unterschiede zu den Ergebnissen mit dem thylakoidalen Lipidgemisch beobachtet. Es zeigte in Interaktion mit MGDG die höchsten Druckänderungen nach der Injektion. Die Ergebnisse der reinen Filmwaagemessungen für die Adsorptionen des Signalpeptides in den unterschiedlichen Konzentrationen von 100 nM bzw. 500 nM an das Thylakoidlipidgemisch zeigten kaum Unterschiede. Bei den Messungen mit dem anionischen Gemisch bzw. mit MGDG wurde unter Verwendung der höheren Peptidkonzentration eine deutliche Steigerung der Wechselwirkung beobachtet.

Die Adsorptionsexperimente an eine POPC-Monoschicht zeigten, dass die verwendeten Substrate nicht ausschließlich mit den spezifischen, pflanzlichen Lipiden interagieren, sondern ganz im Allgemeinen in der Lage sind, Wechselwirkungen mit Lipiden einzugehen.

In den Oberflächenaktivitätsmessungen wurden ähnliche Ergebnisse für das Protein 16/EGFP wie für i16/EGFP beobachtet. Das Transitpeptid übte keinen großen Einfluss auf die Proteinstruktur aus, beeinflusste aber die Adsorptionsgeschwindigkeit an die Luft/Wasser-Grenzfläche. Für die Adsorption an Lipidmonoschichten wurde ein deutlich höherer maximaler Einbaudruck ermittelt. Außerdem wurde durch die Interaktion mit Lipiden, im Gegensatz zu den Messungen mit i16/EGFP, kaum eine Änderung der Proteinstruktur beobachtet.

In Adsorptionsverhalten und -stärke an die Luft/Wasser-Grenzfläche unterschieden sich PC/EGFP, welches in der thylakoiddirigierenden Domäne eine Sequenz für den Sec-spezifischen Transport enthält, und die chimären Proteine, die ein Tat-spezifisches Peptid tragen (i16/EGFP und 16/EGFP) kaum. Allerdings wies PC/EGFP einen höheren Sekundärstrukturanteil und einen geringeren Neigungswinkel der β -Faltblätter auf. Mit Lipidmonoschichten interagierte PC/EGFP ähnlich stark wie 16/EGFP und zeigte damit einen maximalen Einbaudruck der deutlich über dem kritischen Wert von 30 mN m^{-1} lag. Der Neigungswinkel der β -Faltblätter der EGFP-Proteine mit den unterschiedlichen Peptidsequenzen war in Interaktion mit den jeweils spezifischen Monoschichten gleich.

4 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen mit dem bakteriellen System

Wie in Kap. 1.3 beschrieben, kommt das Tat-spezifische Translokationssystem auch in bakteriellen Membranen vor. Eines der am besten untersuchten Systeme ist das der *E. coli* Zelle (Kap. 1.3.2).

4.1 Physikalisch-chemische Lipidcharakterisierung der Lipide des polaren *E. coli* Extraktes an der Luft/Wasser-Grenzfläche

4.1.1 Druck/Flächen-Isothermen durch Filmwaagemessungen

Zur Untersuchung des Phasenverhaltens der *E. coli*-Lipide PE, PG, CL und deren Gemische wurden π/A -Isothermen auf Wasser bei 20 °C gemessen. Sie zeigten, dass sowohl die Einzellipide als auch die Lipidgemische flüssig-expandiertes Phasenverhalten aufweisen (nicht gezeigt).

4.1.2 IRRA-spektroskopische Untersuchung der Lipidmonoschichten

Für die weiteren Untersuchungen, vor allem für die Adsorptionsexperimente, waren das polare *E. coli*-Lipidgemisch, wegen seiner Zusammensetzung, und das Einzellipid PG, wegen seiner negativen Nettoladung, besonders interessant. Sie wurden mittels IRRA-Spektroskopie auf einer Puffersubphase, bei 20 °C und einem lateralen Filmdruck von 20 mNm⁻¹ untersucht.

Nach der Kompression der Monoschicht des Lipidgemisches und dem Erreichen des gewünschten Druckes blieb die Fläche pro Molekül während der gesamten, mehr als zwanzigstündigen Messung, konstant. Die simultan aufgenommenen Spektren änderten sich während der Messzeit nur geringfügig.

Ein typisches Lipidspektrum des polaren *E. coli* Extraktes ist in Abb. 4.1 (Schwarz) dargestellt. Die auffälligsten Banden waren die positive OH-Streckschwingungsbande $\nu(\text{OH})$ bei 3590 cm⁻¹ und die ebenfalls positive H₂O-Deformationsschwingungsbande $\delta(\text{H}_2\text{O})$ bei ~1670 cm⁻¹. Die intensitätsschwächeren, negativen, lipidspezifischen Banden geben Auskunft über die Eigenschaften des Lipidfilms und die chemische Struktur der Lipide. Die Bandenlage der antisymmetrischen und symmetrischen Methylenstreckschwingungsbande ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ bei ~2925 cm⁻¹ und $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ bei ~2855 cm⁻¹) zeigten einen Lipidfilm mit flüssig-expandierten Eigenschaften. Auch die Methylenformtionsschwingung $\delta(\text{CH}_2)$ bei 1465 cm⁻¹ wurde beobachtet. Weniger intensive Banden wurden von den Methylstreckschwingungen ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$

bei 2960 cm^{-1}) der endständigen CH_3 -Gruppen der Alkylketten und den $\text{C}=\text{CH}_2$ -Vinylstretschwingungen ($\sim 3000\text{ cm}^{-1}$) hervorgerufen. Bei kleineren Wellenzahlen wurden intensive, negative Banden beobachtet, die auf die Carboxystretschwingungen ($\nu(\text{C}=\text{O})$ bei 1735 cm^{-1}) und auf die Stretschwingungen der C-O Bindungen ($\nu(\text{C}-\text{O})$) und der P-O Bindungen ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)$ bei $\sim 1220\text{ cm}^{-1}$ und $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2)$ bei $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$) zurückzuführen sind.

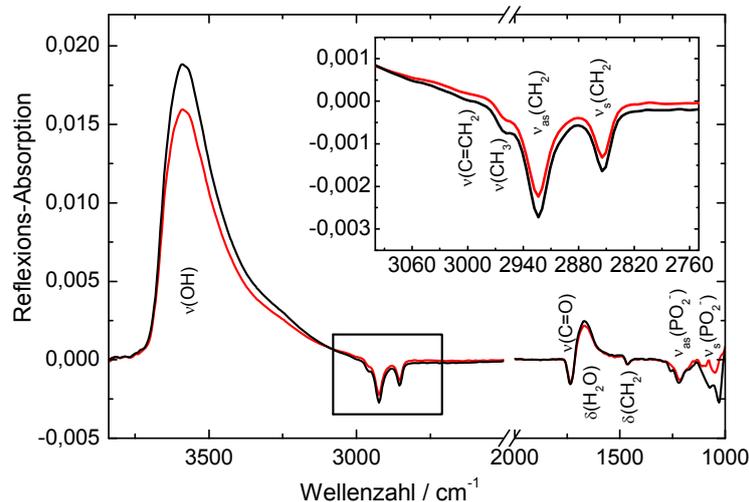


Abb. 4.1: IRRA-Spektren von Lipidmonoschichten bei $\pi = 20\text{ mN m}^{-1}$, auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20\text{ }^\circ\text{C}$. Schwarz: polarer *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%); Rot: *E. coli* PG; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Methylenschwingungsbereiches.

Die IRRA-Spektren der Monoschicht des negativ geladenen Lipids PG zeigten ein ähnliches Aussehen wie es für das Gemisch beobachtet wurde (Abb. 4.1, Rot). Im Vergleich zum Gemisch waren die beobachteten Banden intensitätsschwächer. Die Monoschicht des PG weist, unter der Annahme eines sehr ähnlichen Brechungsindex, eine geringere Lipidschichtdicke gegenüber dem Film des polaren Extraktes auf. Außerdem zeigten sich größere Unterschiede im Wellenzahlbereich zwischen 1000 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} . Hier wurden unter anderem die Signale der Phosphatschwingungen detektiert. Im Lipidgemisch werden diese offensichtlich durch die Signale anderer Molekülschwingungen überlagert.

4.1.3 Epi-fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des polaren *E. coli*-Lipidgemisches

Filmwaage- und IRRA-spektroskopische Messungen der Lipidmonoschichten zeigten, dass das polare Lipidgemisch ein flüssig-expandiertes Phasenverhalten aufweist. Es wird angenommen, dass die einzelnen Lipidkomponenten homogen in der Monoschicht verteilt vorliegen. Um das zu überprüfen, wurden epi-fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den π/A -Isothermen des Lipidgemisches auf den verschiedenen Subphasen Wasser und

Puffer aufgenommen. Es wurden die schon beschriebenen Fluoreszenzmarker BODIPY-C12-HPC und Rhodamin-DHPE benutzt (Kap. 2.2.3).

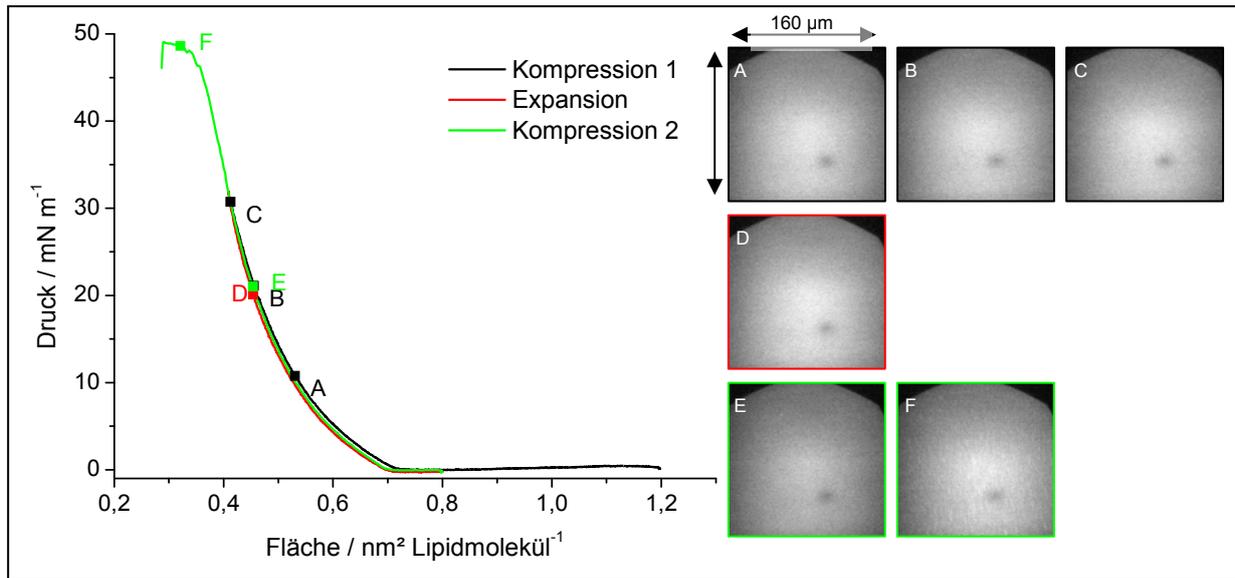


Abb. 4.2: π/A -Isothermen des polaren *E. coli* Extraktes (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) mit BODIPY-C12-HPC (0,1 mol-%) auf Wasser bei 20 °C. Schwarz: Kompression 1 ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), A ($A = 0,53$; $\pi = 10,8$), B ($A = 0,46$; $\pi = 21,1$), C ($A = 0,41$; $\pi = 30,7$). Rot: Expansion ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), D ($A = 0,46$; $\pi = 20,1$). Grün: Kompression 2 ($v \sim 0,16 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), E ($A = 0,45$; $\pi = 21,0$), F ($A = 0,32$; $\pi = 48,6$). A [$\text{nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1}$] und π [mN m^{-1}].

Die π/A -Isothermen des polaren *E. coli*-Lipidgemisches mit BODIPY-C12-HPC (0,1 mol-%) wurden bei unterschiedlichen Kompressionsgeschwindigkeiten aufgenommen. Die Abb. 4.2 zeigt, dass auf wässriger Subphase die verschiedenen Kompressions- und Expansionskurven sehr ähnlich aussahen. Es trat keine Hysterese auf. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen unterschieden sich in den verschiedenen Kompressions- bzw. Expansionszyklen nicht (Abb. 4.2 A-E). Im Übergangsbereich zwischen gas-analoger und flüssig-expandierter Phase kam es zur Ausbildung einer Schaumphase mit deutlich definierten Phasengrenzen. Die gas-analoge Phase erscheint dunkel. Die hellen Bereiche entsprechen der flüssig-expandierten Lipidphase mit den eingebetteten fluoreszierenden Molekülen. Diese Gebiete „wuchsen“ während der Kompression des Lipidfilms auf der wässrigen Subphase zu einer homogenen Fläche. Nach dem Kollaps des Filmes erschienen kleine stärker fluoreszierende Bereiche (Abb. 4.2 F).

Wurde Puffer als Subphase benutzt, wurde ebenfalls keine Hysterese durch mehrmaliges Komprimieren und Expandieren beobachtet (Abb. 4.3). Der „lift-off“ der Isothermen lag im Vergleich zu den Messungen auf Wasser bei etwas größeren Flächen pro Lipidmolekül. Auch auf der Puffersubphase wurde die Schaumphase beobachtet. Die dunklen Bereiche wurden während der Kompression ebenfalls kleiner, verschwinden aber nicht vollständig. In der Abb.

4.3 A, B, C, D und F ist zu sehen, dass die Monoschicht auf Puffer während der gesamten Kompressions- und Expansionsvorgänge dunkle Domänen enthielt. An diesen Strukturen riss der Film bei ausreichender Expansion und es entstanden die kreisrunden dunklen Bereiche, die die gas-analoge Phase repräsentieren (Abb. 4.3 E).

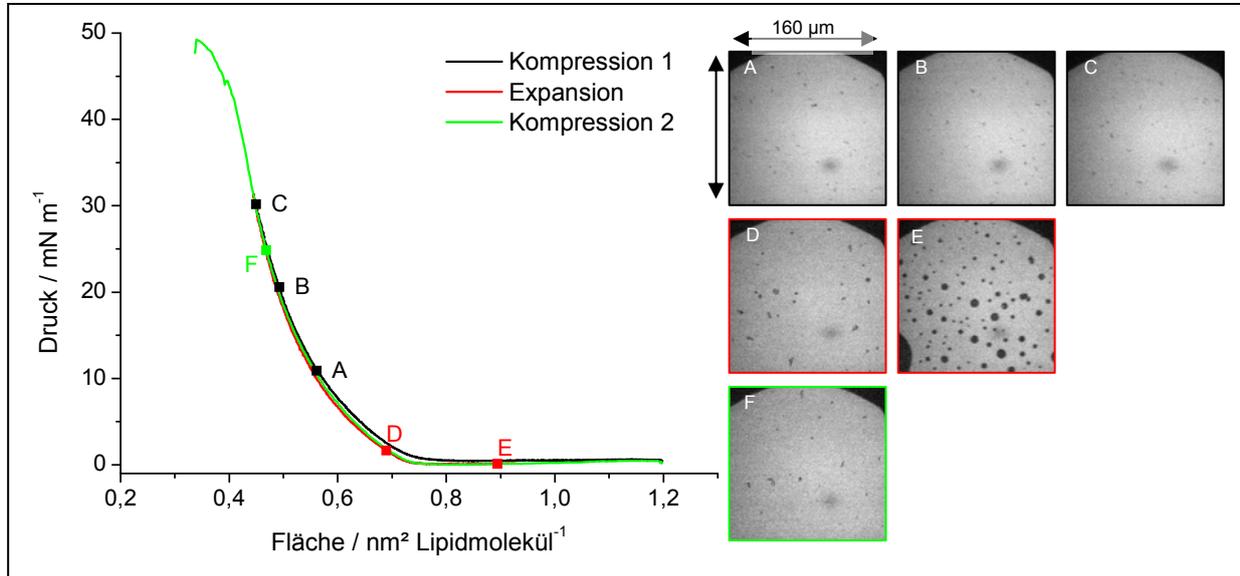


Abb. 4.3: π/A -Isothermen des polaren *E. coli* Extraktes (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) mit BODIPY-C12-HPC (0,1 mol-%) auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. Schwarz: Kompression 1 ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), A ($A = 0,56$; $\pi = 10,9$), B ($A = 0,49$; $\pi = 20,6$), C ($A = 0,45$; $\pi = 30,2$). Rot: Expansion ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), D ($A = 0,69$; $\pi = 1,7$), E ($A = 0,89$; $\pi = 0,1$). Grün: Kompression 2 ($v \sim 0,16 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), F ($A = 0,47$; $\pi = 24,9$). A [$\text{nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1}$] und π [mN m^{-1}].

Um auszuschließen, dass die beobachteten Domänen durch die Wahl des Fluorophors hervorgerufen wurden, wurden die Messungen mit dem Farbstoff Rhodamin-DHPE (0,01 mol-%) wiederholt.

Auch in diesen Messungen wurde sowohl auf wässriger als auch auf einer Puffersubphase keine Hysterese beobachtet (Abb. 4.4 und Abb. 4.5). Wieder wurde ein „lift-off“ bei größeren Flächen pro Lipidmolekül gemessen, wenn die Isothermen auf der Puffersubphase aufgenommen wurden. Bei ausreichend starker Expansion der Filme wurde auf beiden Subphasen die Schaumphase beobachtet (Abb. 4.4 A und B, Abb. 4.5 E und F). Auf der wässrigen Subphase zeigte sich ein homogener Film (Abb. 4.4 D-G). Wurde Puffer als Subphase verwendet, blieben, wie schon beschrieben, dunkle Domänen im Film sichtbar (Abb. 4.5 B-D, G). Bei ausreichender Expansion des Filmes bildeten sich nicht nur dunkle, runde Bereiche, sondern auch unregelmäßige, längliche Strukturen (Abb. 4.5 E und F).

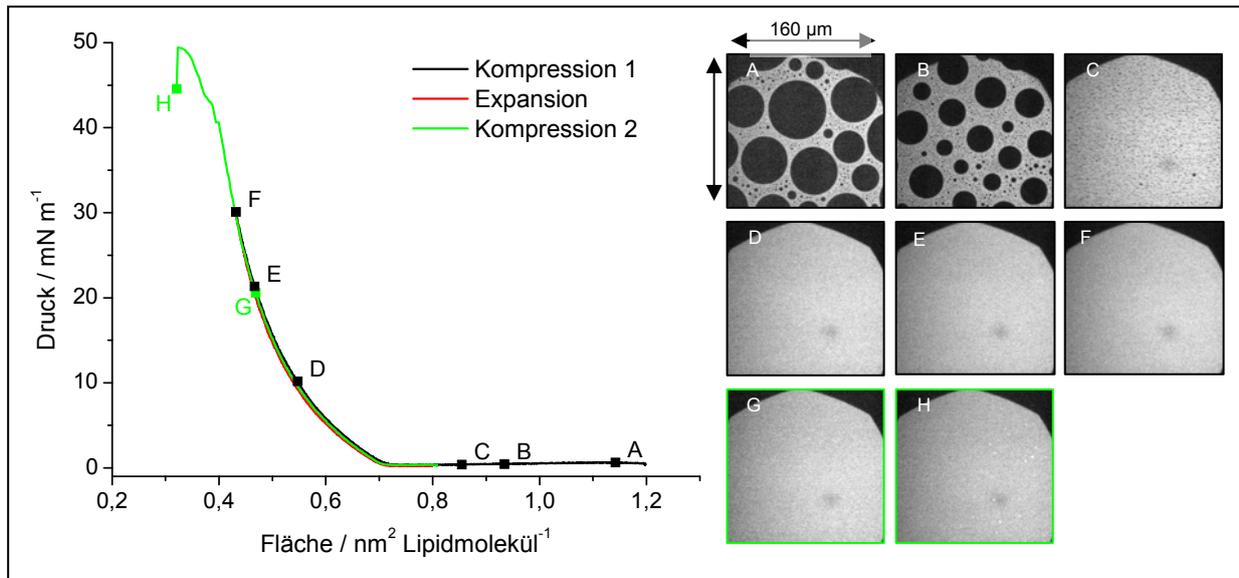


Abb. 4.4: π/A -Isothermen des polaren *E. coli* Extraktes (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) mit Rhodamin-DHPE (0,01 mol-%) auf Wasser bei 20 °C. Schwarz: Kompression 1 ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), A ($A = 1,14$; $\pi = 0,6$), B ($A = 0,93$; $\pi = 0,4$), C ($A = 0,85$; $\pi = 0,4$), D ($A = 0,55$; $\pi = 10,2$), E ($A = 0,47$, $\pi = 21,3$), F ($A = 0,43$, $\pi = 30,1$). Grün: Kompression 2 ($v \sim 0,16 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), G ($A = 0,47$; $\pi = 20,6$), H ($A = 0,32$; $\pi = 44,6$). A [$\text{nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1}$] und π [mN m^{-1}].

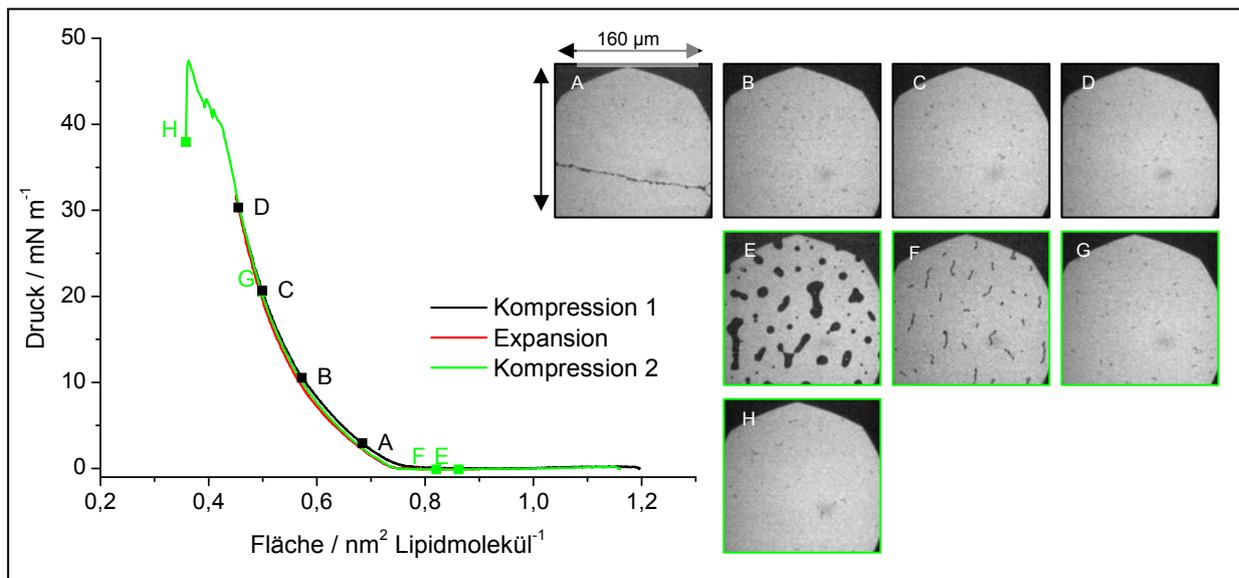


Abb. 4.5: π/A -Isothermen des polaren *E. coli* Extraktes (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) mit Rhodamin-DHPE (0,01 mol-%) auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. Schwarz: Kompression 1 ($v \sim 0,04 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), A ($A = 0,68$; $\pi = 2,9$), B ($A = 0,57$; $\pi = 10,5$), C ($A = 0,5$; $\pi = 21,0$), D ($A = 0,46$; $\pi = 30,3$). Grün: Kompression 2 ($v \sim 0,16 \text{ nm}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$), E ($A = 0,86$; $\pi = -0,1$), F ($A = 0,82$, $\pi = -0,1$), G ($A = 0,5$, $\pi = 20,5$), H ($A = 0,36$, $\pi = 38,0$). A [$\text{nm}^2 \text{ Lipidmolekül}^{-1}$] und π [mN m^{-1}].

Die physikalisch-chemische Charakterisierung der Lipide zeigte, dass sowohl die einzelnen, *E. coli*-spezifischen Lipidkomponenten als auch das polare Lipidgemisch flüssig-expandiertes Phasenverhalten aufweisen. Die hauptsächlichen Unterschiede in den IRRA-Spektren der PG Monoschicht und der des polaren *E. coli* Extraktes waren die unterschiedliche Schichtdicke

und die Bandenintensität der Phosphatbanden. Die größere Schichtdicke des Gemisches wird möglicherweise durch das *E. coli* PE verursacht, da es über einen großen Anteil an längeren Acylketten verfügt (Tab. 1.1). Epi-fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass sich das Lipidgemisch unterschiedlich auf verschiedenen Subphasen verhält. Während es auf Wasser einen homogenen Film bildete, zeigten sich auf Puffer kleine, unregelmäßig strukturierte Domänen. Diese Domänen sind über den gesamten Messzeitraum, an jeder Stelle der Isotherme und unabhängig von der Geschwindigkeit und der Anzahl der Kompressionen bzw. Expansionen zu beobachten. Warum der Lipidfilm auf der Puffersubphase nicht homogen ist und wodurch die Domänen gebildet werden, konnte hier nicht gezeigt werden. Die Unterschiede sind wahrscheinlich nicht durch die Zugabe des Farbstoffes hervorgerufen, sondern durch den Puffer induziert. Möglicherweise bilden sich kleine Lipidaggregate. Es kann nicht verifiziert werden, welche Lipidkomponenten diese Aggregate bilden. Auszuschließen ist, dass sich eine einzelne Lipidkomponente zu den Aggregaten zusammenlagert, denn den kleinsten Anteil am polaren Gemisch macht Kardiolipin mit ~20 mol-% aus. Läge diese Komponente aggregiert vor, müssten die Domänen größer sein. Unter der Berücksichtigung, dass die unterschiedlichen Lipidkomponenten verschieden lange Acylketten tragen und damit innerhalb einer Lipidspezies eine Verteilung länger- und kürzerkettiger Moleküle herrscht, könnten die Domänen durch die Zusammenlagerung von Lipiden mit besonders langen bzw. kurzen Ketten zustande kommen.

4.2 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Die Oberflächenaktivität der verwendeten Proteine (HiPIP und preHiPIP) und des Signalpeptides wurde durch die Messung des Oberflächendruckes bestimmt. Dazu wurde die Protein/Peptidlösung in die Subphase injiziert und die Änderungen des Oberflächendruckes in Abhängigkeit der Zeit beobachtet. Um den Einfluss der Subphase auf das Adsorptionsverhalten zu klären, wurde neben Puffer auch Wasser als Subphase verwendet.

4.2.1 Adsorption der Proteine und des Peptides an der Luft/Wasser-Grenzfläche

4.2.1.1 Oberflächenaktivität des High Potential Iron Sulfur Protein (HiPIP) und des Precursor-Proteins des HiPIP (preHiPIP)

Die Änderungen des Oberflächendruckes nach der Injektion von HiPIP waren sowohl in wässriger als auch in der Puffersubphase sehr gering (Abb. 4.6 A). Bei der Oberflächenaktivitätsmessung in wässriger Subphase nahm der Druck im Messverlauf geringfügig ab. Wahrscheinlich nahm der Füllstand im Trog mit der Zeit durch Verdunstung ab, wodurch sich der gemessene Oberflächendruck verringerte. Bei der Messung mit Puffer als Subphase wurde ein leichter Anstieg des Oberflächendruckes beobachtet. Bei langer Inkubationszeit (>15 h) steigt der Druck sogar auf $\sim 5 \text{ mNm}^{-1}$ (nicht gezeigt).

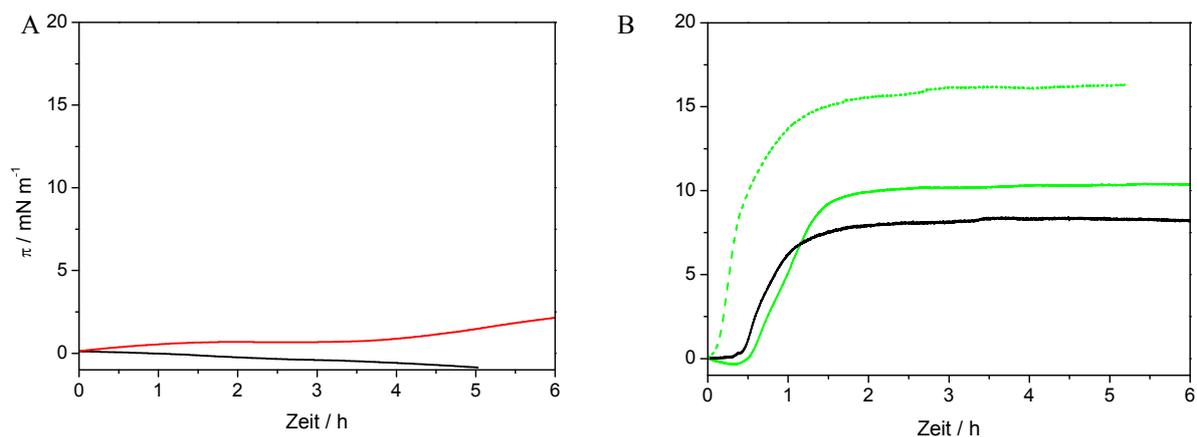


Abb. 4.6: Adsorptionsisothermen der Proteine mit unterschiedlichen Subphasen bei 20 °C an die Luft/Wasser-Grenzfläche. A: HiPIP (100 nM); Schwarz: in Wasser; Rot: in Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0); B: preHiPIP (100 nM); Schwarz Charge I in Wasser, Grün gestrichelt: Charge I in Puffer; Grün: Charge II in Puffer.

In den Adsorptionsisothermen in Abb. 4.6 B ist zu erkennen, dass die Oberflächenaktivität des preHiPIP in den verschiedenen Subphasen unterschiedlich war. Etwa 30 min nach der Proteinzugabe in Wasser erfolgte der Anstieg des Oberflächendruckes auf $\sim 8 \text{ mNm}^{-1}$. Der

laterale Druck blieb dann konstant. Bei den Oberflächenaktivitätsmessungen in der Puffersubphase stieg der Druck sofort nach der Injektion an. Das Gleichgewicht wurde bei $\sim 16 \text{ mN m}^{-1}$ erreicht.

Es wurde festgestellt, dass diese Ergebnisse mit einer neu angefertigten Proteinlösung nicht reproduzierbar waren. Wurde das neue Protein in Puffer injiziert, wurde eine deutlich schwächere Oberflächenaktivität beobachtet. Erst $\sim 30 \text{ min}$ nach der Injektion stieg der Druck und das Gleichgewicht stellte sich bei $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ ein (Abb. 4.6 B).

4.2.1.2 Oberflächenaktivität des Signalpeptides

Erfahrungen mit dem pflanzlichen Signalpeptid zeigten, dass es sinnvoll ist, die Oberflächenaktivität konzentrationsabhängig zu untersuchen (Kap. 3.2.1.2). Nach der Zugabe des Signalpeptides von HiPIP in eine Puffersubphase wurde für alle gewählten Peptidkonzentrationen die Bildung eines Proteinfilmes beobachtet (Abb. 4.7 B). Bei einer geringen Peptidkonzentration von 50 nM erfolgte eine Zunahme des lateralen Druckes erst nach $\sim 1 \text{ h}$. In Abb. 4.7 B ist dieser Adsorptionsvorgang an die Luft/Wasser-Grenzfläche unter Berücksichtigung der oberen X-Achse zu sehen. Die Adsorption erfolgte stufenweise und dauerte lange an ($\sim 17 \text{ h}$). Bei einem Oberflächendruck von $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ stellte sich ein Gleichgewicht ein. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit höheren Peptidkonzentrationen ist dieser maximale Oberflächendruck hoch. Der Grund könnte die sehr lange Inkubationszeit sein. Fehler im Versuchsaufbau können allerdings auch nicht ausgeschlossen werden.

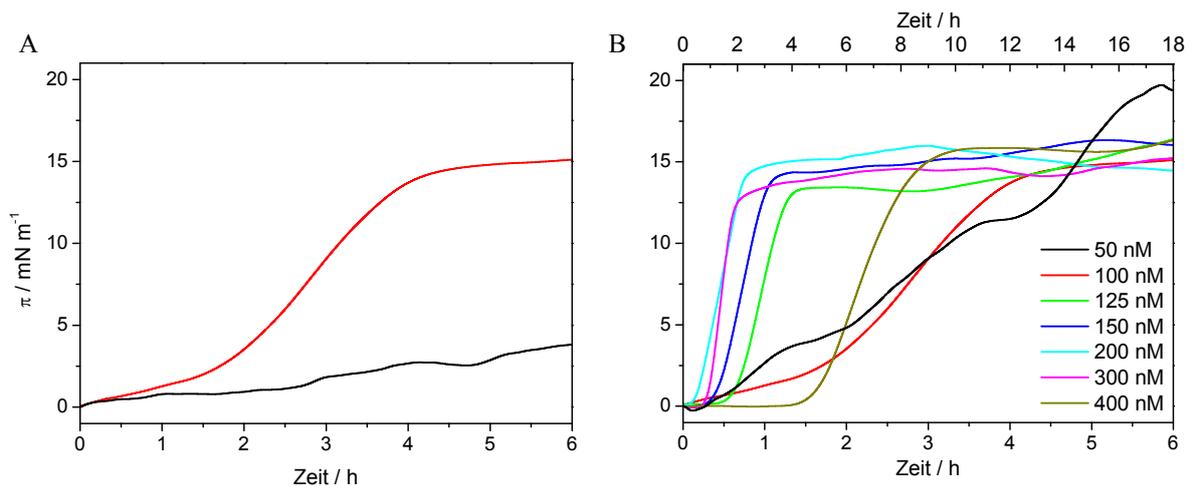


Abb. 4.7: Adsorptionsisothermen des Signalpeptides mit unterschiedlichen Subphasen bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ an die Luft/Wasser-Grenzfläche. A: 100 nM Schwarz: in Wasser; Rot: in Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0). B: Konzentrationsabhängige Adsorption in Puffer, obere X-Achse für 50 nM.

Bei einer Konzentration des Peptides von 100 nM zeigte sich ein schnellerer, einstufiger Adsorptionsprozess. Der Gleichgewichtszustand wurde bei einem Druck von $\sim 15 \text{ mN m}^{-1}$

erreicht. Ab einer Konzentration von 125 nM stieg der laterale Druck nach der Injektion stark an. Bei diesen Messungen mit höheren Peptidkonzentrationen stellte sich das Gleichgewicht ebenfalls bei einem Oberflächendruck von $\sim 15 \text{ mN m}^{-1}$ ein. Bemerkenswert ist, dass die Messung mit der Peptidkonzentration von 400 nM eine erheblich längere Inkubationszeit benötigt ($\sim 1,5 \text{ h}$). Möglicherweise sind präparative Fehler dafür verantwortlich.

In Wasser als Subphase wurde die Oberflächenaktivität nur mit einer Peptidkonzentration von 100 nM gemessen (Abb. 4.7 A, Schwarz). Verglichen mit der Messung in Puffer wurde eine deutlich geringere Änderung des Druckes beobachtet ($\Delta\pi_{\text{max}} \sim 5 \text{ mN m}^{-1}$), was beweist, dass die Oberflächenaktivität von der Zusammensetzung der Subphase beeinflusst wird.

4.2.2 IRRA-spektroskopische Untersuchung der Protein/Peptidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Durch die IRRA-Spektroskopie sollen neben der Beobachtung der Protein/Peptidfilmbildung an der Luft/Wasser-Grenzfläche Informationen über die Sekundärstruktur der adsorbierten Moleküle gewonnen werden.

4.2.2.1 IRRA-spektroskopische Untersuchung von HiPIP

Die Isotherme in Abb. 4.8 A zeigt die Adsorption von HiPIP an die Luft/Wasser-Grenzfläche in der Puffersubphase. Zunächst wurde keine Druckänderung nach der Injektion beobachtet. Nach einer Inkubationszeit von $\sim 2,5 \text{ h}$ begann der Oberflächendruck zu steigen. Auch bis zum Abbruch der Messung nach $\sim 20 \text{ h}$ bildete sich kein Gleichgewicht.

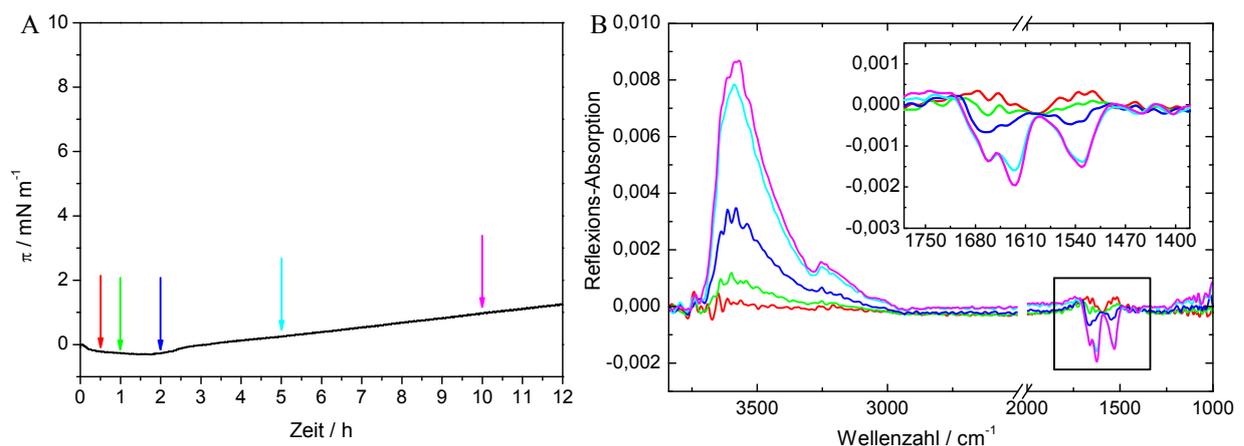


Abb. 4.8: Oberflächenaktivität von HiPIP (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die simultan aufgenommenen Spektren zeigten in den ersten Stunden nach der Proteinzugabe erwartungsgemäß nur sehr geringe Änderungen (Abb. 4.8 B). Nach ~ 2 h bildete sich die $\nu(\text{OH})$ Bande, was auf die Bildung eines Proteinfilms an der Luft/Wasser-Grenzfläche hindeutet. Im weiteren Adsorptionsverlauf nahm die $\nu(\text{OH})$ Bande deutlich an Intensität zu. Außerdem bildete sich die proteinspezifische Amid I Bande. Sie zeigte ein Minimum bei 1661 cm^{-1} , was auf hauptsächlich α -helikale Strukturelemente schließen lässt. Die Schultern bei 1634 cm^{-1} und 1685 cm^{-1} deuten zusätzlich auf die Anwesenheit von β -Faltblättern im Protein hin. Im weiteren Verlauf bildeten sich auch die Amid A und die Amid II Bande. Außerdem änderten sich neben den Intensitäten, Form und Lage der Amidbanden. Die Amid I Bande entwickelte sich zu einer Doppelbande in der die Intensität der β -Faltblattstrukturen (bei 1624 cm^{-1}) gegenüber denen der α -Helixstrukturen (bei 1661 cm^{-1}) immer weiter zunahm. Auch das Minimum der Amid II Bande verschob sich zu kleineren Wellenzahlen (1530 cm^{-1}), was eine Verschiebung hin zu β -Faltblattstrukturen anzeigt.

4.2.2.2 IRRA-spektroskopische Untersuchung von preHiPIP

Die Vorversuche zeigten, dass durch die Kopplung des HiPIP mit dem Tat-spezifischen Signalpeptid die Oberflächenaktivität verstärkt wird.

Es wurde auch gezeigt, dass die Verwendung unterschiedlicher Proteinchargen verschiedene Ergebnisse ergaben. Für die IRRA-spektroskopische Untersuchung wurde Charge II verwendet. Die Messergebnisse zeigten einen ähnlichen Adsorptionsverlauf wie sie im Vorversuch mit der Filmwaagemessung beobachtet wurde (vgl. Abb. 4.6 B und Abb. 4.9 A).

Abb. 4.9 A zeigt, dass der Oberflächendruck während der Injektion des Proteins sprunghaft anstieg. Die Proteinlösung wurde direkt durch die Oberfläche des Puffers in die Subphase injiziert, wobei sich wahrscheinlich Proteinmoleküle an der Grenzschicht zu einem dünnen Proteinfilm organisierten. Der Druck blieb zunächst konstant. Nach ~ 40 min steigt der Oberflächendruck erneut an. Ein Gleichgewicht trat nach ~ 9 h auf. Der Oberflächendruck betrug dann $\sim 9\text{ mN m}^{-1}$.

Die IRRA-Spektren zeigten die Entwicklung des Proteinfilms an der Luft/Wasser-Grenzfläche (Abb. 4.9 B) durch die kontinuierliche Zunahme der Intensität der $\nu(\text{OH})$ Bande ($\sim 3590\text{ cm}^{-1}$). Auch die proteinspezifischen Banden wie die Amid A Bande ($\sim 3285\text{ cm}^{-1}$) und die Amid I und II Banden entwickelten sich. Die Amid I und II Banden nahmen während der Messzeit nicht nur an Intensität zu, sondern veränderten während des Adsorptionsprozesse auch Form und Lage. Zunächst zeigte die Amid I Bande zwei deutlich voneinander abgrenzbare Minima (1662 cm^{-1} und 1625 cm^{-1}). Beim Erreichen der maximalen

Intensität nach ~ 2 h wies die Bande nur noch ein Minimum bei 1629 cm^{-1} auf, was einen überwiegenden Anteil an β -Faltblattstrukturen andeutet. Die Schulter bei 1656 cm^{-1} wies außerdem auf das Vorhandensein α -helikaler Strukturen hin. Auch die Amid II Bande veränderte sich während des Adsorptionsprozesses. Ihre endgültige Lage bei 1536 cm^{-1} deutet auf die Anwesenheit unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente im Molekül hin.

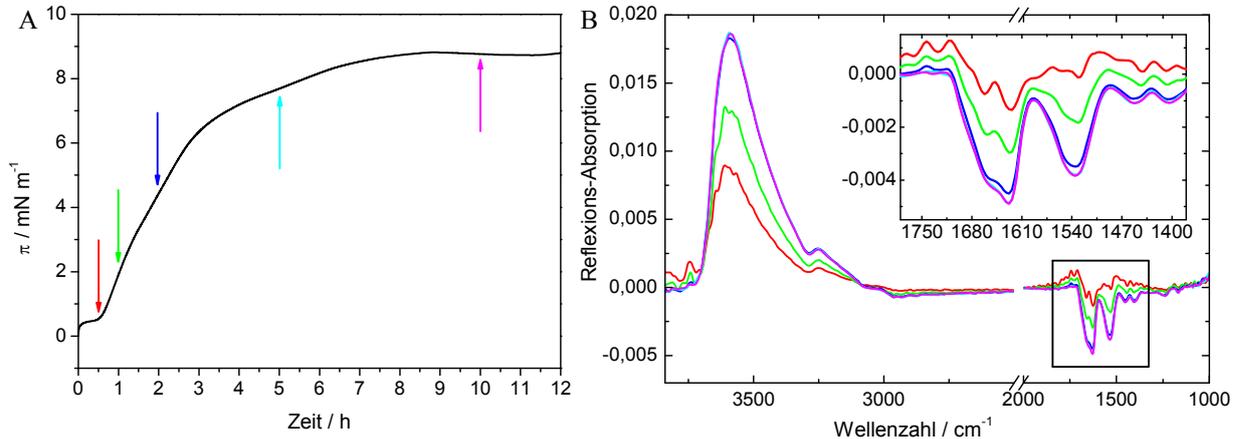


Abb. 4.9: Oberflächenaktivität von preHiPIP (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

4.2.2.3 IRRA-spektroskopische Untersuchung des Signalpeptides

Da die konzentrationsabhängigen Messungen des Signalpeptides in den Vorversuchen zeigten, dass bei einer Peptidkonzentration von 100 nM in der Subphase die Adsorption wahrscheinlich in einem geschlossenen Peptidfilm endet und ausreichend schnell verläuft, wurde mit dieser Konzentration auch die mit IRRA-Spektroskopie gekoppelte Messung durchgeführt.

Verglichen mit den Vorversuchen erfolgte der Adsorptionsprozess langsamer. Außerdem wurde kein Gleichgewicht erreicht.

Die simultan aufgenommenen IRRA-Spektren zeigten schon deutliche peptidspezifische Banden bevor es zum Druckanstieg kam (Abb. 4.10). Die Entstehung der $\nu(\text{OH})$ Bande bei $\sim 3595\text{ cm}^{-1}$ wies auf die Bildung eines Peptidfilms an der Luft/Wasser-Grenzfläche hin. Die Amid I und II Banden lagen bei 1621 cm^{-1} und 1528 cm^{-1} und weisen damit auf eine aus hauptsächlich β -Faltblättern bestehende Struktur hin. Außerdem zeigte die Schulter bei 1686 cm^{-1} , dass die Faltenblätter antiparallel ausgerichtet sind und wahrscheinlich aggregiert vorliegen (1621 cm^{-1}). Eine weitere Schulter bei 1661 cm^{-1} deutete zudem auch α -helikale Strukturelemente an.

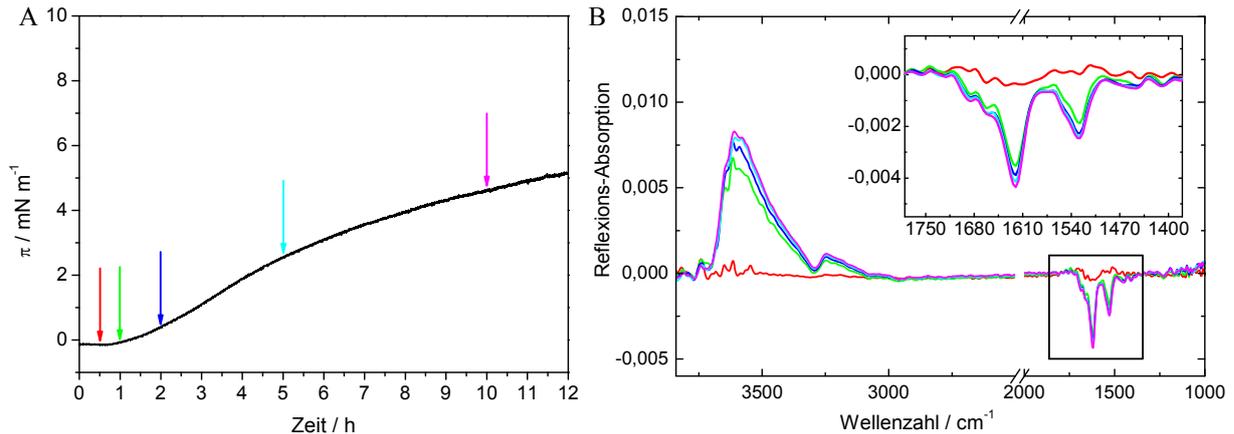


Abb. 4.10: Oberflächenaktivität des Signalpeptides (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Es wurde festgestellt, dass sowohl die Proteine HiPIP und preHiPIP als auch das entsprechende Signalpeptid oberflächenaktiv sind und Protein/Peptidfilme bilden, wobei sich die Intensität deutlich unterscheidet. HiPIP zeigte nur eine schwache Adsorption. In den IRRA-Spektren konnten deutliche Veränderungen im Amidbandenbereich verfolgt werden. HiPIP ist ein sehr stabiles Protein^[50, 104]. Die Änderungen im Spektrum könnten als Ergebnis einer Umorientierung des Proteins an der Grenzfläche interpretiert werden. Schon kleine Änderungen der Orientierung des Moleküls könnten sich stark in den IRRA-Spektren niederschlagen, da nur jeweils kurze Bereiche des Proteins als β -Faltblatt bzw. α -Helix organisiert sind. Eine Aggregation und die damit verbundenen Konformationsänderungen der Proteinstruktur kann an der Luft/Wasser-Grenzfläche ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Das preHiPIP zeigte eine starke Adsorption als das reine HiPIP, was auf das gekoppelte Signalpeptid zurückgeführt werden kann. Die Strukturinformationen aus den IRRA-spektroskopischen Spektren waren denen des reinen HiPIP sehr ähnlich. Wahrscheinlich liegt das an das Protein gekoppelte Peptid, wie in Lösung (unveröffentlichte Ergebnisse), auch an der Grenzfläche unstrukturiert vor. Das eigenständige Signalpeptid zeigte nach der Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche hauptsächlich β -Faltblattstrukturen. In CD-Studien wurde festgestellt, dass das Signalpeptid auch in Lösung in β -Faltblättern organisiert ist (Brüser und Mitarbeiter, nicht veröffentlicht). Das würde bedeuten, dass es während des Adsorptionsvorganges zu keinen Konformationsänderungen im Molekül kommt. Die Möglichkeit, dass es sich bei der β -Faltblattkonformation in Lösung nicht um die native Form handelt, sondern durch Lagerungsbedingungen und/oder –zeitraum bedingt ist, darf nicht außer Acht gelassen werden.

4.3 Adsorption der Proteine und des Peptides an Lipidmonoschichten

Auch für das bakterielle System steht die Analyse des Interaktionsverhaltens zwischen Lipiden und den Proteinkomponenten im Vordergrund der Arbeit. Nach der Charakterisierung der Modellproteine wurde deren Wechselwirkung an Lipidmonoschichten gemessen.

4.3.1 Zeitabhängige Adsorption der Proteine und des Peptides an das polare *E. coli*-Lipidgemisch

Es wurde die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Substraten (HiPIP, preHiPIP und dem entsprechenden, Tat-spezifischen Signalpeptid) und einer Monoschicht, die der Cytoplasmamembran von *E. coli* nachempfunden ist, untersucht. Dafür wurde der polare *E. coli* Extrakt mit der Zusammensetzung PE/PG/CL 67:23:10 mol-% verwendet.

4.3.1.1 Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstanter Fläche

Nach dem Spreiten des Lipidgemisches auf der Puffersubphase wurden Monoschichten mit einem Oberflächendruck von 10, 20 bzw. 30 mN m⁻¹ präpariert. Danach wurde die Protein/Peptidlösung in die Subphase injiziert und die zeitabhängige Druckänderung beobachtet.

Adsorption von HiPIP an Monoschichten des polaren E.coli-Lipidgemisches

Nach der Injektion des HiPIP zeigte sich in den Messungen mit den verschiedenen Ausgangsdrücken jeweils eine Verringerung des Oberflächendrucks. Um zu verifizieren, ob es sich um einen durch die Proteinzugabe induzierten Effekt handelt oder auf die Verdunstung der Subphase zurückzuführen ist, wurden Vergleichsmessungen durchgeführt, in denen keine Proteinzugabe erfolgte. Reine Lipidfilme waren über den betrachteten Zeitraum stabil. Die beobachtete Druckabnahme nach der Zugabe des HiPIP könnte somit auf die Interaktion des Proteins mit der Monoschicht zurückgeführt werden. Möglicherweise bewirkt HiPIP eine Kondensation des Lipidfilms. Andererseits könnte HiPIP durch die Interaktion mit den Lipidmolekülen diese mit in die Subphase ziehen. Durch die dadurch entstehende Verringerung der Lipidmolekülanzahl an der Grenzfläche, sinkt der Druck.

Adsorption von preHiPIP an Monoschichten des polaren E.coli-Lipidgemisches

Die Vorversuche zur Ermittlung der Oberflächenaktivität mit preHiPIP zeigten, dass das Protein eine Affinität für hydrophobe Oberflächen aufweist. In den Adsorptionsmessungen mit Lipidmonoschichten mit niedrigen Initialdrücken von ~10 und ~20 mN m⁻¹ erfolgte nach

der Injektion der Proteinlösung ein geringer Druckanstieg um jeweils $\sim 3 \text{ mN m}^{-1}$. Nach einer Inkubationszeit von $\sim 1 \text{ h}$ waren ein Gleichgewichtszustand und die jeweils maximale Druckänderung erreicht. Schon nach etwa zweistündiger Inkubationszeit begann der Oberflächendruck wieder zu sinken. Bei einem höheren Ausgangsdruck der Monoschicht von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ wurde durch die Injektion des Proteins keine Druckerhöhung induziert. Nach $\sim 30 \text{ min}$ begann der Oberflächendruck zu sinken. Die Ermittlung des maximalen Einbaudruckes ergab $\sim 25 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 4.11, Grün gestrichelt). Ein spontaner Einbau von preHiPIP in Membranen scheint daher unwahrscheinlich.

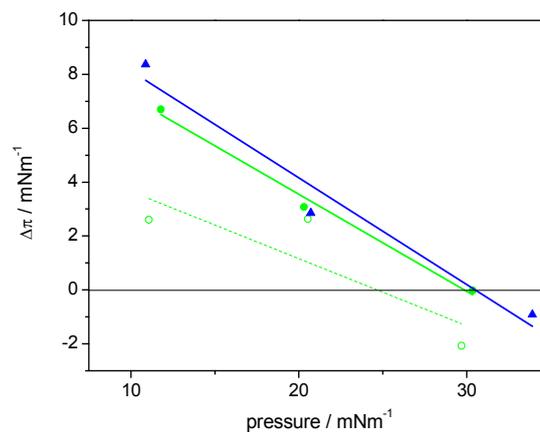


Abb. 4.11: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion des Proteins bzw. des Peptides, auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0), bei 20 °C. Grün gestrichelt: preHiPIP Charge I; Grün: preHiPIP Charge II; Blau: Signalpeptid.

Wiederholungsmessungen mit einer neu präparierten Proteinlösung zeigten andere Resultate. Es wurde ein umso größerer Druckanstieg nach der Proteinzugabe gemessen, je kleiner der Ausgangsdruck der vorgelegten Monoschicht war. Bei einem Ausgangsdruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ wurde keine Erhöhung des Druckes nach der Injektion beobachtet. Allerdings blieb der Film stabil. Bei den geringeren Initialdrücken von ~ 10 und $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ erreichte die Druckänderung Maximalwerte von $\Delta\pi_{\text{max}} \sim 6,5 \text{ mN m}^{-1}$ und $\Delta\pi_{\text{max}} \sim 3,3 \text{ mN m}^{-1}$. Danach blieb der Oberflächendruck jeweils konstant. Der ermittelte maximale Einbaudruck lag bei $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 4.11, Grün). Da keine erkennbare Interaktion zwischen preHiPIP und der Monoschicht mit einem lateralen Oberflächendruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ gemessen wurde, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob preHiPIP spontan in Membranen interkalieren kann.

Adsorption des Signalpeptides an Monoschichten des polaren E.coli-Lipidgemisches

Die Anwesenheit des Signalpeptides im preHiPIP-Molekül scheint die Interaktionsfähigkeit mit Lipidmonoschichten zu erhöhen. Adsorptionsstudien sollen zeigen, ob auch das Signalpeptid allein in der Lage ist mit Lipidmolekülen in Wechselwirkung zu treten.

Bei einem niedrigen Initialdruck des Lipidfilms von $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ erfolgte nach der Peptidinjektion ein Druckanstieg um $\sim 8,5 \text{ mN m}^{-1}$. Der maximale Druckanstieg nach der Injektion des Signalpeptides unter eine Monoschicht mit einem lateralen Oberflächendruck von $\sim 20 \text{ mN m}^{-1}$ betrug $\sim 3,9 \text{ mN m}^{-1}$. Bei einem hohen Ausgangsdruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ zeigte sich nur ein sehr schwacher Druckanstieg direkt nach der Zugabe der Peptidlösung. Die Ermittlung des maximalen Einbaudruckes ergab einen Wert von $\sim 30,5 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 4.11, Blau). Damit kann nicht eindeutig geklärt werden, ob eine spontane Insertion des Signalpeptides in Membranen möglich ist.

4.3.1.2 Zeitabhängige Adsorption bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

Für die mit IRRA-Spektroskopie gekoppelten Messungen wurde der Lipidfilm zu einem lateralen Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} komprimiert, die Protein/Peptidlösung in die Subphase injiziert und die zeitabhängige Flächenänderung pro Lipidmolekül beobachtet. Die simultan aufgenommenen IRRA-Spektren liefern weitere Details wie die Konformation und Orientierung der Proteine bzw. des Peptides in Interaktion mit Lipiden.

Adsorption von HiPIP an Monoschichten des polaren E.coli-Lipidgemisches

Durch die Filmwaagemessungen bei konstanter Fläche konnte nicht eindeutig verifiziert werden, ob HiPIP an der Grenzfläche mit den Lipiden interagiert ohne zu insertieren oder ob das Protein hauptsächlich in der Subphase verbleibt. Mit der IRRA-Spektroskopie kann das überprüft werden.

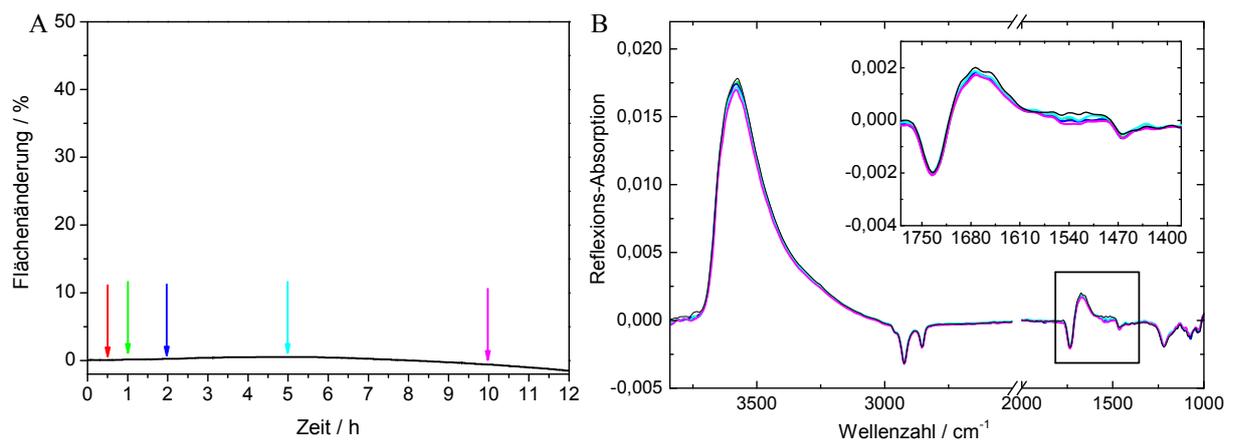


Abb. 4.12: Adsorption von HiPIP (100 nM) an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Nach der Injektion der HiPIP-Lösung blieb die Fläche zunächst konstant und verringerte sich nach einer Inkubationszeit von ~ 5 h (Abb. 4.12 A). Wie in Abb. 4.12 B zu sehen ist, änderten sich die Spektren im Verlauf der Messung kaum. Weder änderten sich Lage oder Form der lipidspezifischen Banden, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass es zu einer Kondensation des Lipidfilmes kommt, noch entwickelten sich proteinspezifische Banden. Das Protein interagiert also nicht mit den Lipiden an der Luft/Wasser-Grenzfläche.

*Adsorption von preHiPIP an Monoschichten des polaren *E.coli*-Lipidgemisches*

Nach der Zugabe der Proteinlösung aus der ersten Charge zeigte sich zunächst eine Erhöhung der Fläche pro Lipidmolekül. Schon nach kurzer Zeit (~ 30 min) deutete sich der Übergang in einen Gleichgewichtszustand an. Dann erfolgte noch einmal eine sprunghafte Flächenvergrößerung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich hier um einen messtechnischen Fehler handelte. Die Fläche pro Lipidmolekül blieb dann noch eine kurze Zeit konstant und begann ~ 1 h nach der Proteinzugabe kontinuierlich zu sinken (Abb. 4.13 A).

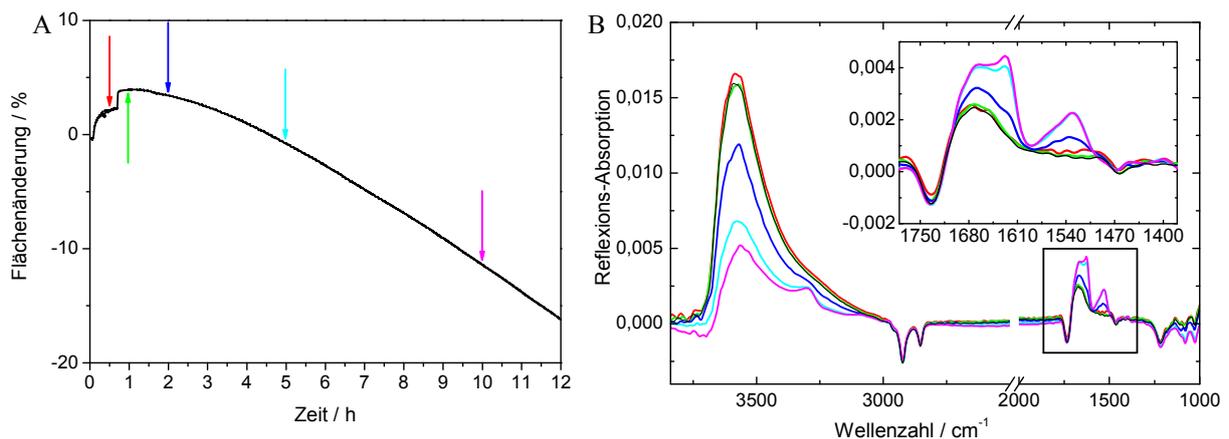


Abb. 4.13: Adsorption von preHiPIP (Charge I, 100 nM) an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20°C . A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die Betrachtung der Spektren in den ersten 30 min nach der Injektion von preHiPIP zeigte eine Intensitätszunahme der $\nu(\text{OH})$ Bande (bei $\sim 3580 \text{ cm}^{-1}$) (Abb. 4.13 B). Im weiteren Messverlauf nahm die Intensität der $\nu(\text{OH})$ Bande stark ab und proteinspezifische aber positive Banden erscheinen. Ein solches Verhalten kann damit erklärt werden, dass die Proteinlösung durch die Verbindungskanäle vom Probenzrog in den Referenzrog diffundierte und dort eine Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche stattfand. Die Bandenformen und –positionen der Amid I und II Banden ähnelten denen, die in der Oberflächenaktivitätsmessung aufgenommen wurden. Dies spricht ebenfalls für die Entstehung eines Proteinfilmes im

Referenztrug. Es wird deutlich, dass preHiPIP eine höhere Affinität zu Luft/Wasser-Grenzflächen als zu Lipidmolekülen aufweist. Die Intensitätsabnahme der OH-Bande kommt durch die Verrechnung der Proben- und Referenzspektren zustande, nicht durch die Verringerung der Schichtdicke des Lipidfilms im Probestrog.

Nach dem Injektionsvorgang der Proteinlösung der zweiten Präparation blieb die Fläche pro Lipidmolekül des Lipidfilms bei 20 mN m^{-1} zunächst konstant. Nach $\sim 1 \text{ h}$ begann die Flächenzunahme. Bis zum Abbruch der Messung wurde eine Flächenänderung von mehr als 12 % erreicht (Abb. 4.14 A). In den entsprechenden Spektren wurden nur geringe Änderungen beobachtet (Abb. 4.14 B). Um die Änderungen im Bereich der Amid I und II Banden besser zu verifizieren, wurde ein Differenzspektrum (des Adsorptionsspektrums 5 h nach der Injektion) berechnet (Abb. 4.17). Dieses weist auf eine hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur des adsorbierten Proteins hin (1657 cm^{-1} und 1545 cm^{-1}).

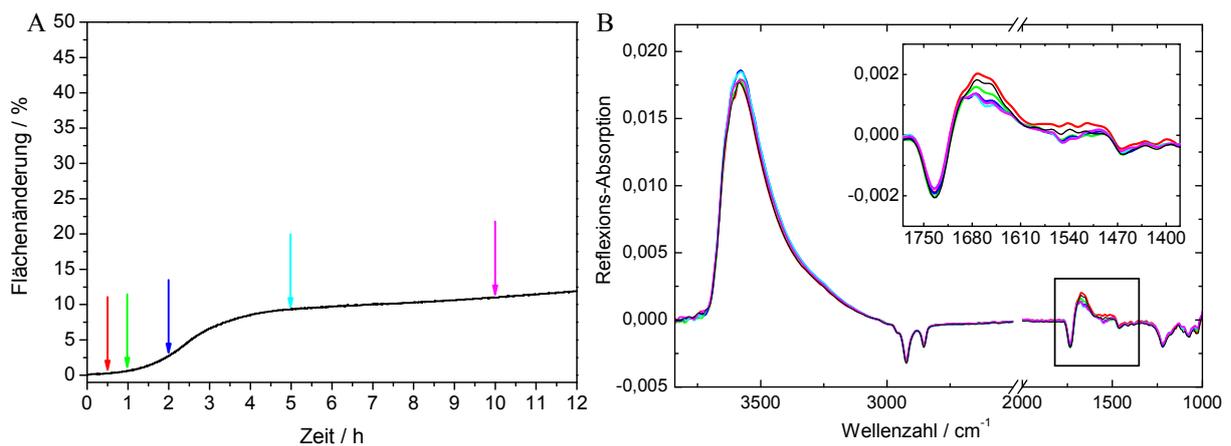


Abb. 4.14: Wiederholung Adsorption von preHiPIP (Charge II, 100 nM) an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Adsorption des Signalpeptides an Monoschichten des polaren E.coli-Lipidgemisches

Die Vorversuche bei konstant gehaltener Fläche zeigten, dass das Signalpeptid mit der Monoschicht interagiert. Wie in Abb. 4.15 A zu sehen ist, wurde durch die Injektion der Peptidlösung eine Flächenzunahme induziert. Die maximale Flächenänderung betrug $\sim 13,5 \%$. Nach mehr als zehnstündiger Inkubation verkleinerte sich die Fläche pro Lipidmolekül und erreichte Flächen, die sogar kleiner waren als zu Beginn des Experimentes. Nach dem Erreichen der kleinstmöglichen Fläche nahm der Druck ab (nicht gezeigt).

In den ersten Stunden der Adsorption zeigten sich in den IRRA-Spektren nur geringe Veränderungen, die mit einer Insertion des Signalpeptides erklärt werden könnten. Die Änderungen in den Bereichen der Amid I und II Banden waren allerdings nicht intensiv genug, um detaillierte Aussagen über das wechselwirkende Peptid zu machen. Im weiteren Messverlauf, während der Flächenabnahme, änderten sich die Spektren drastisch. Die Ausbildung der Amid A Bande und auch die Intensitätszunahme der Amid I und II Banden lassen auf einen verstärkten Einbau des Peptides in die Monoschicht schließen, was allerdings nicht mit der Flächenverringern im Einklang steht. Die Bandenpositionen der Amid I und II Banden ($\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ und $\sim 1530\text{ cm}^{-1}$) zeigten eine Sekundärstruktur, die hauptsächlich aus aggregierten β -Faltblättern aufgebaut ist. Ungewöhnlich war der drastische Intensitätsrückgang der lipidspezifischen Banden. Auch die Entwicklung der OH-Streckschwingungsbande ist ungewöhnlich. Der Abfall der Basislinie vor dieser Bande ist wahrscheinlich grundlegend für die Verschiebung der $\nu(\text{OH})$ Bande von $\sim 3590\text{ cm}^{-1}$ zu $\sim 3565\text{ cm}^{-1}$ verantwortlich. Eine solche Entwicklung kann durch eine starke Veränderung des Brechungsindex, der wiederum von der Beschaffenheit der Molekülschicht abhängig ist, hervorgerufen werden. Allerdings kann hier nicht geklärt werden wie oder wodurch eine so starke Änderung des Brechungsindex verursacht wurde.

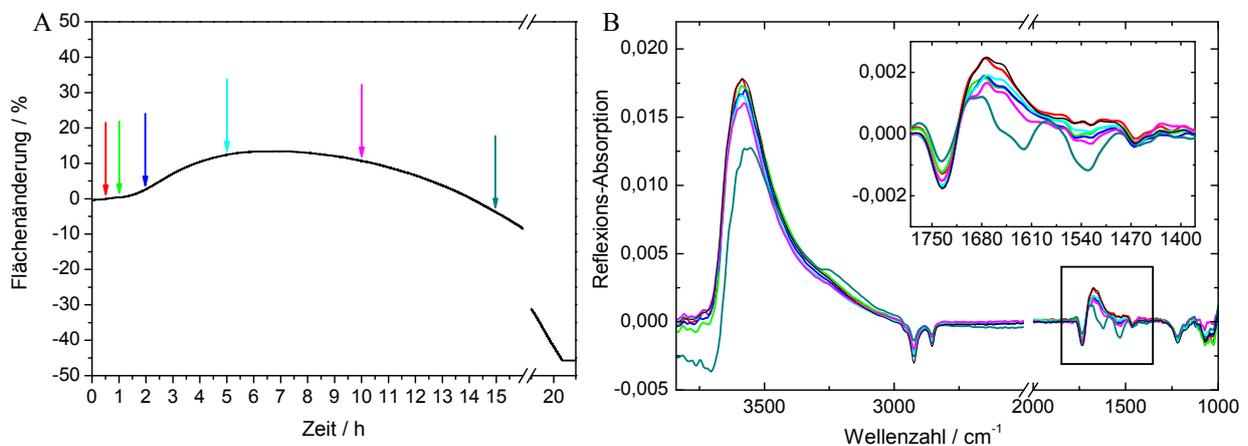


Abb. 4.15: Adsorption des Signalpeptides (100 nM) an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) bei $\pi = 20\text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Durch eine Wiederholungsmessung konnten die Ergebnisse der ersten IRRA-spektroskopischen Messung nicht reproduziert werden (vgl. Abb. 4.15 und Abb. 4.16). Der Adsorptionsverlauf der Wiederholungsmessung zeigte eine stärkere Interaktion durch

eine größere Zunahme der Fläche pro Lipidmolekül und vor allem ein stabiles Messsystem (Abb. 4.16 A). Die maximale Flächenänderung betrug hier $\sim 35\%$.

Durch die Insertion des Peptides in die Monoschicht verringerte sich die Schichtdicke des Films an der Luft/Wasser-Grenzfläche, was sich in der Intensitätsverkleinerung der OH-Streckschwingungsbande ($\nu(\text{OH})$ bei $\sim 3585\text{ cm}^{-1}$) äußert (Abb. 4.16 B). Die Ausbildung peptidspezifischer Banden war schon nach etwa einstündiger Inkubationszeit nach der Peptidinjektion zu beobachten. Neben der Amid A Bande ($\sim 3290\text{ cm}^{-1}$) zeigten die Amid I und II Banden deutlich das adsorbierte Peptid. Die Bandenpositionen von $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ und $\sim 1530\text{ cm}^{-1}$ deuten auf hauptsächlich aggregierte β -Faltblattstrukturen hin. Das Differenzspektrum zeigte, dass aber auch andere Strukturelemente wie α -Helices vorhanden sind (Abb. 4.17). Die Insertion des Signalpeptides machte sich auch in der Veränderung der lipidspezifischen Banden bemerkbar. So nahmen die Intensitäten der Methyl-, Methylen- und Carboxystreckschwingungsbanden ($\sim 2960\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$ sowie $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ und $\sim 1735\text{ cm}^{-1}$) ab.

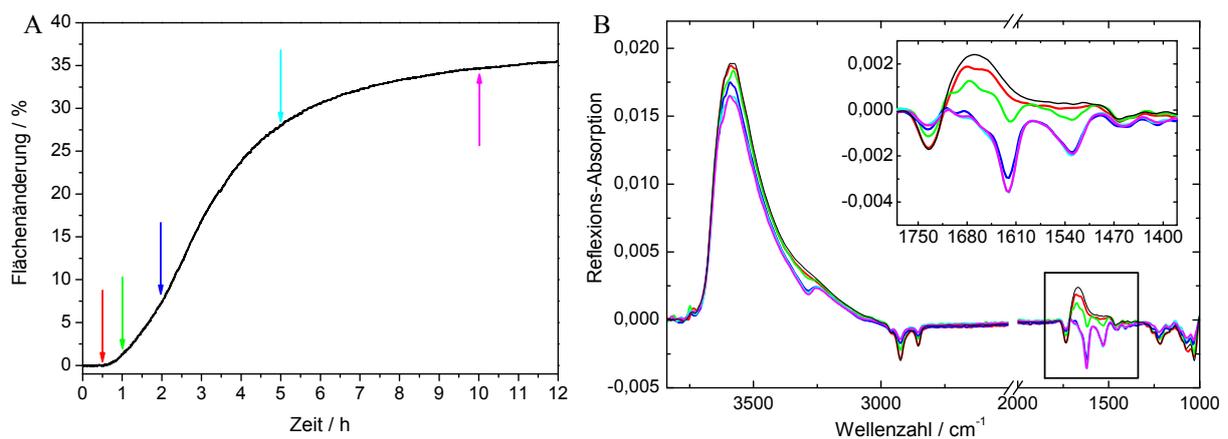


Abb. 4.16: Wiederholung Adsorption des Signalpeptides (100 nM) an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) bei $\pi = 20\text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Um die drei mit der Monoschicht des polaren *E. coli* Extraktes interagierenden Komponenten - HiPIP, preHiPIP und das Signalpeptid - untereinander zu vergleichen und deutlichere Informationen über deren Sekundärstruktur zu gewinnen, ist es hier sinnvoll Differenzspektren zu berechnen.

In Abb. 4.17 sind die Unterschiede der Adsorptionsintensität im Amid I und II Bereich und damit der Sekundärstruktur zu erkennen. Da HiPIP nicht mit der Lipidschicht interagiert, sind im Differenzspektrum keine Banden zu erkennen (Rot). Für preHiPIP lässt sich eine

α -helikale Sekundärstruktur ablesen (Grün). Die Amid I und II Banden sind sehr intensitätsschwach aber die Minima liegen eindeutig bei 1657 cm^{-1} und 1545 cm^{-1} . Das Differenzspektrum des Signalpeptides zeigt, dass die Struktur neben β -Faltblattstrukturen (Amid I bei $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$, Amid II bei $\sim 1530\text{ cm}^{-1}$) auch α -helikale Anteile beinhaltet ($\sim 1655\text{ cm}^{-1}$). Das Peptid ist also nicht komplett entfaltet.

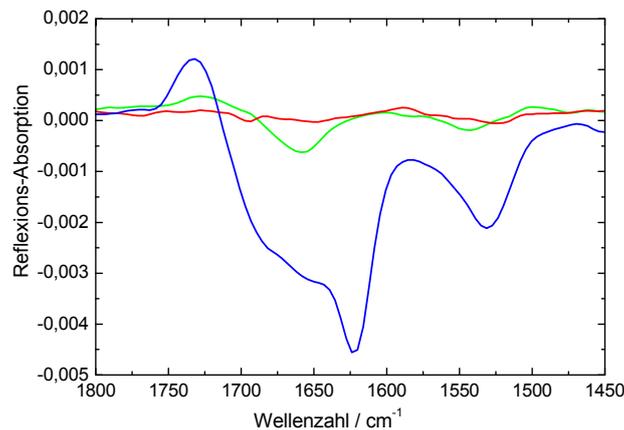


Abb. 4.17: Detailausschnitt des Amidbandenbereiches der Differenzspektren der adsorbierten Proteine und des Peptides an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) bei $\pi = 20\text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0), bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rot: HiPIP; Grün: preHiPIP; Blau: Signalpeptid.

Es wurde gezeigt, dass die untersuchten Proteine HiPIP und preHiPIP und das Peptid unterschiedlich stark mit Lipidmonoschichten interagieren. Das reine HiPIP interagiert nicht mit dem polaren *E. coli*-Lipidgemisch.

Für preHiPIP wurden mit unterschiedlichen Proteinchargen verschiedene Ergebnisse erzielt. Da die Resultate der ersten Charge stark schwanken (Abb. 4.11), ist anzunehmen, dass die Proteinlösung Verunreinigungen enthielt. Die Ergebnisse der Messungen mit der zweiten Proteincharge zeigten deutliche Wechselwirkungen mit den Lipiden der Monoschicht. Da das reine HiPIP nicht mit Lipiden interagiert, muss das gekoppelte Signalpeptides im Protein für diese Interaktion ursächlich sein. Über die Sekundärstruktur des mit den Lipiden interagierenden Proteins lassen sich nur über die berechneten Differenzspektren Aussagen treffen. Das Protein schien hauptsächlich α -helikal strukturiert zu sein. Im Vergleich zum adsorbierten Protein an der Luft/Wasser-Grenzfläche war der α -helikale Strukturanteil deutlich erhöht. Möglicherweise bildet das Signalpeptid in Interaktion mit den Lipiden die zusätzlichen α -Helices.

Auch in den Experimenten mit dem Signalpeptid kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen. Für die Wiederholungsmessung wurde eine neue Peptidlösung aus dem gefriergetrockneten

Stammvorrat hergestellt. Alle anderen Komponenten (Puffer und Lipidlösung) waren unverändert. Möglicherweise sind in der ersten IRRA-Spektroskopiemessung mit der Peptidlösung Verunreinigungen in den Trog gelangt, die die eigentümliche Adsorptionsisotherme und IRRA-Spektren verursacht haben. Die Ergebnisse der Filmwaagemessungen und der Wiederholungsmessung mittels IRRA-Spektroskopie zeigten die Interaktion mit den Lipiden und dass das Signalpeptid zum Großteil an der Grenzfläche in aggregierten β -Faltblättern vorlag.

4.3.2 Zeitabhängige Adsorption der Proteine und des Peptides an *E. coli* PG

Mittels Filmwaagetchnik und IRRA-Spektroskopie konnte unterschiedliches Wechselwirkungsverhalten der verschiedenen Substrate an Monoschichten des polaren *E. coli* Lipidextrakt festgestellt werden. Um zu verifizieren ob negativ geladene Lipidkomponenten durch elektrostatische Wechselwirkungen der Grund für die Interaktionen sind, wurden Vergleichsmessungen an PG-Monoschichten durchgeführt. Es wurde untersucht, ob und wie eine stärker negativ geladene Lipidschicht die Wechselwirkung mit den Proteinen bzw. des Peptides beeinflusst.

4.3.2.1 Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstanter Fläche

Adsorption von preHiPIP an E.coli-PG Monoschichten

Die Adsorption des Precursor-Proteins preHiPIP an die stark negativ geladene Lipidmonoschicht bei den unterschiedlichen Ausgangsdrücken von 10, 20 bzw. 30 mN m^{-1} war stärker als die Wechselwirkung an das polare *E. coli* Gemisch (vgl. Abb. 4.12 und Abb. 4.18).

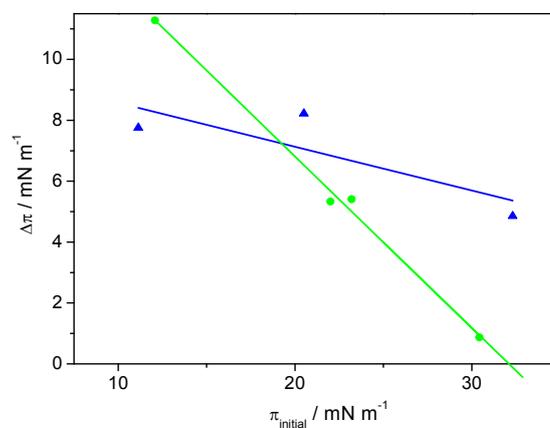


Abb. 4.18: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes an *E. coli* PG durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion des Proteins bzw. des Peptides, auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0), bei 20 °C. Grün: preHiPIP; Blau: Signalpeptid.

Selbst bei einem hohen lateralen Initialdruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ wurde nach der Proteinzugabe ein deutlicher Druckanstieg beobachtet. Insgesamt wurde eine etwa doppelt so starke Wechselwirkung festgestellt. Durch diese erhöhte Adsorptionsstärke ergab sich ein höherer maximaler Einbaudruck von $\sim 32 \text{ mN m}^{-1}$. Ein Wert von über 30 mN m^{-1} spricht für das spontane Insertionsvermögen des Proteins in Membranen. In eine stark negativ geladene Membran könnte sich das mit dem Signalpeptid versehene HiPIP wahrscheinlich einbauen.

Adsorption des Signalpeptides an E.coli-PG Monoschichten

Bei einem geringem Ausgangsdruck der negativ geladenen PG-Monoschicht von $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ ließ sich kein eindeutiger Unterschied zu den Messungen an das polare *E. coli* Lipidgemisch feststellen. Die Druckänderungen waren sehr ähnlich. Wurde ein höherer Initialdruck vorgelegt, zeigte sich eine stärkere Affinität. Bei einem Startdruck von 20 mN m^{-1} ist die maximale Druckänderung mehr als doppelt so groß als es an das polare Lipidgemisch beobachtet wurde. Bei dem hohen Ausgangsdruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ ist der Unterschied noch deutlicher. Der maximale Einbaudruck lag deutlich über dem kritischen Wert von 30 mN m^{-1} (Abb. 4.18) und zeigt damit die Fähigkeit des Signalpeptides in Membranen zu insertieren.

4.3.2.2 Zeitabhängige Adsorption bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

Nach der Zugabe der Protein/Peptidlösung in die Subphase unter eine Lipidmonoschicht mit einem lateralen Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} , wurden die zeitabhängige Flächenänderung und die Änderungen der IRRA-Spektren beobachtet.

Adsorption von HiPIP an E.coli-PG Monoschichten

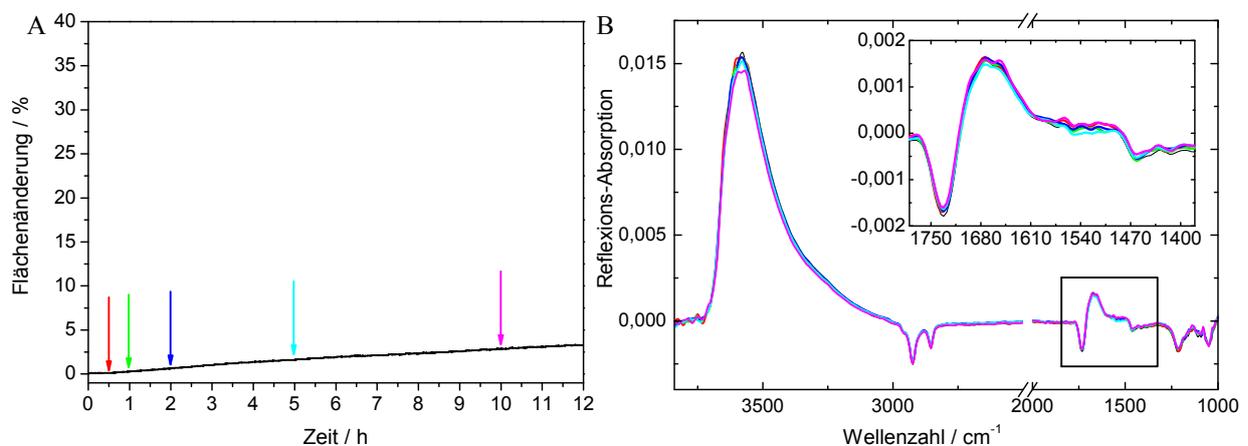


Abb. 4.19: Adsorption von HiPIP (100 nM) an *E. coli* PG bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20°C . A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Nach einer Inkubationszeit von ~ 1 h nach der Zugabe von HiPIP zeigte sich eine langsame Zunahme der Fläche ohne dass proteinspezifische Banden sichtbar wurden (Abb. 4.19). Dies spricht für eine äußerst geringe Adsorption der Proteinmoleküle an die negativ geladenen Lipidmonoschicht.

Adsorption von preHiPIP an *E.coli*-PG Monoschichten

Die Adsorptionsmessungen der Vorversuche zeigten, dass es deutliche Unterschiede in der Interaktion zwischen preHiPIP und dem polaren *E. coli*-Lipidgemisch bzw. *E. coli* PG gibt. Mit Hilfe der IRRA-Spektroskopie kann zusätzlich untersucht werden, ob diese Unterschiede auch Konformations- und oder Orientierungsänderungen der Proteinmoleküle betreffen.

Die Adsorptionsisotherme zeigte nach der Proteininjektion zunächst nur einen geringen Anstieg der Fläche pro Lipidmolekül. Erst nach einer Inkubationszeit von ~ 2 h vergrößerte sich die Molekülfläche deutlich stärker (Abb. 4.20 A).

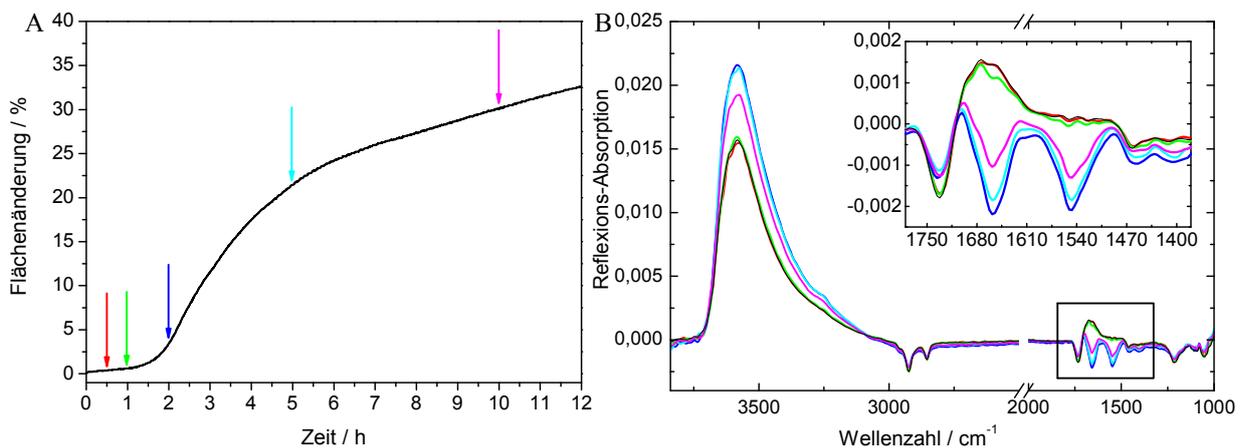


Abb. 4.20: Adsorption von preHiPIP (100 nM) an *E. coli* PG bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20°C . A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

In den IRRA-Spektren (Abb. 4.20 B) wurden zunächst keine Änderungen gegenüber dem reinem Lipidspektrum beobachtet. Im weiteren Adsorptionsverlauf nahm die Schichtdicke der Monoschicht durch die An- bzw. Einlagerung des preHiPIP zu, was sich in einer Intensitätserhöhung der OH-Streckschwingungsande ($\nu(\text{OH})$ bei $\sim 3585 \text{ cm}^{-1}$) widerspiegelt. Auch proteinspezifische Banden wurden detektiert. Die Amid I und II Banden wiesen intensitätsschwache aber sehr definierte Bandenformen auf. Die Positionen beider Banden (1657 cm^{-1} und 1547 cm^{-1}) zeigten deutlich eine hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur. Bemerkenswert war die Fluktuation der Intensitäten der beschriebenen Banden. Sowohl die OH-Bande als auch die Amidbanden nahmen im späten Adsorptionsverlauf ab. Eine

Umorientierung der Proteinstrukturen ist unwahrscheinlich, da die Bandenpositionen und –formen erhalten blieben. Es ist anzunehmen, dass die adsorbierten Moleküle nicht homogen in der Monoschicht verteilt waren. Durch die Mobilität innerhalb der Monoschicht können proteinreiche und proteinarme Bereiche zu unterschiedlichen Zeiten der Spektrenaufnahme im Focus liegen.

Durch eine zweite Injektion, und der damit verbundenen Erhöhung der Proteinkonzentration in der Subphase, erhöhten sich auch die Intensitäten der oben beschriebenen Banden (nicht gezeigt). Auch hier fluktuieren die Intensitäten der Amidbanden im Messverlauf.

Adsorption des Signalpeptides an E.coli-PG Monoschichten

In den Vorversuchen wurde eine starke Adsorption des Signalpeptides an die *E. coli* PG-Monoschicht beobachtet.

Die Adsorptionsisotherme in der mit IRRA-Spektroskopie gekoppelten Messung zeigte ein außerordentliches Verhalten. Nach der Injektion der Peptidlösung wurden zunächst keine Änderungen der Fläche pro Lipidmolekül beobachtet. Nach einer Inkubationszeit von ~30 min kam es zu einem stufenartigen Flächenanstieg bis zu einer maximalen Zunahme von ~35%. Nach einer Inkubationszeit von ~8 h erfolgte dann eine erhebliche, kontinuierliche Abnahme der Fläche (Abb. 4.21 A).

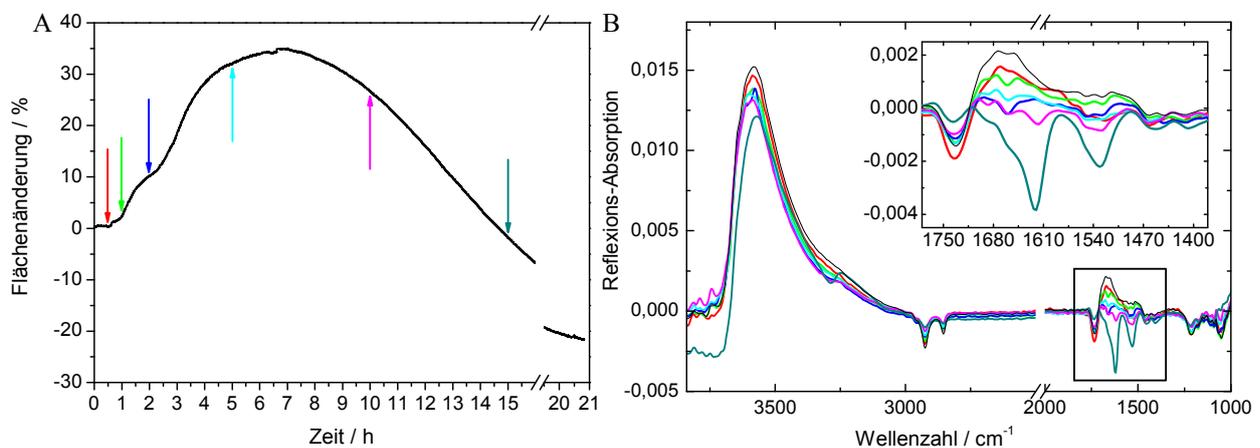


Abb. 4.21: Adsorption des Signalpeptides (100 nM) an *E. coli* PG bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die IRRA-Spektren zu Beginn der Adsorptionsmessung (bis 5 h) zeigten geringe Änderungen im Vergleich zum reinen Lipidspektrum. Die Schichtdicke nahm leicht ab. Die Bandenform der Amid I Bande lässt vermuten, dass das Signalpeptid zunächst in α -helikaler Form vorlag und im weiteren Adsorptionsprozess eine Umformung zu β -Faltblattstrukturen erfolgte.

Obwohl die peptidspezifischen Banden so intensitätsschwach waren, was auf eine geringe Interaktion schließen lässt, wurden deutliche Änderungen der lipidspezifischen Banden beobachtet. Die Intensitäten der Methylenstretschwingungsbanden ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ bei 2925 cm^{-1} und $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ bei 2855 cm^{-1}) nahmen während des Adsorptionsprozesses ab. Das spricht für einen starken Einbau des Peptides in die Monoschicht. Während sich die Fläche stark verkleinerte, wurden stärkere Änderungen in den Spektren beobachtet. Die Amid A Bande erschien ($\sim 3290\text{ cm}^{-1}$) und die Intensitäten der Amid I und II Banden nahmen zu. Die Amid I Bande bei 1621 cm^{-1} lässt auf eine aggregierte β -Faltblattstruktur schließen. Mit einer verstärkten Adsorption des Peptides an die Monoschicht kann die Flächenabnahme nicht erklärt werden. Bemerkenswert ist, dass die lipidspezifischen Banden fast vollständig verschwanden. Ungewöhnlich ist auch die Entwicklung der OH-Stretschwingungsbande. Das Absinken der Basislinie vor der Bande, ist wahrscheinlich ausschlaggebend für deren Verschiebung von $\sim 3590\text{ cm}^{-1}$ zu $\sim 3570\text{ cm}^{-1}$. Welche anderen Auswirkungen diese Basislinienverschiebung auf das Spektrum hat oder wodurch diese Verschiebung hervorgerufen wurde, ist nicht bekannt.

Ein ähnlicher Adsorptionsverlauf wurde auch für die Interaktion des Signalpeptides an das polare *E. coli* Lipidgemisch beobachtet (Kap. 4.3.1.2). Eine Wiederholungsmessung mit neu präparierter Peptidlösung zeigte, dass es sich wahrscheinlich um einen Artefakt handelte, der möglicherweise durch Fehler bei der experimentellen Durchführung bzw. durch Verunreinigungen verursacht wurde. Um zu prüfen, ob es sich in der oben beschriebenen Messung ebenfalls um einen Artefakt handelt, wurde auch hier eine Wiederholungsmessung durchgeführt.

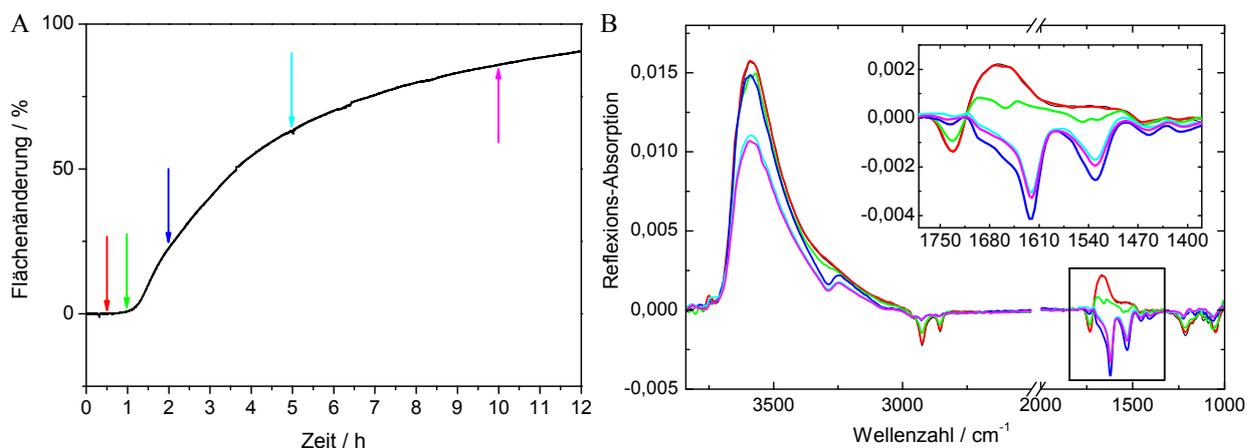


Abb. 4.22: Wiederholung Adsorption des Signalpeptides (100 nM) an *E. coli* PG bei $\pi = 20\text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Auch in diesem Fall zeigte die Wiederholungsmessung einen anderen Verlauf der Adsorption (vgl. Abb. 4.21 und Abb. 4.22). Etwa 1 h nach der Peptidinjektion begann die Fläche pro Lipidmolekül zu steigen. Ein Gleichgewicht wurde erst nach einer zwanzigstündigen Inkubationszeit erreicht. Die Flächenänderung betrug dann $\sim 100\%$.

Die entsprechenden IRRA-Spektren zeigten die Abnahme der Schichtdicke ~ 5 h nach der Injektion, was in der Intensitätsabnahme der OH-Streckschwingungsbande zu verfolgen und auf die Insertion des Peptides in die Monoschicht zu erklären ist. Die Entstehung der peptidspezifischen Banden, wie Amid A, Amid I und II, zeigten ebenfalls die Insertion des Signalpeptides in die Monoschicht. Zunächst zeigten Bandenlage und -form der Amid I und II Banden, dass das Peptid überwiegend α -helikal strukturiert ist und nur in geringerem Maße β -Faltblattstrukturen aufweist (Amid I 1657 cm^{-1} , Amid II 1549 cm^{-1} und 1525 cm^{-1}). Im weiteren Adsorptionsverlauf formten sich die Peptidstrukturen zu aggregierten β -Faltblättern um (1621 cm^{-1}). Auffällig bei der Beobachtung der Amid I und II Banden war die Fluktuation der Intensitäten während des Messverlaufes. Durch die Adsorption des Peptides wurden auch die lipidspezifischen Banden beeinflusst ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ bei $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ bei $\sim 2855\text{ cm}^{-1}$ und $\nu(\text{C}=\text{O})$ bei $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$). Diese verschwanden fast vollständig. Wahrscheinlich erfolgt die Adsorption des Proteins nicht homogen, was ebenfalls zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Lipidmoleküle führt. Durch die Mobilität des Films auf der Subphase gelangten diese unterschiedlich zusammengesetzten Bereiche in den Fokus des IR-Strahlenganges und verursachten so die gezeigte Spektrenabfolge.

In Differenzspektren sind die Unterschiede der Sekundärstrukturen der einzelnen Proteine bzw. des Peptides in Interaktion mit Lipiden deutlicher zu erkennen. In Abb. 4.23 sind Differenzspektren der nach fünfstündiger Inkubationszeit aufgenommenen Adsorptionsspektren der jeweiligen Substrate miteinander verglichen.

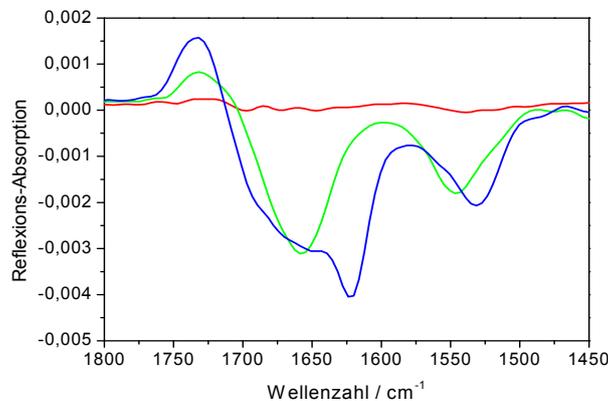


Abb. 4.23: Detailausschnitt des Amidbandenbereiches der Differenzspektren der adsorbierten Proteine und des Peptides an *E. coli* PG bei $\pi = 20\text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0), bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rot: HiPIP; Grün: preHiPIP; Blau: Signalpeptid.

Deutlich zeigt sich, dass das reine Protein HiPIP nicht mit den negativ geladenen Lipiden interagiert (Rot). Nach der Zugabe des preHiPIP dagegen bildeten sich deutliche Amidbanden, die auf eine hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur hindeuten (Amid I bei $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$, Amid II bei $\sim 1546\text{ cm}^{-1}$, Grün). Während der Interaktion des Signalpeptides mit der Monoschicht aggregierte ein Großteil der Struktur zu β -Faltblättern (Amid I bei $\sim 1622\text{ cm}^{-1}$, Blau). Dennoch waren auch α -helikale und andere Anteile, wie z.B. β -Turns, enthalten, was die sehr breite Schulter der Amid I Bande zeigt.

Auch mit der stark negativ geladenen *E. coli* PG-Monoschicht interagiert HiPIP nicht.

Im Gegensatz dazu wurde eine deutlich stärkere Adsorption von preHiPIP an die PG Lipide beobachtet als an den polaren *E. coli* Extrakt. Es wurde ermittelt, dass sich sowohl preHiPIP als auch das Signalpeptid spontan in solche negativ geladenen Membranen einbauen können sollten, wohingegen der Einbau in eine gemischte *E. coli* Membran nur in geringem Umfang stattfinden dürfte. Die IRRA-spektroskopischen Messungen zeigen eine hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur und bestätigen damit die vermutete Struktur des Proteins in Interaktion mit Lipiden (vgl. Abb. 4.17 und Abb. 4.23).

Für die artifizielle erste IRRA-spektroskopische Messung mit dem Signalpeptid ist wahrscheinlich die schon beschriebene „alte“, vermutlich verunreinigte Peptidstammlösung verantwortlich. In der Wiederholungsmessung und auch in den reinen Filmwaagemessungen wurde eine stärkere Adsorption an *E. coli* PG beobachtet als an das Gemisch. Die Sekundärstruktur wird aber dadurch nicht beeinflusst.

4.4 Untersuchung des Adsorptionsverhaltens eines speziellen preHiPIP-Konstruktes an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten

Um detaillierte Studie über das Adsorptionsverhalten eines potentiellen Tat-Substrates zu erstellen, wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Die Gewinnung des Signalpeptides stellte sich als besonders problematisch heraus. Es wurde versucht das Signalpeptid durch gezielte Abspaltung vom Precursor-Protein preHiPIP zu gewinnen. Dafür wurde ein spezielles Konstrukt mit einer Thrombinschnittstelle zwischen HiPIP und dem Signalpeptid entwickelt. Dieses neue Protein wurde charakterisiert und auf sein Adsorptionsverhalten mit Lipidmonoschichten untersucht um Unterschiede zum „normalen“ preHiPIP festzustellen.

4.4.1 Adsorption und IRRA-spektroskopische Analyse des Proteinfilms des preHiPIP mit Thrombinschnittstelle an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Nach der Injektion des Proteins stieg der Oberflächendruck im betrachteten Zeitraum auf $\sim 14 \text{ mN m}^{-1}$ (Abb. 4.24 A). Die Bildung eines Oberflächenfilms zeigte sich durch die Entstehung der OH-Streckschwingungsbande ($\nu(\text{OH})$ bei $\sim 3590 \text{ cm}^{-1}$). Die IRRA-Spektren zeigten von Beginn an außerdem deutliche proteinspezifische Banden (Abb. 4.24 B) wie die Amid A Bande ($\sim 3285 \text{ cm}^{-1}$), sowie Amid I und II Banden. Die asymmetrische Amid I Bande deutet auf eine Sekundärstruktur hin, die sowohl α -helikale als auch β -Faltblattstrukturen beinhaltet (1657 cm^{-1} und 1628 cm^{-1}). Die Bandenlage der Amid II Bande unterstützt diese Interpretation (1540 cm^{-1}).

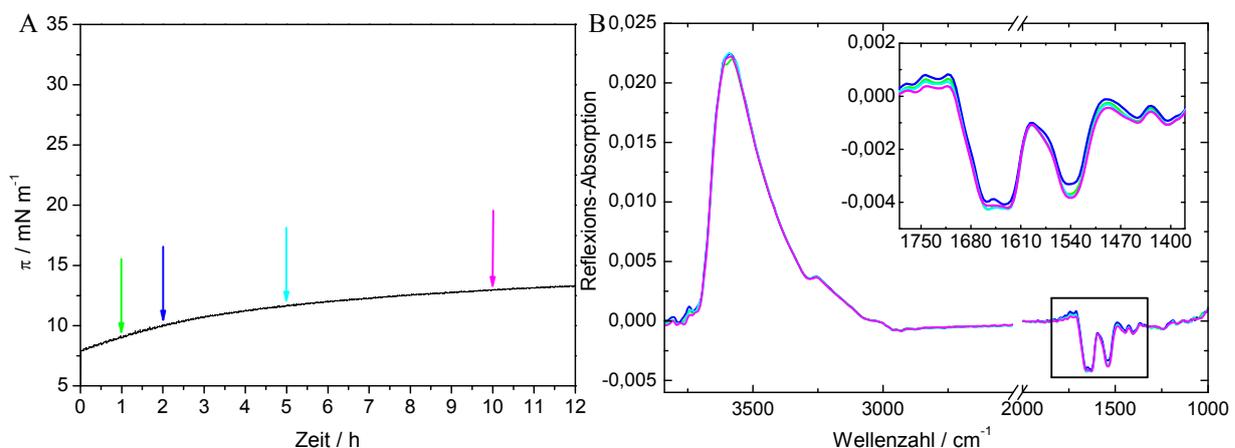


Abb. 4.24: Oberflächenaktivität von preHiPIP mit Thrombinschnittstelle (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

4.4.2 Adsorption von preHiPIP mit Thrombinschnittstelle an Lipidmonoschichten

4.4.2.1 Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption bei konstanter Fläche

Das Adsorptionsverhalten des preHiPIP mit der Thrombinschnittstelle wurde an Monoschichten bestehend aus dem polaren *E. coli* Extrakt und an *E. coli* PG Monoschichten mit unterschiedlichen Initialdrücken untersucht. Dabei wurde die zeitabhängige Änderung des Oberflächendruckes nach der Injektion der Proteinlösung beobachtet.

Die Wechselwirkungen des Proteins mit dem polaren Lipidgemisch waren im Allgemeinen gering. Je höher der Ausgangsdruck, desto schwächer und langsamer erfolgte die Druckzunahme (Abb. 4.25 A, Schwarz). Ist die Monoschicht stärker negativ geladen, wurde in den Messungen mit niedrigen Ausgangsdrücken (10 bzw. 20 mN m^{-1}) vor allem kurz nach der Injektion stärkere Adsorption detektiert. Allerdings sanken die Oberflächendrücke schon kurz nach dem Erreichen des maximalen Anstieges wieder. Bei einem Ausgangsdruck von $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$ wurde eine schwächere Adsorption an die negativ geladene Monoschicht beobachtet als an das polare Lipidgemisch (Abb. 4.25 A, Rot).

Die Interaktion zwischen Protein und den Lipiden ist im Allgemeinen schwach. Die Auftragung der $\Delta\pi$ -Werte gegen die Initialdrücke der entsprechenden Messungen zeigte dennoch, dass die spontane Insertion in eine *E. coli* Membran bzw. in eine stärker negativ geladene Membran in geringem Maße möglich sein sollte (Abb. 4.25 B).

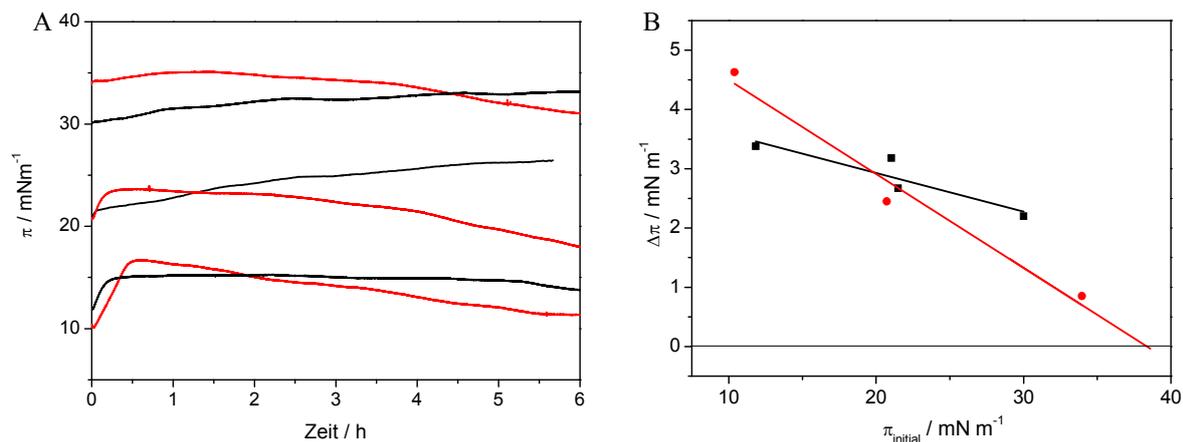


Abb. 4.25: A: Zeitabhängige Druckänderung nach der Injektion von preHiPIP mit Thrombinschnittstelle (100 nM) an Lipidmonoschichten bei unterschiedlichen Ausgangsdrücken auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. B: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion des Proteins, Schwarz: an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67:23:10 mol-%); Rot: an *E. coli* PG.

4.4.2.2 Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption an Monoschichten des polaren *E.coli*-Extraktes bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

Auch mit IRRA-spektroskopischen Untersuchungen zeigte sich die schwache Interaktion von preHiPIP mit der Thrombinschnittstelle mit den polaren *E. coli*-Lipiden. Die Flächenänderung pro Lipidmolekül betrug nur $\sim 3\%$ (Abb. 4.26 A).

In den simultan aufgenommenen Spektren wurden ebenfalls nur sehr kleine Änderungen beobachtet (Abb. 4.26 B). Die Intensität der OH-Streckschwingungsbande ($\nu(\text{OH})$ bei $\sim 3585\text{ cm}^{-1}$) nahm zunächst zu, im späteren Adsorptionsverlauf wieder ab. Die Änderungen im Amid I und II Bereich waren zu gering als das sie für die Abschätzung von Sekundärstrukturelementen herangezogen werden konnten. Außerdem zeigten sich auch hier Schwankungen der Intensität. Da die Interaktion im Allgemeinen sehr gering war, könnten die Schwankungen im Bereich des Fehlers liegen.

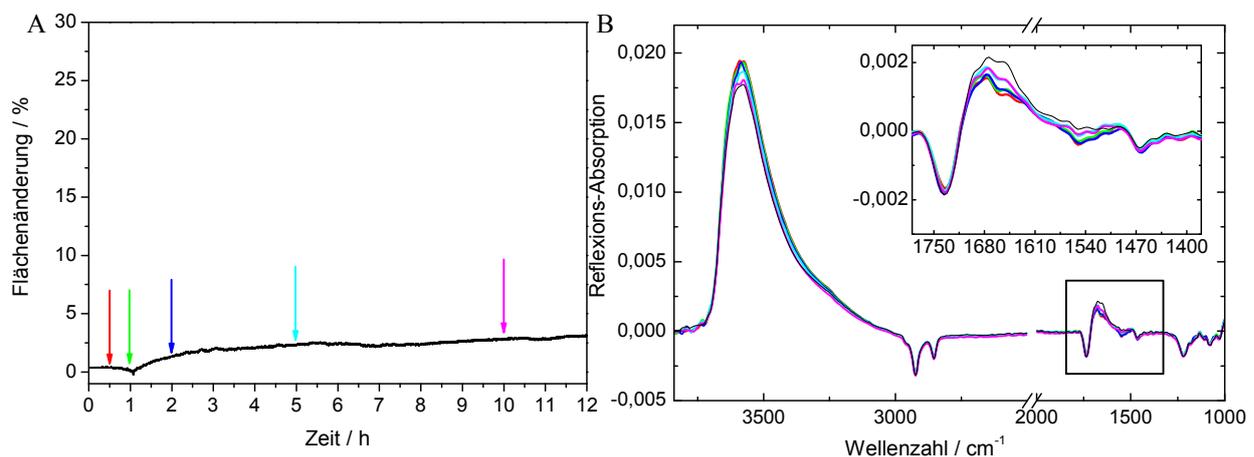


Abb. 4.26: Adsorption von preHiPIP mit Thrombinschnittstelle (100 nM) an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) bei $\pi = 20\text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

4.4.2.3 Untersuchung der zeitabhängigen Adsorption an *E.coli*-PG Monoschichten bei konstantem Druck: IRRA-Spektroskopie

Die Vorversuche zeigten, dass preHiPIP mit der Thrombinschnittstelle auch mit der stark negativ geladenen *E. coli* PG-Monoschicht interagiert.

In der mit IRRA-Spektroskopie gekoppelten Adsorptionsmessung an eine PG-Monoschicht zeigte sich $\sim 1\text{ h}$ nach der Injektion des Proteins eine stärkere Flächenzunahme (Abb. 4.27 A) als in der Messung mit dem polaren *E. coli* Lipidgemisch. Nach Erreichen des Gleichgewichts betrug die Änderung $\sim 26\%$.

Im Adsorptionsverlauf nahm die Schichtdicke des Oberflächenfilms zu, was die Intensitätszunahme der $\nu(\text{OH})$ Bande ($\sim 3585 \text{ cm}^{-1}$) und damit die Insertion der Proteine in die Monoschicht anzeigt. Im Bereich der Amidbanden entwickelten sich die charakteristischen aber intensitätsschwachen Amid I und II Banden, dessen Lage und Form eine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur anzeigen (1657 cm^{-1} und 1545 cm^{-1}). Die Insertion des Proteins in die Lipidmonoschicht zeigte sich ebenfalls durch die Intensitätsabnahme lipidspezifischer Banden ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ bei $\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ bei $\sim 2855 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu(\text{C}=\text{O})$ bei $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$).

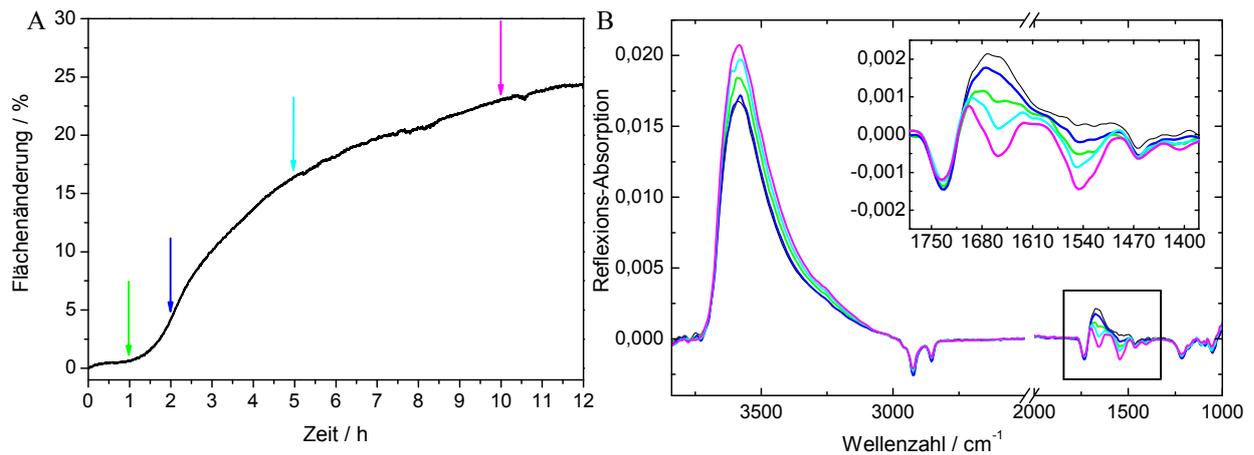


Abb. 4.27: Adsorption von preHiPIP mit Thrombinschnittstelle (100 nM) an *E. coli* PG bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B. B: Reflexions-Absorptions-Spektren, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Im Vergleich zu preHiPIP zeigte das Protein mit der Thrombinschnittstelle eine stärkere Adsorption an die Luft/Wasser-Grenzfläche. Die IRRA-Spektren zeigten außerdem, dass es zu einer schnelleren Ausbildung des Proteinfilms kam und dass der α -helikale Sekundärstrukturanteil erhöht war. Die Veränderung in der Peptidsequenz scheint katalysierend auf die Oberflächenaktivität zu wirken und außerdem die Ausbildung einer stärkeren α -helikalen Struktur des Peptides zu begünstigen. Adsorptionsmessungen an Lipidmonoschichten zeigten, dass preHiPIP mit der Thrombinschnittstelle mit Lipiden interagiert, wobei eine stärker negativ geladene Monoschicht bevorzugt wurde. Im Vergleich zum „normalen“ preHiPIP waren die Adsorptionen jeweils schwächer. Die Sekundärstrukturen beider mit *E. coli* PG interagierenden Proteine schienen allerdings ähnlich. Für die Interaktion mit Lipiden wirkte die Veränderung der Peptidsequenz leicht hemmend, beeinflusste aber die Sekundärstruktur wahrscheinlich nicht.

4.5 Untersuchung des Adsorptionsverhaltens des Tat-Substrates YcdB an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Lipidmonoschichten

Neben den Arbeiten mit dem Modellsubstrat HiPIP wurde ein für *E. coli* physiologisches Tat-Substrat -YcdB- physikalisch-chemisch untersucht und seine Interaktionsfähigkeit mit Lipiden studiert. YcdB ist ein periplasmatisches, Co-Faktor tragendes Protein (Kap. 1.4.2). Messungen wurden mit YcdB mit bzw. ohne dessen Co-Faktor, sowie dem Co-Faktor allein durchgeführt.

4.5.1 Adsorption und IRRA-spektroskopische Analyse der Proteinfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche

4.5.1.1 Filmwaagemessungen

Oberflächenaktivitätsmessungen zeigten, dass der ungebundene Co-Faktor nicht oberflächenaktiv ist. Dagegen bildeten die beiden Proteine kurz nach der Injektion einen Proteinfilm an der Luft/Wasser-Grenzfläche aus. Der entstehende Film aus YcdB ohne Co-Faktor erreichte einen lateralen Druck von $\sim 15 \text{ mN m}^{-1}$, der aus YcdB mit Co-Faktor erreichte einen höheren Oberflächendruck von $\sim 17 \text{ mN m}^{-1}$ (nicht gezeigt).

4.5.1.2 IRRA-Spektroskopie

Die Adsorptionsisotherme, die während der IRRA-spektroskopischen Messungen aufgenommen wurde, zeigte einen sprunghaften Druckanstieg nach der Injektion von YcdB (Abb. 4.28 A, Rot). Danach blieb der Oberflächendruck zunächst konstant. Nach etwa einstündiger Inkubationszeit kam es erneut zu einem deutlichen Druckanstieg. Erst nach über 10 h stellte sich ein Gleichgewicht bei $\sim 16 \text{ mN m}^{-1}$ ein.

In den Spektren zeigte sich durch das Auftreten proteinspezifischer Banden die Ausbildung eines Proteinfilms an der Luft/Wasser-Grenzfläche (Abb. 4.28 B). Neben der Amid A Bande ($\sim 3290 \text{ cm}^{-1}$) geben vor allem die Amid I und II Banden Auskunft über die Strukturelemente des Proteins. Die Bandenformen veränderten sich ständig, was auf Umorientierungsprozesse während des Adsorptionsvorganges hindeutet. Nach einer Inkubationszeit von $\sim 10 \text{ h}$ änderten sich die Spektren nicht mehr. Weder die OH-Streckschwingungsbande ($\sim 3590 \text{ cm}^{-1}$) nahm weiter zu, noch veränderten sich die Formen der proteinspezifischen Banden. Das an der Luft/Wasser-Grenzfläche adsorbierte Protein wies hauptsächlich α -helikale (1659 cm^{-1}) aber auch β -Faltblattstrukturen (1633 cm^{-1}) auf.

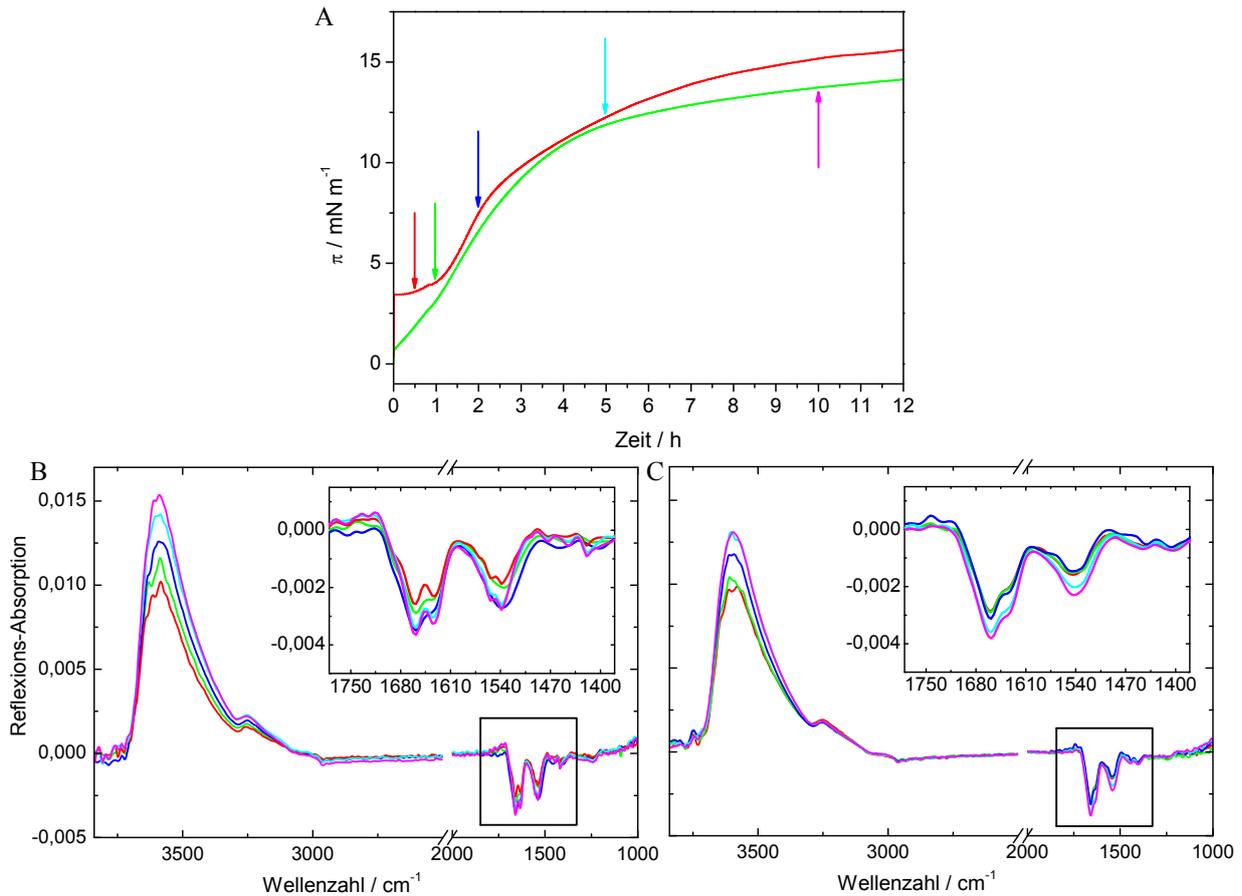


Abb. 4.28: Oberflächenaktivität der YcdB-Proteine (100 nM) an der Luft/Wasser-Grenzfläche auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Druckänderung nach Proteininjektion (Zeit = 0 h), Rot: YcdB, Grün: YcdB mit CoFaktor, Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in B und C; B: Reflexions-Absorptions-Spektren des YcdB; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches; C: Reflexions-Absorptions-Spektren des YcdB mit CoFaktor; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Nach der Injektion des YcdB mit dem gebundenen Co-Faktor erfolgte ebenfalls ein sofortiger aber geringer Druckanstieg (Abb. 4.28 A, Grün). Der laterale Oberflächendruck des sich bildenden Proteinfilms betrug im Gleichgewicht $\sim 14 \text{ mN m}^{-1}$ und liegt damit unter dem im Vorversuch beobachteten Wert.

Die während der Adsorption aufgenommenen Spektren in Abb. 4.28 C weisen, im Vergleich zu YcdB ohne Co-Faktor, auf ein stärker durch α -helikale Strukturen geprägtes Protein. Die Amid I Bande zeigte sich als asymmetrische Bande mit einem Minimum bei 1660 cm^{-1} und einer Schulter bei 1636 cm^{-1} . Ein weiterer Unterschied war die geringere Schichtdicke des Proteinfilms, was durch die geringere Intensität der $\nu(\text{OH})$ Bande zu erkennen ist. Offensichtlich beeinflusst der Co-Faktor die Konformation und/oder die Orientierung des Proteins an der Luft/Wasser-Grenzfläche.

4.5.2 Adsorption der YcdB-Proteine und des Co-Faktors an Lipidmonoschichten

4.5.2.1 Filmwaagemessungen

Beide Proteinvarianten und der Co-Faktor wurden auf ihr Adsorptionsverhalten an unterschiedliche Lipidmonoschichten untersucht.

Aus den Oberflächenaktivitätsmessungen ist bekannt, dass der Co-Faktor nicht oberflächenaktiv ist. Auch mit Lipiden interagiert das Molekül nicht (nicht gezeigt).

Die beiden Proteine dagegen zeigten deutliche Wechselwirkungen sowohl mit einem Lipidfilm aus polarem *E. coli* Extrakt als auch aus *E. coli* PG. YcdB wies im Allgemeinen eine stärkere Adsorption an Lipidmonoschichten vor allem bei niedrigen Filmdrücken auf. Die Interaktionsstärke beider Proteine im Vergleich zu den beiden verschiedenen Monoschichten war fast identisch (Abb. 4.29 A und B). Die zusätzliche negative Ladung des reinen *E. coli* PG Films scheint sich demnach nicht auf die Interaktion auszuwirken. Für YcdB wurde für die Interaktion an beide Lipidmonoschichten ein jeweils ähnlicher, maximaler Einbaudruck ($\sim 31 - 32 \text{ mN m}^{-1}$) bestimmt. Das Co-Faktor tragende YcdB wies für die Interaktion mit dem Lipidgemisch mit $\sim 34 \text{ mN m}^{-1}$ einen höheren maximalen Einbaudruck auf als für den reinen PG Film ($\sim 32 \text{ mN m}^{-1}$). Alle ermittelten Werte liegen über dem kritischen Wert von 30 mN m^{-1} und deuten damit auf die Fähigkeit beider Proteinvarianten hin, spontan in Membranen zu insertieren.

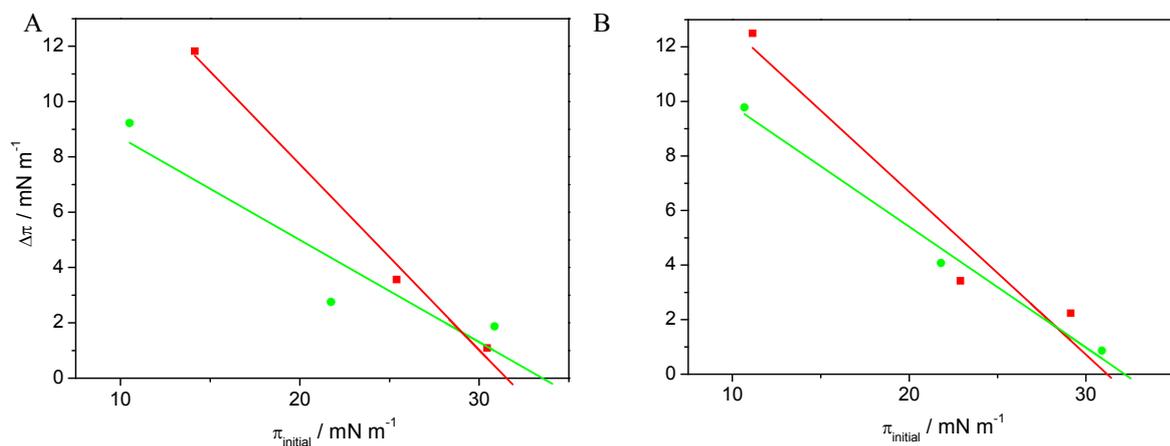


Abb. 4.29: Ermittlung des maximalen Einbaudruckes durch Extrapolation der $\Delta\pi$ -Werte 2 h nach der Injektion der YcdB-Proteine (100 nM) an Lipidmonoschichten auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0), bei 20 °C. A: an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%); B: an *E. coli* PG. Rot: YcdB, Grün: YcdB mit Co-Faktor.

4.5.2.2 IRRA-Spektroskopie

Die Vorversuche zeigten, dass die beiden Proteinvarianten (YcdB mit bzw. ohne Co-Faktor) mit Lipidmonoschichten interagieren. Außerdem scheint der Co-Faktor einen Einfluss auf die

Adsorptionsstärke zu haben. Um dies zu verifizieren und außerdem zu studieren, ob der Co-Faktor einen Einfluss auf die Sekundärstruktur hat, wurden IRRA-spektroskopische Messungen angefertigt.

Adsorption von YcdB an Lipidmonoschichten

Bei der Analyse der Interaktion des YcdB an einer Monoschicht des polaren *E. coli* Extraktes zeigte sich erst nach dreistündiger Inkubationszeit eine Veränderung der Fläche pro Lipidmolekül (Abb. 4.30 A). Dann nahm die Fläche kontinuierlich zu und erreichte in der betrachteten Zeitspanne kein Gleichgewicht. Die in den Spektren zu verfolgenden Änderungen durch die Insertion des Proteins in die Monoschicht waren sehr gering und lassen damit keine verlässlichen Vorhersagen auf die Sekundärstruktur zu (Abb. 4.30 B).

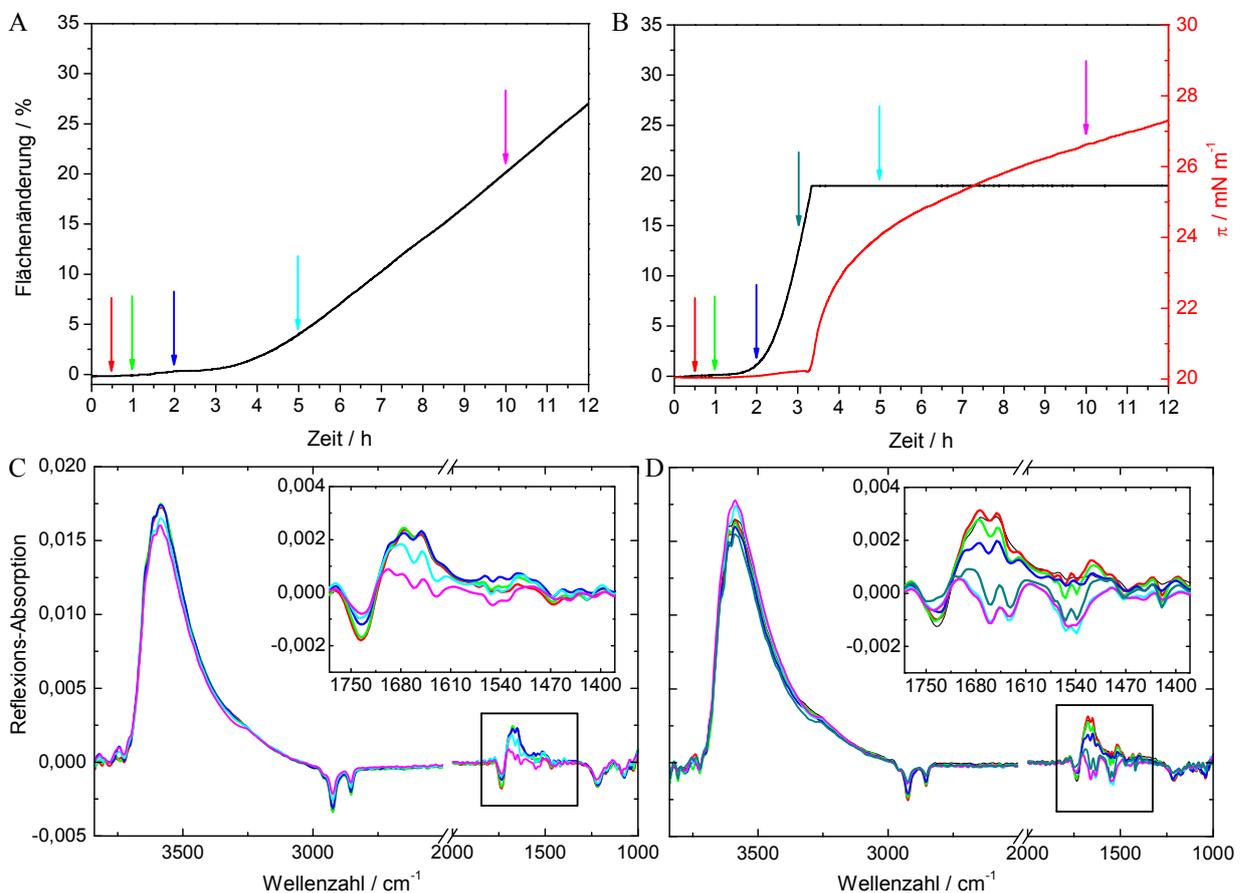


Abb. 4.30: Adsorption von YcdB (100 nM) an Lipidmonoschichten bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion zu dem polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in C; B: Zeitabhängige Druck- und Flächenänderung nach Proteininjektion zu *E. coli* PG (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in D; C: Reflexions-Absorptions-Spektren aus A, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches; D: Reflexions-Absorptions-Spektren aus B, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die deutliche Intensitätsabnahme der lipidspezifischen Banden wie der antisymmetrischen und symmetrischen Methylenstreckschwingungsbanden ($\nu_{as}(\text{CH}_2)$ bei $\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu_s(\text{CH}_2)$ bei $\sim 2855 \text{ cm}^{-1}$) und der Carboxystreckschwingungsbande ($\nu(\text{C}=\text{O})$ bei $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$) deuten eine heterogene Verteilung des adsorbierten Proteins in der Lipidmonoschicht an.

Die Adsorptionsmessung des YcdB an die stärker negativ geladene Monoschicht aus *E. coli* PG zeigte nach etwa zweistündiger Inkubationszeit einen schnellen Anstieg der Fläche pro Lipidmolekül (Abb. 4.30 C). Schon nach kurzer Zeit war die Expansionskapazität des Troges erschöpft. Durch den weiteren Einbau der Proteinmoleküle nahm nun der Oberflächendruck zu (Abb. 4.30 C). Erst nach einer sehr langen Inkubationszeit von über 50 h wurde ein Gleichgewicht bei einem lateralen Filmdruck von $\sim 32 \text{ mN m}^{-1}$ erreicht, was dem ermittelten, maximalen Einbaudruck dieses Proteins entspricht (vgl. Abb. 4.29 B). Die simultan aufgenommenen Spektren in Abb. 4.30 D zeigen etwas intensitätsintensivere, proteinspezifische Banden als in der Adsorptionsmessung mit dem polaren *E. coli* Lipidgemisch. Es wird deutlich, dass sowohl α -helikale ($\sim 1659 \text{ cm}^{-1}$) Strukturelemente als auch β -Faltblätter ($\sim 1633 \text{ cm}^{-1}$) in der Proteinstruktur enthalten sind.

Adsorption von YcdB mit Co-Faktor an Lipidmonoschichten

Die Messungen mit YcdB inklusive Co-Faktor zeigten sehr ähnliche Ergebnisse für die Interaktion an Monoschichten bestehend aus dem polarem *E. coli* Extrakt bzw. *E. coli* PG. In den Abb. 4.31 A und B sind die zeitabhängige Flächenänderung nach der Proteinzugabe zum polaren Lipidgemisch und die entsprechenden IRRA-Spektren zu sehen. Nach etwa zweistündiger Inkubationszeit begann die kontinuierliche Flächenzunahme pro Lipidmolekül durch die Insertion des Proteins in die Monoschicht. Während des betrachteten Zeitraumes wurde kein Gleichgewichtszustand erreicht. Im Amidbandenbereich deutete sich die Bildung der Amid I und II Banden an. Um detaillierte Informationen zur Sekundärstruktur gewinnen zu können waren die Intensitäten allerdings zu gering. Auffällig war, dass die lipidspezifischen Banden an Intensität abnahmen, was ebenfalls für den Einbau des Proteins in die Lipidmonoschicht spricht.

Die Adsorptionsstärke des YcdB mit Co-Faktor an den stärker negativ geladenen PG Film war etwas größer als in der Messung mit dem polaren *E. coli* Lipidgemisch, was in einer schnelleren Flächenzunahme abzulesen ist (Abb. 4.31 C). Durch den Einbau des Proteins wurde durch die Expansion des Films die maximal zur Verfügung stehende Fläche erreicht, was im Anschluss zu einer Erhöhung des lateralen Filmdruckes führte.

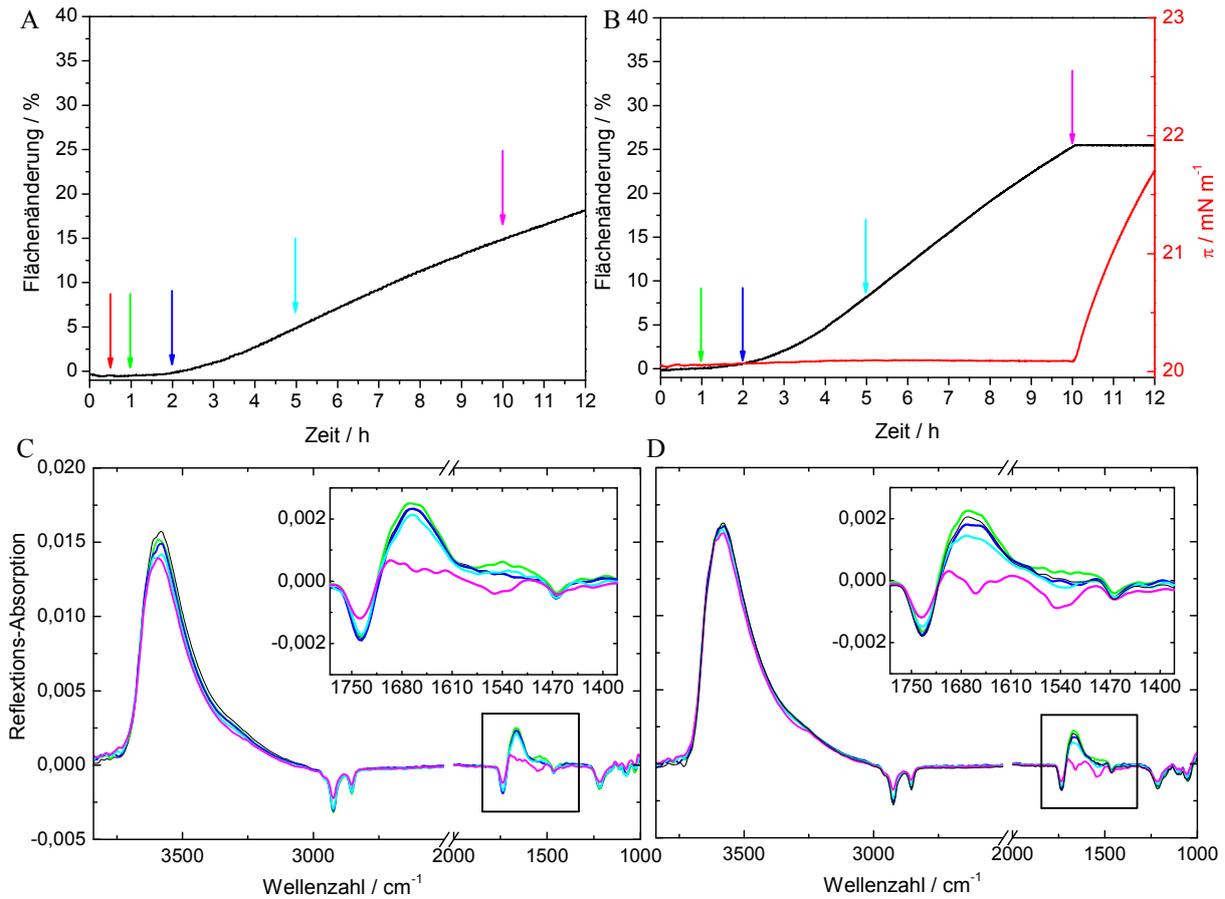


Abb. 4.31: Adsorption von YcdB mit Co-Faktor (100 nM) an Lipidmonoschichten bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion zu dem polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in C; B: Zeitabhängige Druck- und Flächenänderung nach Proteininjektion zu *E. coli* PG (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in D; C: Reflexions-Absorptions-Spektren aus A, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches; D: Reflexions-Absorptions-Spektren aus B, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

In den Spektren zu Beginn der Adsorption deutete sich die Bildung der proteinspezifischen Amid I und II Banden an. Die Intensitäten waren auch nach zehnstündiger Inkubationszeit noch sehr gering. Die Auswertung dieses Spektrums deutet auf eine hauptsächlich α -helikale Proteinstruktur hin (Amid I bei $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$, Amid II bei $\sim 1547 \text{ cm}^{-1}$). Die Intensität der $\nu(\text{OH})$ Bande ($\sim 3580 \text{ cm}^{-1}$) blieb während des Adsorptionsprozesses gleich, was auf eine konstante Schichtdicke schließen lässt. Die Intensitäten der lipidspezifischen Banden nahmen in einem geringeren Maße ab als bei der Messung an das Lipidgemisch.

Um die Sekundärstrukturen des adsorbierten YcdB mit Co-Faktor an den unterschiedlichen Lipidmonoschichten besser zu vergleichen, bietet sich die Berechnung von Differenzspektren an (Abb. 4.32). Darin ist zu sehen, dass die Zusammensetzung der Lipidschicht keinen Einfluss auf die hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur des Proteins hat.

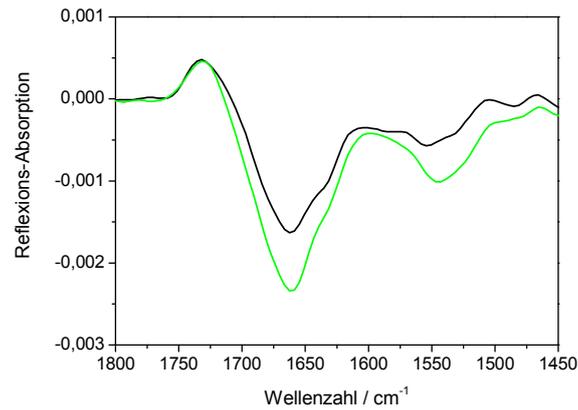


Abb. 4.32: Detailausschnitt des Amidbandenbereiches der Differenzspektren des adsorbierten YcdB inkl. Co-Faktor an Lipidmonoschichten bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0), bei 20 °C, nach 10 h; Schwarz an den polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%); Grün an *E. coli* PG.

Um das frühe Erreichen der maximalen Fläche durch die Expansion des Films zu unterbinden, wurden Wiederholungsmessungen bei einer größeren Startfläche pro Lipidmolekül begonnen. Dafür wurde ein geringeres Lipidvolumen gespreitet. Der gespreitete Film wurde dann ebenfalls bis zu einem lateralen Oberflächendruck von 20 mN m^{-1} komprimiert. Danach wurde wie gewohnt die Proteinlösung injiziert und die zeitabhängige Flächenänderung und die Entwicklung des Spektrums beobachtet.

Wie in den Abb. 4.33 A bis D zu sehen ist, scheinen die gewonnenen Ergebnisse mit den oben beschriebenen Resultaten zunächst schwer vergleichbar. Insgesamt waren die Interaktionsstärken um ein vielfaches größer. Auch die sich entwickelnden, proteinspezifischen Banden waren deutlich intensiver. Die Adsorptionsaffinität des Proteins zeigte eindeutige Unterschiede zwischen den verschiedenen Monoschichten. Im betrachteten Zeitraum war die Flächenzunahme in der Adsorptionsmessung an den stärker negativ geladenen PG-Film etwa doppelt so groß, ebenso wie die Intensität der Amidbanden. Die Bandenformen und -positionen der Amid I und II Banden des interagierenden Proteins mit den verschiedenen Monoschichten waren allerdings sehr ähnlich (Abb. 4.33 B und D). Jeweils deuten Amidbanden auf ein hauptsächlich α -helikal strukturiertes Protein hin, wie es auch in den Differenzspektren (Abb. 4.32) beobachtet wurde. Auch ein geringer Anteil an β -Faltblattstrukturen wurde beobachtet, was ebenfalls mit den Differenzspektren übereinstimmt. Die vermeintlich starke Adsorption des Proteins in den Wiederholungsmessungen liegt wahrscheinlich in der Art der Darstellung begründet. Es wurden alle Bedingungen beibehalten, nur weniger Lipid eingesetzt und damit ein kleinerer Lipidfilm erzeugt. Eine geringere absolute Flächenzunahme durch die Adsorption des

Proteins führt also zu einer größeren relativen Flächenzunahme, wie sie in den Abbildungen dargestellt wurde.

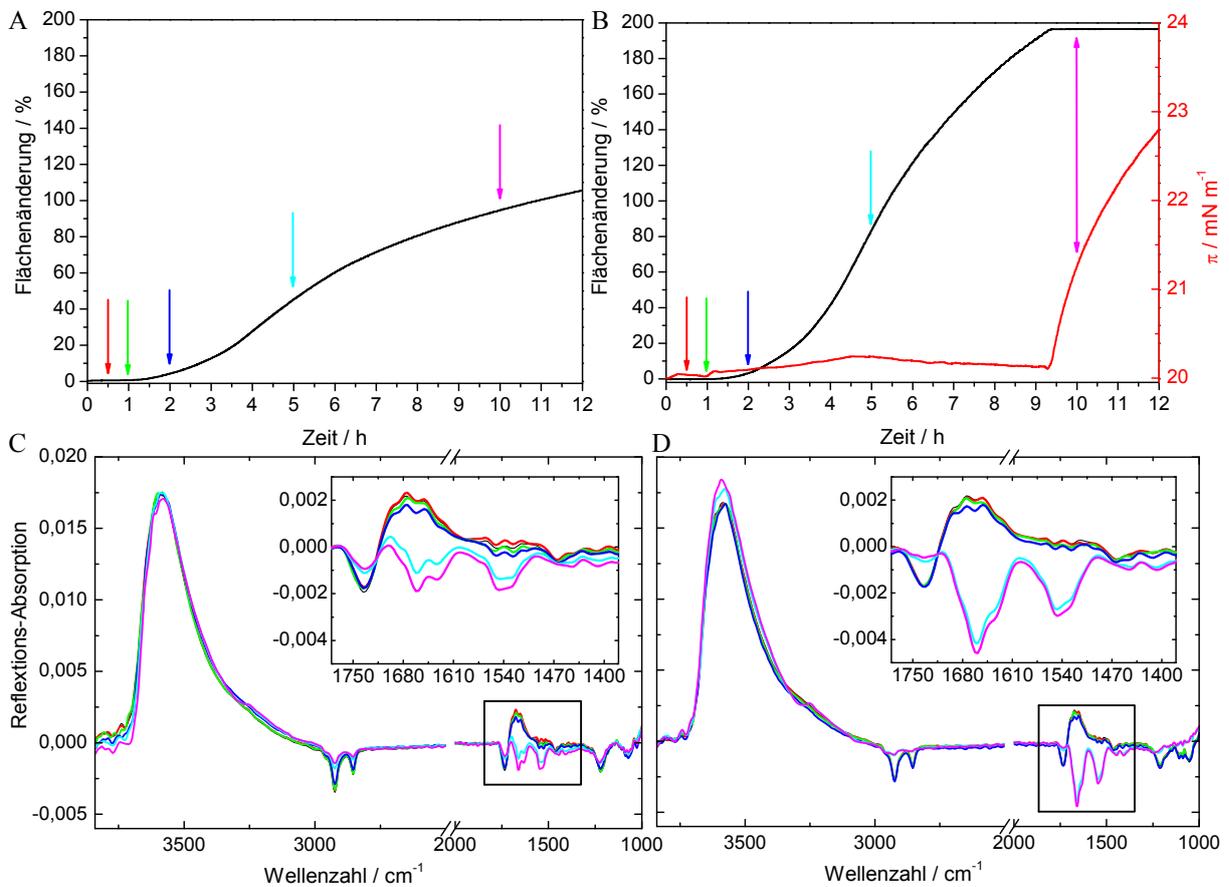


Abb. 4.33: Wiederholungsmessung der Adsorption von YcdB mit CoFaktor (100 nM) an Lipidmonoschichten bei $\pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$ auf Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) bei 20 °C. A: Zeitabhängige Flächenänderung nach Proteininjektion zu dem polaren *E. coli* Extrakt (PE/PG/CL 67: 23: 10 mol-%) (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in C; B: Zeitabhängige Druck- und Flächenänderung nach Proteininjektion zu *E. coli* PG (Zeit = 0 h), Pfeile markieren den Aufnahmezeitpunkt der dargestellten Spektren in D; C: Reflexions-Absorptions-Spektren aus A, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches; D: Reflexions-Absorptions-Spektren aus B, Schwarz: reines Lipidspektrum; Inset: Ausschnittsvergrößerung des Amidbandenbereiches.

Die Ergebnisse der Messungen mit YcdB mit bzw. ohne Co-Faktor zeigten, dass beide Proteine oberflächenaktiv sind. Durch IRRA-Spektroskopie wurde beobachtet, dass YcdB einen etwas dickeren Proteinfilm an der Luft/Wasser-Grenzfläche ausbildet als YcdB mit dem gebundenen Co-Faktor. Beide Proteine sind hauptsächlich α -helikal strukturiert. Der Co-Faktor scheint also auf die Struktur keinen Einfluss zu haben. Filmwaagemessungen der Adsorptionsexperimente an Lipidmonoschichten zeigten, dass die Interaktionsstärke an das *E. coli* Lipidgemisch und an das negativ geladene PG ähnlich ist. Beide Proteine scheinen in der Lage zu sein spontan in Membranen zu insertieren. In den IRRA-spektroskopischen Messungen wurde allerdings beobachtet, dass die Proteine jeweils stärker mit einer negativ

geladenen Monoschicht interagieren. Die Sekundärstruktur des mit den Lipiden wechselwirkenden YcdB zeigte sowohl α -helikale als auch β -Faltblattanteile. In den Messungen mit YcdB inklusive dem Co-Faktor zeigten die proteinspezifischen Banden ein hauptsächlich α -helikal strukturiertes Protein, wie es auch an der Luft/Wasser-Grenzfläche beobachtet wurde. Die Interaktion mit Lipiden hat scheinbar keinen Einfluss auf die Proteinstruktur.

4.6 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse des bakteriellen Systems

Es wurde gezeigt, dass sowohl die *E. coli*-spezifischen Einzelligipide als auch das Gemisch des polaren *E. coli* Extraktes flüssig-expandiertes Phasenverhalten aufweisen. In den IRRA-spektroskopischen Messungen wurden die erwarteten lipidspezifischen Banden detektiert. Epi-fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten Unterschiede in der Organisation der Lipide des Gemisches auf verschiedenen Subphasen. Während das Lipidgemisch auf Wasser einen homogenen Film bildete, zeigten sich auf Puffer kleine, unregelmäßig geformte Domänen unbekannter Herkunft.

Sowohl die verwendeten Proteine (HiPIP bzw. preHiPIP) als auch das Signalpeptid sind oberflächenaktiv und bilden Protein/Peptidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Das gekoppelte Signalpeptid im preHiPIP verstärkte die Oberflächenaktivität im Vergleich zu HiPIP. Auf die Sekundärstruktur des Proteins nahm es allerdings keinen Einfluss. Beide Proteine zeigten hauptsächlich β -Faltblattstrukturen. Das eigenständige Signalpeptid lag an der Grenzfläche ebenfalls in β -Faltblattstrukturen vor.

Während HiPIP nicht mit Monoschichten des polaren *E. coli* Extraktes interagierte, zeigte die Signalpeptid tragende Variante eine eindeutige Adsorption an den Lipidfilm. Durch IRRA-Spektroskopie wurde eine hauptsächlich α -helikale Struktur beobachtet, was sich deutlich von der Struktur des adsorbierten Proteins an der Luft/Wasser-Grenzfläche unterscheidet, in der überwiegend β -Faltblätter detektiert wurden. Auch das Signalpeptid allein interagierte mit Lipiden und lag, wie an der Luft/Wasser-Grenzfläche, in β -Faltblättern vor. Außerdem wurde festgestellt, dass sowohl preHiPIP als auch das Signalpeptid an stärker negativ geladene Monoschichten stärker binden. Für die Adsorption von preHiPIP und dem Signalpeptid schienen elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Beeinflussung der Konformation der Moleküle in Wechselwirkung mit einem PG-Film gegenüber der gemischten Monoschicht wurde nicht festgestellt.

Das modifizierte Protein (preHiPIP mit Thrombinschnittstelle) zeigte eine etwas stärkere Oberflächenaktivität als das „normale“ preHiPIP und wies einen etwas höheren α -helikalen Strukturanteil auf. Mit Lipidmonoschichten interagierte das Protein allerdings etwas schwächer, wobei auch preHiPIP inklusive Thrombinschnittstelle einen stärker negativ geladenen Film bevorzugte. In Interaktion mit Lipiden unterschieden sich die Sekundärstrukturen zwischen der Schnittstellen tragenden Variante und dem „normalen“ preHiPIP nicht.

Das *E. coli*-spezifische Tat-Substrat YcdB zeigte sowohl mit als auch ohne gebundenen Co-Faktor eine Oberflächenaktivität, während der Co-Faktor selbst nicht an die Luft/Wasser-Grenzfläche adsorbierte. Beide Proteine waren an der Luft/Wasser-Grenzfläche gleich strukturiert, wodurch eine starke Beeinflussung der Sekundärstruktur durch den gebundenen Co-Faktor ausgeschlossen werden kann. Adsorptionsmessungen an Lipidmonoschichten zeigten, dass eine spontane Insertion in Lipidmembranen wahrscheinlich ist. Möglicherweise spielen bei der Bindung an Lipide neben hydrophoben Wechselwirkungen auch elektrostatische Effekte eine Rolle. IRRA-spektroskopische Messungen zeigten, dass die Interaktion mit Lipiden, im Vergleich zu den an die Luft/Wasser-Grenzfläche adsorbierten Molekülen, keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur der YcdB-Proteine hat.

5 Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Messungen mit den Modellsubstraten für das thylakoidale und das bakterielle Tat-abhängige Translokationssystem

Ein Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe physikalisch-chemischer Untersuchungsmethoden die ersten Schritte des Tat-spezifischen Membrantransportes sowohl im thylakoidalen als auch im bakteriellen System zu untersuchen.

Die Strukturen der Modellsubstrate EGFP bzw. HiPIP waren bekannt. Außerdem war in beiden Fällen bewiesen, dass die Proteine nativ gefaltet mit Hilfe des Tat-Weges über Membranen transportiert werden, wenn sie mit dem entsprechenden, spezifischen Signalpeptid ausgestattet sind. Weiterhin war bekannt, dass das gekoppelte Signalpeptid unstrukturiert ist, wenn das Protein in Lösung vorliegt. Welche Struktur die eigenständigen Signalpeptide in Lösung annehmen, war allerdings nicht bekannt.

Durch Adsorptionsmessungen an die Luft/Wasser-Grenzfläche zeigte sich, dass jeweils die Proteine ohne Signalpeptid eine schwächere Affinität zu Luft/Wasser-Grenzflächen aufweisen als die mit den Signalpeptiden gekoppelten Proteine (i16/EGFP bzw. preHiPIP) bzw. die eigenständigen Peptide. IRRA-Spektren zeigten einen erhöhten α -helikalen Strukturanteil adsorbierter i16/EGFP-Moleküle gegenüber adsorbierten EGFP-Molekülen, wohingegen die Sekundärstrukturen von HiPIP und preHiPIP an der Luft/Wasser-Grenzfläche gleich waren. Das bedeutet, dass das für den thylakoidalen, Tat-abhängigen Weg spezifische Signalpeptid eine α -helikale Konformation annimmt, wobei das Signalpeptid, das für den bakteriellen, Tat-abhängigen Weg spezifisch ist, auch an der Grenzfläche unstrukturiert bleibt. Die eigenständigen Signalpeptide aggregieren jeweils an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu β -Faltblättern. Allerdings wurde für das Signalpeptid, das für den thylakoidalen Tat-abhängigen Weg spezifisch ist, eine konzentrationsabhängige Konformationsumformung beobachtet. Bei geringen Konzentrationen lag das Peptid α -helikal an der Grenzfläche vor. Wurden höhere Konzentrationen verwendet, wurde eine zunächst α -helikale und später β -Faltblattstruktur beobachtet. Bei sehr hohen Peptidkonzentrationen wurde die sofortige Ausbildung von β -Faltblättern detektiert.

Bei Adsorptionsstudien an Lipidmonoschichten mit der entsprechenden physiologischen Lipidzusammensetzung zeigten die reinen Modellproteine (EGFP bzw. HiPIP) schwache bis keine Wechselwirkungen. In beiden Fällen konnten daher keine Aussagen zur Sekundärstruktur der mit den Lipiden interagierenden Proteine getroffen werden. Das an das Signalpeptid gekoppelte EGFP (i16/EGFP) zeigte eine deutliche Interaktion. Außerdem nahm

der α -helikale Strukturanteil im Protein gegenüber den adsorbierten Molekülen an der Luft/Wassergrenzfläche zu. Im Gegensatz dazu wurde nur eine sehr schwache Adsorption von preHiPIP an die Lipidmonoschicht beobachtet. Die IRRA-Spektren deuteten auf hauptsächlich α -Helices gegenüber einem strukturellen Hauptanteil von β -Faltblättern des Proteins an der Grenzfläche ohne Lipid hin. Die eigenständigen Signalpeptide interagierten ebenfalls mit den Lipidschichten. Für das pflanzliche Peptid konnte eine Sekundärstruktur von aggregierten β -Faltblättern nur beobachtet werden, wenn es in hohen Konzentrationen eingesetzt wurde. Dagegen interagierte das für den bakteriellen, Tat-abhängigen Weg spezifische Signalpeptid auch bei geringer eingesetzter Konzentration und bildete dabei hauptsächlich β -Faltblattstrukturen.

Wurde eine Monoschicht, die ausschließlich aus negativ geladenen Lipiden bestand, zur Interaktion mit den Substraten verwendet, zeigten sich für EGFP und i16/EGFP kaum Unterschiede in Adsorptionsverhalten und Sekundärstrukturausbildung im Vergleich zur Wechselwirkung mit der gemischten Lipidmonoschicht. Für das entsprechende Signalpeptid deutete sich eine stärkere Interaktion an. Die zusätzliche negative Ladung der Lipidschicht beeinflusste die Interaktion des muren HiPIP ebenfalls nicht. Für preHiPIP und das eigenständige, bakterielle Signalpeptid wurden jedoch stärkere Wechselwirkungen aber die gleiche Ausbildung der Sekundärstrukturen beobachtet.

6 Ausblick

Einige der beobachteten Ergebnisse bedürfen einer Überprüfung durch Wiederholungsmessungen oder besser geeignete Detektionsverfahren. Da für alle verwendeten, pflanzlichen Proteine nachgewiesen wurde, dass sie an der Luft/Wasser-Grenzfläche nicht in einem geschlossenen Proteinfilm vorliegen, sollten diese Experimente in Abhängigkeit der Proteinkonzentration durchgeführt werden. Natürlich wäre eine solche Verifizierung der Oberflächenaktivität auch für die bakteriellen Modellproteine sinnvoll. Für eine genauere Bestimmung des maximalen Einbaudruckes der verschiedenen Proteine in Lipidmonoschichten sollten zusätzliche Messungen bei anderen Ausgangsdrücken der Lipidschichten vorgenommen werden. Außerdem könnten Adsorptionsstudien an Lipiddoppelschichten durchgeführt werden. Mit Hilfe der Resultate früherer Studien mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) an Lipidvesikeln konnten keine Aussagen zum Insertionsverhalten getroffen werden^[105]. Möglicherweise war diese Methode nicht sensitiv genug. Denkbar wäre Doppelschichten auf einem Trägermaterial zu verankern (z.B. durch Langmuir-Blodgett-Überträge oder mit Hilfe von Lipidvesikeln) und die Adsorption bzw. Insertion der Proteine mittels Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM – Atomic Force Microscopy) zu verfolgen. Dieser experimentelle Ansatz könnte auch genutzt werden, um die Wechselwirkungen der Modellproteine an Lipiddoppelschichten zu untersuchen, in denen die Untereinheiten des Translokationskomplexes (TatA, TatB bzw. TatC) eingebettet sind.

Für das bakterielle System wurde in den Messungen mit den YcdB-Proteinen ein Anfang für eine Untersuchungsreihe eines physiologischen, Tat-spezifischen *E. coli*-Substrates gemacht. Weitere Untersuchungen, vor allem mit dem entsprechenden Signalpeptid sind nötig. Auch für das pflanzliche System sollte, für eine weitere, detaillierte Beschreibung des Translokationsvorganges mittels des Tat-abhängigen Weges, ein physiologisches Substrat verwendet werden. Dadurch könnte außerdem geklärt werden, ob auch das zu transportierende Substrat einen Einfluss auf die Interaktion mit Lipiden hat.

Auch eine weiterführende Charakterisierung der Lipidkomponenten sollte durchgeführt werden. Durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Einzellipide des in dieser Arbeit verwendeten polaren *E. coli* Extraktes, könnte der Grund für die Bildung der beobachteten Domänenstrukturen in der Monoschicht auf der Puffersubphase ermittelt werden.

7 Zusammenfassung

Mit Hilfe von spezifischen Membranproteinkomplexen werden Proteine/Peptide durch Membranen transportiert. Darunter nimmt der Tat-abhängige Weg (Twin Arginine Translocation Pathway) eine Sonderstellung ein, da er gefaltete und Co-Faktor tragende Proteine transportieren kann. Dieser Translokationsmechanismus kommt sowohl in der Thylakoidmembran pflanzlicher Chloroplasten, als auch in der Cytoplasmamembran von Bakterien vor.

Ziel dieser Arbeit war es Wechselwirkungen von Modellsubstraten für den Tat-abhängigen Transport mit Membranlipiden zu untersuchen, um mögliche erste Schritte dieses Tat-spezifischen Translokationsvorganges zu studieren.

Die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den Lipidmonoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche wurden hauptsächlich durch die Filmwaagetechnik und die IRRA-Spektroskopie beobachtet.

1. Für die Untersuchung des pflanzlichen Tat-Systems wurde das Modellsubstrat EGFP verwendet. Durch die Kopplung an ein für den thylakoidalen, Tat-abhängigen Transport spezifisches Signalpeptid entstand das chimäre Protein i16/EGFP. Sowohl Filmwaage-, als auch IRRA-spektroskopische Messungen zeigten, dass beide Proteine (EGFP und i16/EGFP) und auch das eigenständige Signalpeptid oberflächenaktiv sind und Protein- bzw. Peptidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche ausbilden, wobei unterschiedliche Stärken der Adsorption beobachtet wurden. Studien mit den Proteinen EGFP und i16/EGFP mit Lipiden der pflanzlichen Thylakoidmodellmembran zeigten, dass die Interaktion des Substrates mit Lipidmonoschichten durch die Kopplung an das Tat-spezifische Signalpeptid verstärkt wird. Durch die Wechselwirkung mit Lipiden erhöht sich der α -helikale Strukturanteil des chimären Proteins i16/EGFP, was durch die Umwandlung des in Lösung unstrukturierten Signalpeptides zu einer α -Helix hervorgerufen wird. Die Interaktion zwischen Protein und Lipidmonoschichten ist hauptsächlich auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen. Elektrostatische Effekte spielen nur eine geringe Rolle.
2. Für das Studium des bakteriellen Tat-Systems wurden das Protein HiPIP und dessen für den Tat-abhängigen Transport spezifisches Signalpeptid als Modellsubstrate verwendet. Gemeinsam bilden sie das Precursor-Protein preHiPIP. Oberflächenaktivitätsmessungen zeigten, dass sowohl die beiden Proteine (HiPIP und preHiPIP) als auch das

- eigenständige Signalpeptid Protein- bzw. Peptidfilme an der Luft/Wasser-Grenzfläche bilden, wobei unterschiedliche Stärken der Adsorption beobachtet wurden. Adsorptionsmessungen mit den Modellsubstraten ergaben, dass deren Interaktion mit *E. coli*-spezifischen Lipiden durch die Kopplung mit dem Tat-spezifischen Signalpeptid beträchtlich gesteigert wird. Die strukturellen Änderungen der Sekundärstruktur des mit den Lipiden interagierenden Proteins sind hauptsächlich durch die Ausbildung einer α -Helix des in Lösung unstrukturierten Signalpeptides hervorgerufen. Für die Wechselwirkung spielen elektrostatische Kräfte eine wesentliche Rolle.
3. Der Vergleich der Ergebnisse für die beiden Systeme zeigte, dass einige Unterschiede in den verschiedenen Systemen existieren. Durch Adsorptionsmessungen von i16/EGFP bzw. preHiPIP an die Luft/Wasser-Grenzfläche ohne eine Lipidmonoschicht wurde beobachtet, dass das für den thylakoidalen, Tat-abhängigen Transport spezifische Signalpeptid eine α -helikale Struktur annimmt, wohingegen das für den Tat-abhängigen HiPIP-Transport spezifische Signalpeptid unstrukturiert bleibt. Im Gegensatz dazu verursacht die Interaktion mit Lipiden in beiden Fällen die Ausbildung einer α -Helix der Signalsequenz. Übereinstimmend für beide Systeme wurde außerdem festgestellt, dass die Kopplung eines Tat-spezifischen Signalpeptides die Interaktion mit Lipiden verstärkt. Während allerdings das Modellprotein für das thylakoidale System keine Unterschiede der Wechselwirkungsstärke mit einer im physiologischen Verhältnis gemischten und einer stärker negativ geladenen Lipidmonoschicht zeigt, weist das bakterielle Modellprotein eine deutlich gesteigerte Bindung an einen stark negativ geladenen Lipidfilm auf.

8 Literaturverzeichnis

- [1] E. Brechler, B. Dinkelaker, D. Dreesmann, M. Held, *Kompaktlexikon der Biologie*, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2001**.
- [2] C. Aldridge, P. Cain, C. Robinson, *FEBS J.* **2009**, *276*, 1177-1186.
- [3] R. B. Klösgen, *J. Photochem. Photobiol., B* **1997**, *38*, 1-9.
- [4] C. Robinson, A. Bolhuis, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 350-356.
- [5] A. M. Creighton, A. Hulford, A. Mant, D. Robinson, C. Robinson, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1663-1669.
- [6] J. P. Marques, M. H. Schattat, G. Hause, I. Dudeck, R. B. Klossgen, *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 1697-1706.
- [7] P. J. Hynds, D. Robinson, C. Robinson, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34868-34874.
- [8] H. Mori, K. Cline, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1541*, 80-90.
- [9] H. Mori, E. J. Summer, X. Ma, K. Cline, *J. Cell Biol.* **1999**, *146*, 45-56.
- [10] M. B. Walker, L. M. Roy, E. Coleman, R. Voelker, A. Barkan, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 267-276.
- [11] A. M. Settles, A. Yonetani, A. Baron, D. R. Bush, K. Cline, R. Martienssen, *Science* **1997**, *278*, 1467-1470.
- [12] H. Mori, E. J. Summer, K. Cline, *FEBS Lett.* **2001**, *501*, 65-68.
- [13] K. Cline, H. Mori, *J. Cell Biol.* **2001**, *154*, 719-730.
- [14] H. Mori, K. Cline, *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 205-210.
- [15] C. Dabney-Smith, H. Mori, K. Cline, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 5476-5483.
- [16] K. Cline, M. McCaffery, *EMBO J.* **2007**, *26*, 3039-3049.
- [17] M. Jakob, S. Kaiser, M. Gutensohn, P. Hanner, R. B. Klösgen, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 388-394.
- [18] J. D. H. Jongbloed, U. Grieger, H. Antelmann, M. Hecker, R. Nijland, S. Bron, J. M. Van Dijl, *Mol. Microbiol.* **2004**, *54*, 1319-1325.
- [19] J. P. Barnett, R. T. Eijlander, O. P. Kuipers, C. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 2534-2542.
- [20] J. D. H. Jongbloed, R. van der Ploeg, J. M. van Dijl, *Trends Microbiol.* **2006**, *14*, 2-4.
- [21] F. Berthelmann, T. Brüser, *FEBS Lett.* **2004**, *569*, 82-88.
- [22] N. Ray, A. Nenninger, C. W. Mullineaux, C. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17961-17968.
- [23] O. I. Pop, M. Westermann, R. Volkmer-Engert, D. Schulz, C. Lemke, S. Schreiber, R. Gerlach, R. Wetzker, J. P. Müller, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38428-38436.
- [24] K. Gouffi, F. Gérard, C.-L. Santini, L.-F. Wu, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11608-11615.
- [25] I. Porcelli, E. de Leeuw, R. Wallis, E. van den Brink-van der Laan, B. de Kruijff, B. A. Wallace, T. Palmer, B. C. Berks, *Biochemistry* **2002**, *41*, 13690-13697.
- [26] C. S. Chan, M. R. Zlomislic, D. P. Tieleman, R. J. Turner, *Biochemistry* **2007**, *46*, 7396-7404.
- [27] F. Sargent, N. R. Stanley, B. C. Berks, T. Palmer, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36073-36082.

- [28] F. Sargent, E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks, T. Palmer, *EMBO J.* **1998**, *17*, 3640-3650.
- [29] J. Behrendt, K. Standar, U. Lindenstrauß, T. Brüser, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *234*, 303-308.
- [30] E. de Leeuw, T. Granjon, I. Porcelli, M. Alami, S. B. Carr, M. Müller, F. Sargent, T. Palmer, B. C. Berks, *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 1135-1146.
- [31] P. A. Lee, D. Tullman-Ercek, G. Georgiou, *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, *60*, 373-395.
- [32] T. Brüser, C. Sanders, *Microbiol. Res.* **2003**, *158*, 7-17.
- [33] M. Alami, I. Lüke, S. Deitermann, G. Eisner, H.-G. Koch, J. Brunner, M. Müller, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 937-946.
- [34] M. J. Tarry, E. Schäfer, S. Chen, G. Buchanan, N. P. Greene, S. M. Lea, T. Palmer, H. R. Saibil, B. C. Berks, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 13284-13289.
- [35] T.-T. Yang, L. Cheng, S. R. Kain, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4592-4593.
- [36] F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips, *Nat Biotech* **1996**, *14*, 1246-1251.
- [37] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509-544.
- [38] M. Zimmer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759-782.
- [39] G. H. Patterson, S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain, D. W. Piston, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2782-2790.
- [40] J. P. Marques, I. Dudeck, R. B. Klösgen, *Mol. Genet. Genomics* **2003**, *269*, 381-387.
- [41] G. von Heijne, J. Steppuhn, R. G. Herrmann, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 535-545.
- [42] R. G. Bartsch, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1058*, 28-30.
- [43] S. V. Tedro, T. E. Meyer, M. D. Kamen, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 7826-7833.
- [44] T. Kusano, T. Takeshima, K. Sugawara, C. Inoue, T. Shiratori, T. Yano, Y. Fukumori, T. Yamanaka, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11242-11247.
- [45] L. D. Eltis, S. G. Iwagami, M. Smith, *Protein Eng.* **1994**, *7*, 1145-1150.
- [46] I. Bertini, A. Dikiy, D. H. W. Kastrau, C. Luchinat, P. Sompornpisut, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9851-9858.
- [47] C. W. Carter, J. Kraut, S. T. Freer, N.-h. Xuong, R. A. Alden, R. G. Bartsch, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 4212-4225.
- [48] A. Agarwal, J. Tan, M. Eren, A. Tevelev, S. M. Lui, J. A. Cowan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *197*, 1357-1362.
- [49] T. Brüser, H. G. Trüper, C. Dahl, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1352*, 18-22.
- [50] T. Brüser, T. Yano, D. C. Brune, F. Daldal, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1211-1221.
- [51] L. Banci, I. Bertini, A. Dikiy, D. H. W. Kastrau, C. Luchinat, P. Sompornpisut, *Biochemistry* **1995**, *34*, 206-219.
- [52] A. Sturm, A. Schierhorn, U. Lindenstrauß, H. Lilie, T. Brüser, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13972-13978.
- [53] C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, John Wiley and Sons, Inc., New York, **1980**.
- [54] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, D. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Ausgabe ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1994**.
- [55] G. L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, John Wiley and Sons, Inc., New York, London, Sydney, **1966**.

- [56] A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, 5. Ausgabe ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1990**.
- [57] H. Möhwald, in *Structure and Dynamics of Membranes. From Cell to Vesicles, Vol. 1 A* (Eds.: R. Lipomsky, E. Sackmann), North Holland, Amsterdam, **1995**.
- [58] M. Kates, in *Handbook of Lipid Research* (Ed.: D. J. Hanahan), Plenum Press, New York, **1990**.
- [59] M. X. Andersson, J. M. Kjellberg, A. S. Sandelius, *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 184-193.
- [60] G. Graham Shipley, J. P. Green, B. W. Nichols, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *311*, 531-544.
- [61] I. Brentel, E. Selstam, G. Lindblom, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *812*, 816-826.
- [62] M. S. Webb, C. P. S. Tilcock, B. R. Green, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *938*, 323-333.
- [63] A. G. Lee, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, R377-R380.
- [64] P. K. Fyfe, A. V. Hughes, P. Heathcote, M. R. Jones, *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 275-282.
- [65] C. Bottier, J. Géan, F. Artzner, B. Desbat, M. Pézolet, A. Renault, D. Marion, V. Vié, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1526-1540.
- [66] F. D. Gunstone, J. L. Harwood, F. B. Padley, *The Lipid Handbook*, 2. Ausgabe ed., Chapman and Hall, Inc., London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, **1994**.
- [67] A. Clausell, M. A. Busquets, M. Pujol, A. Alsina, Y. Cajal, *Biopolymers* **2004**, *75*, 480-490.
- [68] N. Sewald, H. D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [69] A. Kerth, Dissertation thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle), **2003**.
- [70] N. R. Pallas, B. A. Pethica, *Langmuir* **1985**, *1*, 509-513.
- [71] Y. F. Hifeda, G. W. Rayfield, *Langmuir* **1992**, *8*, 197-200.
- [72] M. Lösche, E. Sackmann, H. Möhwald, *Vol. 87, Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1983**, pp. 838-852.
- [73] A. M. Bibo, C. M. Knobler, I. R. Peterson, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5591-5599.
- [74] V. M. Kaganer, H. Möhwald, P. Dutta, *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779-819.
- [75] R. Maget-Dana, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 109-140.
- [76] L. K. Tamm, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1991**, *1071*, 123-148.
- [77] A. Blume, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *557*, 32-44.
- [78] H. L. Casal, H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *779*, 381-401.
- [79] A. Blume, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 64-77.
- [80] L. K. Tamm, S. A. Tatulian, *Q. Rev. Biophys.* **1997**, *30*, 365-429.
- [81] R. Mendelsohn, H. H. Mantsch, in *Progress in Protein-Lipid Interaction* (Eds.: A. Watts, J. J. H. M. de Pont), Elsevier Science, Amsterdam, New York, Oxford, **1986**.
- [82] H. H. Mantsch, D. Chapman, *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1996**.
- [83] H. Günzler, H. M. Heise, *IR-Spektroskopie - Eine Einführung, Vol. 3*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1996**.

- [84] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.-M. Ruyschaert, in *Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes*, 23 ed. (Eds.: H. J. Hilderson, G. B. Ralston), Plenum Press, New York, **1994**, pp. 405-450.
- [85] R. Mendelsohn, J. W. Brauner, A. Gericke, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 305-334.
- [86] R. Mendelsohn, G. Mao, C. R. Flach, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 788-800.
- [87] R. A. Dluhy, D. G. Cornell, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 3195-3197.
- [88] C. R. Flach, J. W. Brauner, J. W. Taylor, R. C. Baldwin, R. Mendelsohn, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 402-410.
- [89] V. L. Kuzmin, A. V. Michailov, *Opt. Spectrosc.* **1981**, *51*, 383-385.
- [90] V. L. Kuzmin, V. P. Romanov, A. V. Michailov, *Opt. Spectrosc.* **1992**, *73*, 1-26.
- [91] C. R. Flach, A. Gericke, R. Mendelsohn, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 58-65.
- [92] J. E. Bertie, M. K. Ahmed, H. H. Eysel, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 2210-2218.
- [93] J. E. Bertie, Z. Lan, *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 1047-1057.
- [94] J. Gallant, R. M. Leblanc, *J. Chromatogr. A* **1991**, *542*, 307-316.
- [95] B. Gzyl-Malcher, M. Filek, K. Makyla, *Thin Solid Films* **2008**, *516*, 8844-8847.
- [96] M. Kates, in *Glycolipids, Phosphoglycolipids, and Sulfoglycolipids, Vol. 6* (Ed.: M. Kates), Plenum Press, New York and London, **1990**, pp. 235-320.
- [97] R. M. Weis, H. M. McConnell, *Nature (London)* **1984**, *310*, 47-49.
- [98] A. Bredlow, H. J. Galla, L. D. Bergelson, *Chem. Phys. Lipids* **1992**, *62*, 293-301.
- [99] T. Buffeteau, E. Le Calvez, S. Castano, B. Desbat, D. Blaudez, J. Dufourcq, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 4537-4544.
- [100] P. Hanner, Dissertation thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle), **2007**.
- [101] F. D. Sönnichsen, J. E. Van Eyk, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8790-8798.
- [102] A. Shanmugham, H. W. Wong Fong Sang, Y. J. M. Bollen, H. Lill, *Biochemistry* **2006**, *45*, 2243-2249.
- [103] B. Hou, S. Frielingsdorf, R. B. Klösgen, *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 957-967.
- [104] D. Bentrop, I. Bertini, R. Iacoviello, C. Luchinat, Y. Niikura, M. Piccioli, C. Presenti, A. Rosato, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4669-4680.
- [105] T. Weber, Diplom thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle), **2007**.

16.12.2011

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel

„Wechselwirkung von Modellsubstraten und Signalpeptiden des Tat-abhängigen Translokationsweges mit Lipidmonoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche“

selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie alle wörtlich oder sinngemäß übernommenen Stellen in der Arbeit gekennzeichnet und deren Herkunft nachgewiesen habe.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades Dr. rer. nat. in gleicher oder ähnlicher Form eingereicht. Ferner habe ich mich bisher nicht um einen Dokortitel beworben.

Halle (Saale), 16.12.2011

Tina Brehmer

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name	Brehmer, geb. Weber
Vorname	Tina
Geburtsdatum	24.01.1982
Geburtsort	Cottbus
Nationalität	Deutsch

Ausbildung und Forschungstätigkeit

08/1994 – 06/2001 Niedersorbisches Gymnasium Cottbus (Brandenburg)
Abitur: Abschlussnote 1,9

09/2001 – 06/2007 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studium: Fachrichtung Biologie (Schwerpunkt: Mikrobiologie)
Diplom: Abschlussnote 1,9
Titel: „Biophysikalische Charakterisierung von Tat-Substraten und
-Membranen“
Abschlussarbeit angefertigt im Institut für Chemie, Bereich
physikalische Chemie

08/2007 – 07/2010 Exzellenznetzwerk Biowissenschaften „Strukturen und
Mechanismen der biol. Informationsverarbeitung“

07/2007 – 07/2011 Assoziiertes Mitglied des DFG Graduiertenkolleg 1026
„Conformational transitions in macromolecular interactions“

Halle, 16.12.20011

Tina Brehmer