

# **Künstliche und native Biomembransysteme auf planaren Substraten sowie auf Partikeloberflächen**

vorgelegt von  
Diplom-Ingenieur  
Murat Tutus

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Ingenieurwissenschaften  
- Dr.-Ing. -

**genehmigte Dissertation**

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Motomu Tanaka

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18.02.2010

Berlin 2010

D83

# Inhaltsangabe

<b>INHALTSANGABE</b> .....	<b>1</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>5</b>
<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>1. IMMOBILISIERUNG VON ASYMMETRISCHEN, KÜNSTLICHEN MEMBRAN-MODELL-SYSTEMEN AUF HYDROPHILEN, BIOKOMPATIBLEN ZELLULOSESCHICHTEN AUF PLANAREN OBERFLÄCHEN<sup>1</sup></b> .....	<b>22</b>
ZUSAMMENFASSUNG .....	22
EINLEITUNG .....	23
1.1 MATERIALIEN .....	24
1.1.1 Chemikalien .....	24
1.1.2 Festkörperoberflächen .....	25
1.2 METHODEN .....	26
1.2.1 RCA-Reinigung der Festkörperoberflächen .....	26
1.2.2 Hydrophobe Funktionalisierung der Festkörperoberflächen .....	27
1.2.3 Beschichtung der Festkörperoberflächen mit hydrophilen, biokompatiblen Zelluloseschichten .....	28
1.2.4 Neutronenreflektivität .....	29
1.2.5 Liposomenpräparation .....	30
1.2.6 Aufreinigung der $F_0F_1$ ATP-Synthase aus <i>Micrococcus lysodicticus</i> .....	31
1.2.7 Rekonstitution der $F_0F_1$ ATP-Synthase in Liposomen .....	33
1.2.8 Aufspreiten von Proteoliposomen auf hydrophile, biokompatible Zelluloseschichten .....	33
1.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	35
1.2.10 Bestimmung der Lipidkonzentration .....	35
1.2.11 Fluoreszenzmarkierung der Lipidmembran und der $F_0F_1$ ATP-Synthase .....	36
1.2.12 Dynamische Lichtstreuung .....	38
1.2.13 Fluoreszenzmikroskopie .....	39
1.2.14 Rasterkraftmikroskopie .....	40
1.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN .....	42
1.3.1 Lipid- und Proteinkonzentration .....	42
1.3.2 Dynamische Lichtstreuung .....	42
1.3.3 Rekonstitution der $F_0F_1$ ATP-Synthase in Liposomen .....	45
1.3.4 Charakterisierung der hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilme .....	47
1.3.5 Vergleich des Aufspreitverhaltens von unspezifisch markierten Proteoliposomen auf unbeschichteten Glasoberflächen und auf hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilmen .....	49
1.3.6 Verteilung der Proteoliposomenmembran auf hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilmen .....	51
1.3.7 Spezifische Antikörpermarkierung der Proteoliposomenmembran auf hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilmen .....	51
1.3.8 Mögliche Aufspreitmechanismen von Proteoliposomen .....	53
1.3.9 Bestimmung der Orientierung und des lateralen Abstands der $F_0F_1$ ATP-Synthase mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie .....	54
1.4 RESUMÉE .....	59
<b>2. BESCHICHTUNGSKINETIK VON MEMBRANPRÄPARATEN AUS HUMANEN ERYTHROZYTEN AUF UNMODIFIZIERTEN, PORÖSEN PARTIKELOBERFLÄCHEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER PARTIKELGRÖßEN<sup>2</sup></b> .....	<b>60</b>
ZUSAMMENFASSUNG .....	60
EINLEITUNG .....	61
2.1 MATERIALIEN .....	62
2.1.1 Chemikalien .....	62
2.1.2 Silicapartikel .....	63
2.2 METHODEN .....	64
2.2.1 Erythrozyten Membranenpräparation .....	64

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	65
2.2.3 Bestimmung der Lipidkonzentration	66
2.2.4 Fluoreszenzmarkierung von Ghostzellen	66
2.2.5 Rasterelektronenmikroskopie	67
2.2.6 Charakterisierung der Silicapartikeloberflächen	68
2.2.7 Ermittlung der Oberflächenrauigkeit von gekrümmten Oberflächen mit Hilfe der Autokorrelation	69
2.2.8 Partikelbeschichtung	69
2.2.9 SDS-PAGE zur Proteinzusammensetzung ungebundener und immobilisierter Ghostzellen auf Silicapartikeln	70
2.2.10 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie	71
2.2.11 Spinning Disk konfokale Fluoreszenzmikroskopie	72
2.3.12 Beobachtung des Beschichtungsprozesses	72
2.2.13 Environmental Rasterelektronenmikroskopie	73
2.2.14 Antikörpermarkierung beschichteter Silicapartikel	74
2.2.15 Bestimmung der Partikelbeschichtungskinetik	75
2.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN	77
2.3.1 Protein- und Lipidkonzentration	77
2.3.2 Form und Größe der Ghostzellen	78
2.3.3 Kontrolle der Membranoberfläche und der Membranorientierung der Ghostzellen	79
2.3.4 Beschichtungsanalyse der Partikeloberflächen	81
2.3.5 Qualität der Partikelbeschichtung	83
2.3.6 Theorie der Partikelbeschichtung auf strukturierten Oberflächen	85
2.3.7 Analyse der Proteinzusammensetzung von ungebundenen Ghostzellen und Ghostzellen immobilisiert auf Silicapartikeln	86
2.3.8 Darstellung des Beschichtungsprozesses	88
2.3.9 Einfluß der Partikelgröße auf die Beschichtungskinetik	89
2.3.10 Beschichtungsrate der Partikeloberflächen	91
2.3.11 Analyse der Beschichtungskinetik	93
2.3.12 Aufplatzmechanismen und Aufplatzkinetiken	94
2.4 RESUMÉE	97

### **3. PROTEINAKTIVITÄT DER $Ca^{2+}$ -ATPASE IN SR MEMBRANEN AUF UNMODIFIZIERTEN, PORÖSEN PARTIKELOBERFLÄCHEN<sup>3</sup> ..... 100**

ZUSAMMENFASSUNG	100
EINLEITUNG	101
3.1 MATERIALIEN	102
3.1.1 Chemikalien	102
3.1.2 Silicapartikel	103
3.2 METHODEN	104
3.2.1 Isolation von Membranfragmenten des Sarkoplasmatischen Retikulum	104
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	106
3.2.3 Bestimmung der Lipidkonzentration	106
3.2.4 Markieren der Membranfragmente des Sarkoplasmatischen Retikulums	106
3.2.5 Partikelbeschichtung mit Membranfragmenten des Sarkoplasmatischen Retikulums	107
3.2.6 Mikroskopische Methoden und Vergleich der Proteinzusammensetzung der SR Membranen in Puffer und auf Silicapartikeln	107
3.2.7 Bestimmung des katalytisch freigesetzten Phosphats	107
3.2.8 Aktivitätsmessung der $Ca^{2+}$ -ATPase	108
3.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN	110
3.3.1 Charakterisierung der SR Membranen	110
3.3.2 Protein und Lipidkonzentration	111
3.3.3 Bestimmung der immobilisierten SR Membranfläche auf Silicapartikeln	111
3.3.4 Beschichtungsanalyse der Partikeloberflächen	112
3.3.5 Proteinzusammensetzung ungebundener und auf Silicapartikel immobilisierter SR Membranfragmente	115
3.3.6 Aktivitätsbestimmung der $Ca^{2+}$ -ATPase in freischwimmenden SR Membranen	116
3.3.7 Aktivitätsbestimmung der $Ca^{2+}$ -ATPase auf Silicapartikeln	118
3.3.8 Proteinaktivität immobilisierter $Ca^{2+}$ -ATPasen auf Silicapartikeln in einer Chromatographiesäule	120
3.3.9 Bestimmung der $Ca^{2+}$ -ATPase Aktivität in einer gepackten Säule	121
3.3.10 Zusammenfassung der Aktivitätsbestimmungen	124
3.4 RESUMÉE	126

<b>4. THESEN ZUR ARBEIT .....</b>	<b>128</b>
<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>130</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>133</b>
<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>140</b>
<b>POSTERPRÄSENTATIONEN .....</b>	<b>141</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>142</b>
<b>DRITTMITTEL.....</b>	<b>144</b>
<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>145</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>146</b>

---

<sup>1</sup>Murat Tutus, Fernanda F. Rossetti, Emanuel Schneck, Giovanna Fragneto, Friedrich Förster, Ralf Richter, Thomas Nawroth and Motomu Tanaka

„Orientation- Selective Incorporation of Transmembrane F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP Synthase Complex from *Micrococcus luteus* in Polymer-Supported Membranes”, *Macromolecular Bioscience*, 2008, **8**, 1034

<sup>2</sup> Murat Tutus, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka

„Spreading Kinetics of Human Erythrocyte Membranes on Particle Supports: Influence of Contact Curvatures“, in preparation

<sup>3</sup> Murat Tutus, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka

„Highly Concentrated Sarcoplasmic Reticulum Membranes on Particle Supports as Biochemical Micro-Reactors“, in preparation

## Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, durch die Kombination verschiedener Oberflächenfunktionalisierungsmethoden und biophysikalischer Techniken Biomembranreaktoren aus künstlichen wie natürlichen Biomembranen auf verschiedenen Festkörperoberflächen herzustellen, um diese auf ihre technische Anwendungsmöglichkeit hin zu untersuchen. Der erste Teil beschreibt die Etablierung einer neuen, gerichteten Einbaumethode für große transmembrane Proteine ( $F_0F_1$  ATP-Synthase,  $M_w = 550$  kDa) durch den Einsatz eines „schwachen“ Detergens, welches die Lipidmembran gering stört. Mit Hilfe Dynamischer Lichtstreuung wurde gezeigt, daß der Einbau der Proteine in die Lipidmembran ohne deren Zerstörung erfolgte. Obwohl es nicht möglich ist, Proteoliposomen auf Glas- oder Quarzoberflächen aufzuspreiten, konnten Membranen mit einheitlich präsentierenden  $F_1$  Köpfen auf ultradünnen Zellulosefilmen (5 – 10 nm) ausgebildet und mit der Rasterkraftmikroskopie und Antikörpermarkierung beobachtet werden. Das zweite und dritte Kapitel beschreibt die Immobilisierung zwei verschiedener natürlicher Membranen (Ghostzellen aus humanen Erythrozyten und Fragmente des Sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenmuskeln) auf Silicamikropartikel. Silicamikropartikel bieten einen besonderen Vorteil gegenüber planaren Oberflächen: Auf den Partikeloberflächen können mit geringem Aufwand künstliche und natürliche Membranen ohne eine biokompatible Zellulosebeschichtung immobilisiert werden. Darüber hinaus bieten Partikel eine größere, zugänglichere Oberfläche, wodurch das Signal von Membranproteinen signifikant erhöht wird. Der erste Aspekt wird in Kapitel 2 untersucht, in dem demonstriert wird, daß die Aufspreitkinetik von Ghostzellmembranen tatsächlich von der Partikelgröße und somit dem Kontaktwinkel abhängig ist. Kapitel 3 schließlich beschreibt die Entwicklung eines Prototyps eines Membranbioreaktors mit beschichteten Silicapartikeln in einer Chromatographiesäule. Dieser Aufbau erlaubt die vereinfachte Beobachtung der quantitativen Funktion der  $Ca^{2+}$  ATPase in Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulums. Die ermittelten Daten demonstrieren eindrucksvoll, daß die Kombination von Oberflächenchemie, Biophysik und Bioverfahrenstechnologie eine leistungsfähige Strategie zur Entwicklung von biochemischen Membranbioreaktoren ist.

## Summary

The primary aim of the thesis is to explore the potential applications of artificial and native biomembranes immobilized on various solid substrates as bioreactors by the combination of various surface functionalization methods and biophysical techniques. In the first part, a new strategy to incorporate large transmembrane proteins ( $F_0F_1$  ATP synthase, MW = 550 kDa) in an orientation selective manner is established by the use of weak detergents that are much less aggressive to lipid membranes. Dynamic light scattering demonstrated the incorporation of proteins into lipid vesicles without disrupting membrane structures. Although it is not possible to spread proteoliposomes on bare glass/quartz substrates, the formation of membranes uniformly displaying  $F_1$  head groups could be observed on ultrathin cellulose films (thickness: 5 – 10 nm) by the use of atomic force microscopy and immunofluorescence microscopy. In the second and third chapter, two kinds of native membranes (human erythrocyte ghost membranes and rabbit sarcoplasmic reticulum membranes) are deposited onto silica microparticles, which can offer unique advantages over planar supports: They allow a less laborious immobilization of membranes because both artificial and native membranes can be deposited without biocompatible cellulose coatings. Moreover, the particle supports can provide much larger accessible surface areas, which enables one to amplify the signal from membrane proteins significantly. The first aspect is investigated in Chapter 2, where it is being demonstrated that the spreading kinetics of erythrocyte ghost membranes actually depend on the particle size (contact curvature). In Chapter 3, a prototype of membrane bioreactor is designed by packaging particle-supported membranes in a chromatography column, which allows the easy monitoring of the quantitative function of  $Ca^{2+}$  ATPase in sarcoplasmic reticulum membranes. The obtained results demonstrate that the combination of surface chemistry, biophysics, and bioengineering is a powerful strategy towards the design of biochemical membrane microreactors.

## Einleitung

Die Zellmembran ist eine der wichtigsten Komponenten der Zelle, weil sie die Separation des Innenraumes von der Umgebung unter Beibehaltung eines selektiven Stoffaustausches zwischen dem intra- und extrazellulären Raum ermöglicht. Sie stellt eine komplexe Grenzschicht dar, die aus amphiphilen Lipiden aufgebaut ist. Sie dient als Träger für angrenzende Lagen von Biopolymeren: So grenzt intrazellulär das Zellskelett, extrazellulär grenzen die Glykokalyx oder die extrazelluläre Matrix. Die Zellmembran kann also als ein komplexer Verbundwerkstoff angesehen werden, der die kompartimentierende Funktion der Lipidmembran und die enzymatische Transportfunktion der Membranproteine kombiniert. Auf der plasmatischen Seite (P-Seite) ist die Zellmembran an das Zytoskelett gebunden, welches der Zelle mechanische Stabilität verleiht und Zellbewegung ermöglicht. Auf der exoplasmatischen Seite (E-Seite) befindet sich die extrazelluläre Matrix, die die Zell-Zell-Kommunikation und adhäsiven Vorgänge kontrolliert. Aus der Kombination unterschiedlicher Lipide und verschiedener Membranproteine hat sich während der Evolution eine Vielzahl von hocheffektiven biologischen Membranen mit spezifischen Funktionen entwickelt (Alberts 2003).

Hauptstrukturelement einer Zellmembran sind amphiphile Lipide, die aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Alkylkette bestehen. Bedingt durch die hydrophobe Interaktion der apolaren Alkylketten und ihrem Packungsparameter (Abbildung 1) organisieren sich Lipide zu geschlossenen, zweilagigen Lipidmembranen (Gorter and Grendel 1925), in denen die hydrophilen Kopfgruppen die Alkylketten vom wässrigen Medium abschirmen. Dabei entsteht eine Membran, die als eine „2 dimensionale“ Flüssigkeit (Lipowsky 1991; Sackmann and Lipowsky 1995; Nagle and Tristram-Nagle 2000) angesehen werden kann. Ihr hydrophober Kern stellt eine Barrierefunktion für geladene und polare Moleküle dar:

Der Packungsparameter der Lipide  $P_l$  erlaubt es anhand der Lipidgeometrie, die strukturellen Eigenschaften der gebildeten Membranen zu klassifizieren.

$$P_l = \frac{V}{a_0 l_c}$$

Er wird bestimmt aus dem Verhältnis aus  $l_C$ , der Länge der Alkylketten, aus  $V$ , dem Volumen des Zylinders, der von den Alkylketten im Mittel eingenommen wird, und aus  $a_0$ , der die größte Querschnittsfläche des hydrophilen Lipidkopfes darstellt.

Der Packungsparameter variiert zwischen  $1/3 \leq P \leq 1$ . Beim Packungsparameter  $P \geq 1/3$  nimmt die Fläche der Kopfgruppe einen kleinen Wert im Verhältnis zu der Fläche der Alkylketten an. Dabei bilden sich auf Grund der räumlichen Geometrie Mizellen aus (Lysophospholipide, Detergenzien). Ein Wert von  $P \approx 1$  stellt sich bei einem ähnlich großen Flächenbedarf der Kopfgruppen und Alkylketten ein, was zur Ausbildung einer doppellagigen Lipidmembran führt (Phospholipide). Für  $P \geq 1$  ist der Platzbedarf des hydrophilen Kopfes im Verhältnis zu den Alkylketten klein, was zur Bildung von inversen Mizellen führt (Cardiolipin, Cholesterol) (Gennis 1989; Schünemann 2005).

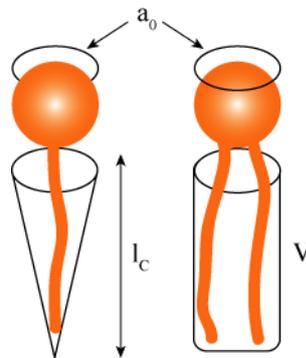


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Packungsparameters  $P$ . Die Querschnittsfläche des Kopfes wird von  $a_0$ , die Länge der Alkylketten von  $l_C$  und das Volumen der Alkylketten von  $V$  beschrieben.

Natürliche biologische Membranen sind aus Lipidmischungen aufgebaut, die sich zu einem Bilayer zusammensetzen. Eine Mischung aus verschiedenen Lipiden mit unterschiedlichen Packungsparametern erlaubt den Aufbau flexibler, fluider und dynamischer Zellmembranen (Cevc and Marsh 1987).

Singer und Nicholson (Singer and Nicolson 1972) haben die dynamische Eigenschaft von natürlichen Membranen in ihrem Flüssig-Mosaik-Modell beschrieben. In diesem sind Membranproteine in einer Matrix aus fluider Lipidmembran eingebettet und können frei diffundieren. Die Charakterisierung „fluide“ bezieht sich auf die thermodynamische Betrachtungsweise, in der die Lipidmembran als eine 2 dimensionale Flüssigkeit mit entsprechenden Phasenzuständen wie gasanalog, flüssiganalog und festanalog (Möhwald 1990; McConnell 1991) angesehen wird.

Die Fluidität einer Zellmembran spielt im biokatalytischen Stoffumsatz eine große Rolle, da sie diffusive Prozesse begünstigt. So erfolgt der Stofftransport innerhalb der Zellmembran diffusiv.

Darüber hinaus ist das Anordnen von Multienzymkomplexen innerhalb der Zellmembran ebenfalls diffusiv limitiert (z.B. bei der Elektronentransportkette der Zellatmung). Dementsprechend sind beide Prozesse nur in einer fluiden Lipidmembran begünstigt.

Es muß bei Membranproteinen zudem berücksichtigt werden, daß ihre transmembranen Domänen unterschiedliche Größen und Formen besitzen. Diese Domänen können nur von Gemischen aus Lipiden mit unterschiedlichen Packungsparametern innerhalb der Lipidmembran stabilisiert werden (Chapman 1984).

Die Fluidität einer Zellmembran entsteht aus verschiedenen Bewegungsmöglichkeiten der Lipide: So können Lipide innerhalb der Membran rotieren oder lateral diffundieren („schnelle“ Bewegung). Sie besitzen aber auch eine transversale Beweglichkeit, die sich im Wechsel von der Innenseite (P-Seite) der Doppelschicht zur Außenseite (E-Seite) oder umgekehrt zeigt (flip flop, „langsame“ Bewegung) (Zachowski and Devaux 1990; Alberts 2003).

Jacobson (Jacobson 1983) ermittelte Diffusionskoeffizienten von Membranlipiden und Membranproteinen mit Hilfe der Fluoreszenzerholung nach Photobleichen. Der Diffusionskoeffizient für Membranlipide beträgt ca.  $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Die Beweglichkeit von transmembranen Proteinen in einer natürlichen und fluiden Lipidmembran liegt um eine Zehnerpotenz niedriger (Saffman and Delbrück 1975; Vaz, Goodsaid-Zalduondo et al. 1984).

Der Aufbau der Lipidmembran zeigt, daß sie eine geschlossene und dichte Barriere darstellt (Kompartimentierung), die für polare, geladene Moleküle wie z.B. Kohlenhydrate eine transversale Diffusionskonstante von ca.  $10^{-8} \text{ cm/s}$  aufweist (Abbildung 2). Eine strukturelle Analyse der Zellmembranen zeigt, daß Membranproteine eine weitere, funktionelle Hierarchieebene im Aufbau der Zellmembran darstellen. Transmembrane Proteine ermöglichen den Stofftransport für große, hydrophile und geladene Moleküle (Gennis 1989; Zachowski and Devaux 1990; Lipowsky 1991).

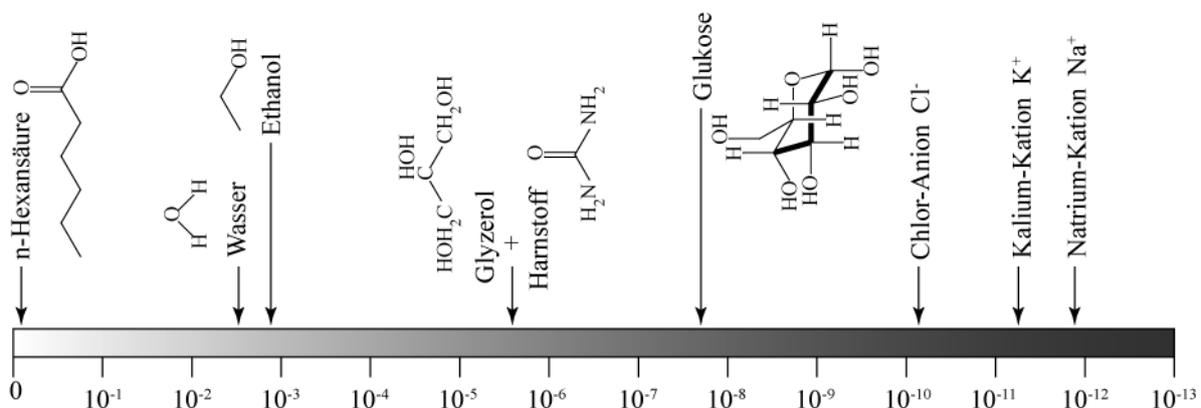


Abbildung 2: Membranpermeationskoeffizienten über eine Lipidmembran. Die Diffusionskoeffizienten zeigen, daß schwach apolare Substanzen einen hohen, und polare Moleküle sowie geladene Ionen einen geringen Membranpermeationskoeffizienten aufweisen (adaptiert von Alberts 2003).

Der Stofftransport über eine geschlossene Lipidmembran kann, wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, folgendermaßen beschrieben werden:

1. Diffusion
  - 1.1 freie Diffusion: physikalische Diffusion
  - 1.2 erleichterte Diffusion: Kanäle
2. Transport
  - 2.1 erleichteter Transport: Carrier
  - 2.2 aktiver Transport: Pumpen
3. Membranfusion
  - 3.1 Endozytose
  - 3.2 Exozytose

Der einfachste Fall des Stofftransportes ist die Diffusion, die als freie, physikalische Diffusion oder als erleichterte Diffusion über Kanäle stattfindet. Freie Diffusion kommt vorwiegend bei ungeladenen, kleinen Molekülen (Molekülmasse  $< 80$  Da) vor wie bei Wasser und Essigsäure oder bei Gasen wie Sauerstoff und Kohlendioxid. Eine freie Diffusion für große Moleküle existiert nur für amphiphile Moleküle wie z.B. Steroidhormone, die entsprechend ihres Verteilungskoeffizienten durch den hydrophoben Bereich der Lipidmembran hindurch diffundieren.

Der einfachste Fall einer enzymatisch vermittelten transmembranen Passage von großen, geladenen und hydrophilen Molekülen ist die erleichterte Diffusion über transmembrane Kanäle. Dieser Prozeß erfolgt über Kanäle, die an ihrer Kanalaußenseite hydrophob sind und somit in die hydrophobe Schicht der Lipidmembran eingebaut werden können. An ihrer Kanalinnenseite sind sie dagegen hydrophil. Somit können alle hydrophilen Moleküle, die kleiner als der Tunneldurchmesser sind, unspezifisch und ungerichtet durch den Kanal hindurch diffundieren. Allen diffusiven Prozessen ist gleich, daß sie in Richtung eines Konzentrationsgradienten oder Potentialgefälles ablaufen, d.h. die treibende Kraft eines solchen Systems darstellen. Am Ende der Diffusion steht ein Konzentrations- oder Potentialausgleich.

Gegenüber der Diffusion, die unspezifisch und ungerichtet ist, ist der Stofftransport selektiv und gerichtet. Bei einem selektiven, transmembranen Transport gehen Membranproteine eine spezifische Bindung mit den zu transportierenden Zielmolekülen ein, wobei die Größe und die Ladung der Moleküle für den Transportprozeß nicht im Vordergrund stehen.

Diese Form des Stofftransportes wird u.a. von Carriern vermittelt. Der Stofftransport durch Carrier wird induziert durch das Anbinden eines Zielmoleküls. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Carriers, die eine transmembrane Umlagerung des Zielmoleküls bewirkt.

Der aktive Stofftransport von Pumpen unterscheidet sich primär gegenüber dem von Carriern durch den Verbrauch von Energie in Form von ATP (Alberts 2003). Da es sich um einen aktiven Transport handelt, kann er auch gegen ein Konzentrations- oder Potentialgefälle erfolgen, dieses sogar aufbauen.

Die Membranfusion erfolgt ebenfalls enzymatisch vermittelt. Die Funktion der Enzyme besteht bei diesem Transportprozeß in der Ausbildung von Liposomen (Exozytose) oder in der Fusion von Membranen (Endozytose) (Schekman and Orci 1996).

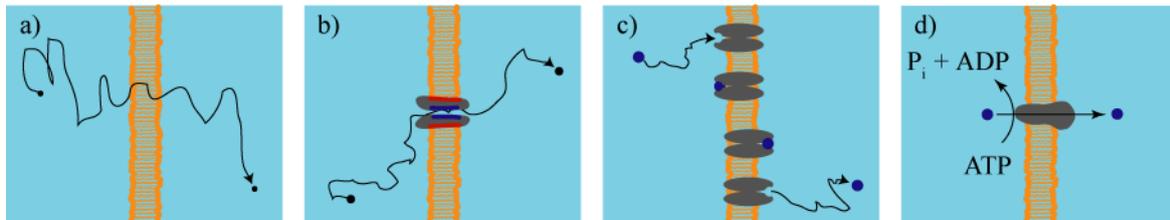


Abbildung 3: Schematische Darstellung der freien Diffusion (a), der erleichterten Diffusion über Kanäle (b) und des spezifischen Stofftransportes über Carrier (c) und Pumpen (d).

Eine wichtige Gemeinsamkeit natürlicher Zellmembranen besteht in der lokalen und spezifischen Funktion transmembraner Proteindomänen. Dadurch wird in einer natürlichen Zellmembran eine funktionelle und strukturelle Membranasymmetrie generiert (Reichstein and Blostein 1975; Sackmann and Lipowsky 1995).

Der Einsatz biologisch enzymatischer Reaktionen erfolgt in der Bioverfahrenstechnik durch die Verwendung ganzer Zellen im Fermenter. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß alle zellulären Enzyme vorhanden und aktiv sind. Es werden Produkte aller zellulären Prozesse hergestellt, die sich entweder im Fermentationsansatz oder innerhalb der Zelle befinden. Die Produktgewinnung erfordert daher stets als ersten Schritt die Abtrennung der Zellen und als zweiten Schritt die Aufreinigung des Produktes. Die Abtrennung der Zellen kann durch ihre Immobilisierung, z.B. innerhalb eines Alginat-Trägers, vereinfacht werden (Pilkington, Margaritis et al. 1998). Die Steuerung der Zellprozesse kann aber nie so reduziert werden, daß nur ein Produkt hergestellt wird (Melin 2007).

Eine Analyse der Produktionskosten eines handelsüblichen Proteins zeigt, daß die Aufreinigungskosten ca. 50-90% der Gesamtkosten betragen (Kawai, Saito et al. 2003). Daher bietet die Optimierung der Aufreinigungsprozesse das höchste Potential Kosten zu reduzieren.

Die Nachteile der konventionellen Verwendung von Zellen in der Bioverfahrenstechnik können durch den Einsatz von Zellmembranen minimiert werden. Um die Funktion natürlicher Zellmembranen in Bezug auf die Aufreinigung einfach und technisch konventionell ausnutzen zu

können, können diese auf einer Festkörperoberfläche immobilisiert werden. Durch die Immobilisierung wird die Lipidmembran stabilisiert und die Trennung von ungebundenen Membranen und produktenthaltendem flüssigem Medium vereinfacht.

Ein Nachteil des Einsatzes von Festkörpern liegt im geringen Abstand von ca. 1 - 3 nm zwischen der Lipidmembran und der Festkörperoberfläche (Bayerl and Bloom 1990; Johnson, Bayerl et al. 1991). Viele transmembrane Proteine ragen mehrere nm aus der Lipidmembran heraus, weshalb es zu einem Festkörperkontakt kommen kann. Dadurch kann die Funktion natürlicher Membranen zerstört werden, sei es durch Denaturierung der Membranproteine (Leckband and Israelachvili 2001) oder durch unterbundenen Stofftransport (Melin 2007; van den Berg and Wessling 2007).

Ein biotechnologisch sehr großer Vorteil der Immobilisierung von Membranen liegt im Öffnen der geschlossenen Zellmembran. Wie schon erwähnt, besitzt die Zellmembran eine funktionelle und strukturelle Asymmetrie. Durch kontrolliertes und gelenktes Aufspreiten können spezifische und lokale Funktionen transmembraner Proteine der P- und S-Seite gezielt ausgenutzt werden (Tanaka, Kaufmann et al. 2001; Daley, Rapp et al. 2005; Tutus, Rossetti et al. 2008).

Im biotechnologischen Idealfall erfolgt die enzymatische Katalyse in einer kompartimentierenden, festkörpergestützten Zellmembran (Biomikroreaktor). Dabei wird das Produkt über die Membran transportiert, wodurch es zur Trennung von Edukten und Produkten kommt. Dieser Idealfall minimiert die Aufreinigung, da einerseits nicht die gesamte Enzym-Ausstattung einer Zelle vorhanden und aktiv ist, andererseits die Produkte in ein durch die Membran getrenntes Medium überführt werden. Zudem muß betont werden, daß natürliche Membranproteine innerhalb ihrer natürlichen Lipidmembran sich in einer idealen „Membranumgebung“ befinden. Technische Anwendungen biologischer Membranprozesse müssen daher folgende Attribute erfüllen:

1. hochselektiv,
2. produktschonend,
3. einfach handhabbar und
4. kosteneffizient

Bisher eingesetzte Techniken in der Bioverfahrenstechnologie erfüllen nicht alle erwähnten Anforderungen. Nachfolgend werden einige Beispiele für die technische Imitation von biologischen Membranen beschrieben.

Die Filtration stellt einen rein physikalischen Aufreinigungsprozeß für flüssige Gemische dar, wobei der Trennmechanismus auf der Diskriminierung von variierenden Größen basiert. Als Filtrationsmethode gibt es Oberflächenfilter und Tiefenfilter. Oberflächenfilter besitzen Poren mit enger Größenverteilung. Dementsprechend werden Moleküle größer als der Porendurchmesser auf der Filteroberfläche zurückgehalten (molecular weight cut off). Tiefenfilter weisen eine

schwammartige Struktur auf. Die Auftrennung erfolgt bei der Passage des Gemisches innerhalb des Filterkörpers (stationäre Phase) (Melin 2007).

Ein weiteres Beispiel für einen physikalischen Aufreinigungsprozeß ist die Phasenübergangs-Chromatographie. Dabei werden immobilisierte Membranen auf Partikeln eingesetzt und damit die elektrostatische Interaktion zwischen der Lipidmembran und Proteinen in Lösung ausgenutzt. So wurde von Loidl-Stahlhofen et al. (Loidl-Stahlhofen, Kaufmann et al. 1996) gezeigt, daß ein Lipidgemisch aus einem ungeladenen und einem negativ geladenen Lipid auf einem porösen Silicapartikel imstande ist, bei einer Temperaturabnahme unter die Phasenübergangstemperatur eine Phasenänderung zum kristallinen („festanalogen“) Phasenzustand durchzuführen (Naumann, Brumm et al. 1992). Dabei kommt es zur Ausbildung von negativ geladenen Mikro-Domänen innerhalb der Lipidmembran. Diese bilden im Gegenzug eine entsprechend große Interaktionsfläche aus, um positiv geladene Proteine aus einem Eluat zurückzuhalten. Die Elution des zurückgehaltenen Proteins erfolgt durch Erhöhung der Temperatur über die Phasenübergangstemperatur, wodurch die Mikro-Domänen aufgelöst werden. Dabei gehen die elektrostatischen Interaktionen verloren, wodurch die Proteine eluiert werden können. (Dieser Prozeß ist analog einer Ionenaustausch-Chromatographie)

Das Prinzip der erleichterten Diffusion wird durch ein Pertraktionssystem mit einem porösen Träger technisch imitiert. Innerhalb des porösen Trägers wird eine Flüssigkeitsmembran durch Kapillarkräfte festgehalten. Diese Flüssigkeitsmembran ist mit den beiderseitigen flüssigen Medien nicht dispergierbar (Abbildung 4). Der Aufreinigungsmechanismus kann entweder über das Lösungsvermögen des Permeanden innerhalb der Membran gesteuert werden oder aber über den Einsatz von Carriern (nicht zu verwechseln mit biologischen Carriern), die den Permeanden spezifisch binden und transmembran transportieren (Noble, Koval et al. 1989; Noble and Stern 1994).

Ein großer Nachteil von Pertraktionssystemen besteht in ihrem strukturellen Aufbau. So muß ein Träger hergestellt werden, der stabil und porös ist und gleichzeitig von zwei nicht dispergierbaren Flüssigkeiten benetzt werden kann. Die flüssige Membran sollte zudem produktschonend sein und eine hohe Löslichkeit für den Permeanden aufweisen. Beim Einsatz von Carriern muß deren Effektivität und Spezifität in der flüssigen Membran garantiert sein. Beim carrier-vermittelten Transport muß zusätzlich berücksichtigt werden, daß mit steigendem transmembranen Gradienten eine Sättigungsgrenze erreicht wird und das System dadurch limitiert ist.

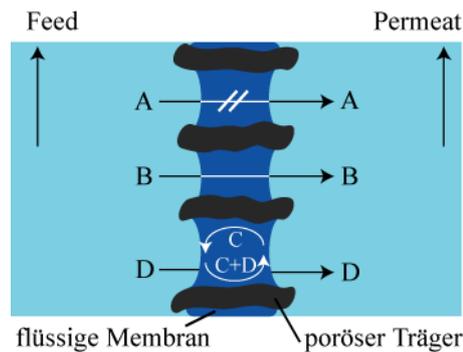


Abbildung 4: Funktionsweise von Pertraktionssystemen zur Imitierung der erleichterten Diffusion. Das obere Beispiel verdeutlicht die Selektivität der flüssigen Membran, die durch die Löslichkeit (unlöslich) des Analyten A ausgebildet wird. Das mittlere Beispiel zeigt den transmembranen Transport bedingt durch die Löslichkeit eines Analyten B in der flüssigen Membran. Das untere Beispiel beschreibt den Einsatz von Carriern (C), die über die flüssige Membran Analyt D transportieren.

Das Prinzip der spezifischen Aufreinigungsprozesse wird z.B. in der Affinitäts-Chromatographie angewendet und erfordert das Vorhandensein eines Bindungspaares wie Protein und Ligand, Antikörper und Antigen oder Enzym und Substrat. Eine Komponente des Bindungspaares wird funktionell an eine inerte Oberfläche gebunden. Anschließend wird die Probe mit dem Zielmolekül über die Oberfläche gespült, an der nur das Zielmolekül bindet und zurückgehalten wird. Durch Variation der Pufferkonditionen kann anschließend das Zielmolekül eluiert werden.

Die Limitierung der Affinitäts-Chromatographie beginnt mit der Kenntnis von Bindungspaares, dementsprechend sind Zielmoleküle ohne bekannten Bindungspartner nicht trennbar. Außerdem muß das Trägermaterial funktionalisierbar sein, um einen Bindungspartner funktionell und zugänglich auf einer chemisch wie mechanisch stabilen Oberfläche immobilisieren zu können.

Die Nachteile technischer Methoden können durch den Einsatz von biologischen Wechselwirkungen in Bezug auf Effizienz, Selektivität und Produktschonung übertroffen werden. Hieraus ergibt sich der Einsatz von biologischen Membranen mit ihren jeweiligen biologischen Wechselwirkungen (beispielsweise Protein-Ligand-Interaktionen).

Derzeit werden, hauptsächlich zur Imitierung von biologischen Membranen, folgende Modell-Systeme verwendet:

1. Langmuir Monolagen
2. Black Lipid Membranen
3. Liposomen

Biologische Membranen sind, wie bereits erwähnt, komplexe Gemische verschiedener Lipide, Proteine und Kohlenhydrate. Modell-Membranen werden dagegen nur aus wenigen Komponenten hergestellt, um den Einfluß jeder Komponente gezielt testen, variieren und analysieren zu können (Tempel, Goldmann et al. 1994).

Langmuir Monolagen bestehen aus einem einschichtigen Lipidfilm an der Luft-Wasser-Grenzfläche (Abbildung 5). Man nutzt dabei den amphiphilen Charakter von Lipiden: Diese richten sich an der Luft-Wasser-Grenzfläche entsprechend ihrer Polarität aus (Möhwald 1990; McConnell 1991; Menger, Chlebowski et al. 2005). Mit Hilfe einer Filmwaage als Barriere können die Lipide zu einer Monolage mit Oberflächenrücken entsprechend der einer natürlichen Zellmembran komprimiert werden (Albrecht, Gruler et al. 1978). In einem weiteren Schritt können Membranproteine in die Subphase gegeben werden und ihr Einfluß auf die Änderungen der Oberflächenspannung der Lipidmembran kann analysiert werden (Bougis, Rochat et al. 1981; Maget-Dana 1999).

Ein Nachteil der Langmuir Monolagen besteht darin, daß sie keine natürlichen Zellmembranen mit zwei Lipidlagen ausbilden. Es wird also keine vollständige Zellmembran imitiert, weshalb auch keine transmembranen Stofftransporte oder Effekte untersucht werden können. Es sind nur Analyte mit Effekten auf die Struktur der Lipidmembran prüfbar. Weitere Nachteile der Monolagen bestehen in ihrer mechanischen Instabilität gegenüber Schwingungen und in der limitierten Anzahl von Meßmethoden, die auf der Luft-Wasser-Grenzfläche eingesetzt werden können.

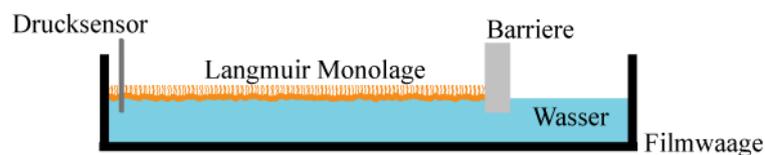


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Langmuir Monolage. Der Langmuirtrog (Filmwaage) besteht aus einer Wanne und Barriere, die aus einem hydrophoben Material wie z.B. Teflon hergestellt werden. Mit der beweglichen Barriere kann die Monolage auf der Luft-Wasser-Grenzfläche komprimiert werden. Die Oberflächenspannung der komprimierten Monolage wird mit dem Drucksensor (Wilhemmy Plättchen) gemessen.

Eine weitere Möglichkeit Lipidmembranen zu untersuchen sind Black Lipid Membranen (BLM) (Müller, Rudin et al. 1962). Hierbei wird ein hydrophober Träger mit einer Lochblende (Durchmesser im  $\mu\text{m}$  Bereich) in einen Flüssigkeitsbehälter eingetaucht (Abbildung 6). Dabei entstehen zwei Kammern, die über die Lochblende verbunden sind. Anschließend werden in einem viskosen Lösungsmittel gelöste Lipide auf die Lochblende aufgebracht. Während sich das viskose Lösungsmittel im Wasser löst, bildet sich ein Lipidfilm auf der Lochblende. Dieser trennt im Folgenden beide Flüssigkeitskammern (Latorre, Ehrenstein et al. 1972).

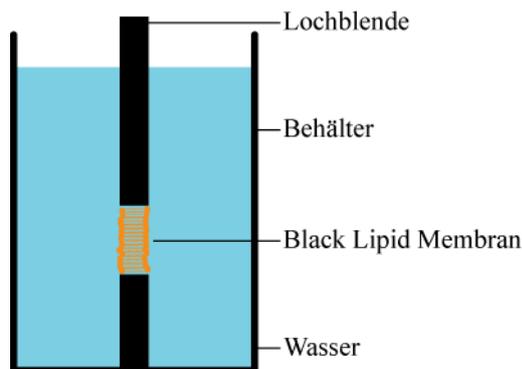


Abbildung 6: Black Lipid Membranen besitzen eine Lochblende als Stützstruktur, die in ein wäßriges Medium eingetaucht ist. Die Lipide werden in einem dickflüssigen Lösungsmittel gelöst und können daher über die Lochblende aufgebracht werden. Beim Auflösen des Lösungsmittels bildet sich die Black Lipid Membran innerhalb der Lochblende aus, wodurch beide Flüssigkeitskammern getrennt werden.

Dieser Aufbau ermöglicht die Kompartimentierung zweier Flüssigkeitskammern. Die Lipidmembran besitzt einen großen Widerstand und eine große Kapazität (einige Gigaohm und einige Microfarad), die es erlauben, den transmembranen Ionen- oder Stofftransport elektrisch beziehungsweise chemisch nachzuverfolgen. Zudem besteht die Möglichkeit, in den Lipidbilayer Membranproteine (Müller and Rudin 1968) wie Poren und Kanäle einzubauen, über die der enzymatisch vermittelte Stofftransport verfolgt werden kann (Thompson 1967; Shamoo and MacLennan 1974; Schindler 1980; Wardak, Brodowski et al. 2000).

Ein Nachteil der BLM besteht darin, daß Proteine nachträglich in die BLM per Proteoliposomenfusion rekonstituiert werden. Die Fusion der Proteoliposomen und der BLM erfolgt dadurch ungerichtet, die Orientierung von Proteinen kann nicht kontrolliert werden. Ein weiterer Nachteil der BLM ist, daß bei ihrer Herstellung apolare Lösungsmittel für die Lipide eingesetzt werden. Diese Lösungsmittel können als inverse Mizellen zwischen den Monolayern eingeschlossen werden und dadurch die Funktion der transmembranen Proteine beeinträchtigen. Zudem schränken die Lokalisation der BLM auf einem hydrophoben Material und ihre beschränkte Größe (Durchmesser im  $\mu\text{m}$  Bereich) die einsetzbaren, physikalischen Meßmöglichkeiten drastisch ein.

Schließlich können Membran-Modell-Systeme durch ca. 20 nm bis zu einige hundert Mikrometern große geschlossene, freischwimmende Liposomen (Abbildung 7) untersucht werden. Sie bieten die Möglichkeit, Lipidmembranen entkoppelt von Grenzflächen (Langmuir Monolagen) oder Oberflächen (BLM) zu untersuchen (Sackmann and Lipowsky 1995; Menger, Chlebowsky et al. 2005). Wegen ihres Aufbaus und ihrer Größe ähneln sie einer Zelle und können daher als Zell-Modell-System eingesetzt werden.

Ihre Herstellung erfolgt durch Dispersion getrockneter Lipide in einem wäßrigen Medium. Durch die Verwendung verschiedener Lipide können Zusammensetzungen verschiedener Zellmembranen

nachgebaut werden. Zudem können während der einfachen Präparation Zusätze wie z.B. Cholesterol dem System zugegeben und deren Effekt auf die Membran untersucht werden. Es besteht außerdem die präparative Möglichkeit, die Größe der Liposomen effektiv und quantitativ zu steuern und somit präzise unterschiedlich große Zell-Modell-Systeme herzustellen (Hoppe and Sebald 1984).

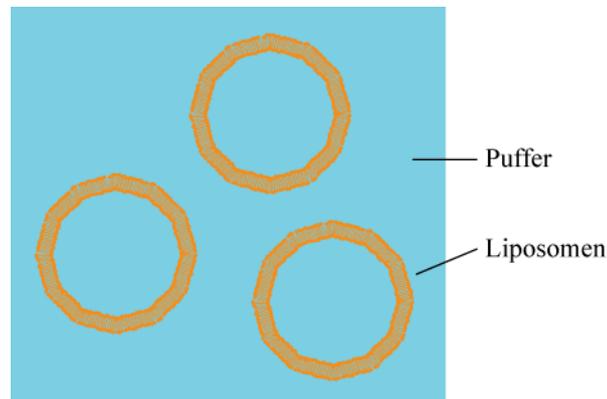


Abbildung 7: Liposomen sind zweilagige, sphärische Lipidmembranen, die im wässrigen Medium gelöst vorkommen. Aufgrund ihres Aufbaus eignen sie sich gut als Zell-Modellsysteme. Zudem kann die Größe und die Lipidzusammensetzung von Liposomen effektiv gesteuert werden, wodurch verschieden große Zellsysteme imitiert werden können.

Durch Zentrifugation lassen sich Liposomen in einen zweiten Puffer überführen, wobei der äußere Puffer variiert werden kann. Dadurch werden bezüglich ihres Inhaltes „beladene“ Liposomen (Lasic, Frederik et al. 1992; Walker, Kennedy et al. 1997) hergestellt, die in der Medizin zum Einschleusen von Pharmazeutika (Depotwirkung) eingesetzt werden (New, Chance et al. 1978; Storm, Roerdink et al. 1987). Ein Nachteil beladener Liposomen liegt darin, daß sie nach ihrer Applikation vom Immunsystem erkannt und zerstört werden (Sackmann and Lipowsky 1995). Darüber hinaus zeigen Liposomen die Tendenz zu fusionieren (Chiruvolu, Walker et al. 1994; Leckband and Israelachvili 2001), wobei sich ihre Größe verändert und sie nicht mehr als ein Zell-Modell-System eines bestimmten Zelltyps wirken können.

Die beschriebenen Zell-Modell-Systeme benötigen, um biologische Funktionen ausüben zu können, die Existenz von transmembranen Proteinen. Dabei werden transmembrane Proteine detergensvermittelt in Membranen eingebaut. Aufgrund der ungerichteten, zufälligen Orientierung rekonstituierter Transmembranproteine (Mazer, Benedek et al. 1980) geht die natürlich vorkommende Membranorientierung im Zell-Modell-System verloren. Sie können deshalb nur eingeschränkt als Zell-Modell-Systeme dienen.

Eine Möglichkeit, die Nachteile der Langmuir Monolagen, der BLM und der Liposomen zu umgehen, ist die Immobilisierung von Membran-Modellen auf planaren Festkörperoberflächen.

Eine Festkörperoberfläche gibt der Lipidmembran mechanische Stabilität und erhält ihre Fluidität (Tamm and McConnell 1985; Plant 1993; Groves and Dustin 2003). Die Immobilisierung auf Festkörperoberflächen ermöglicht aufgrund dieser Eigenschaften den Einsatz zahlreicher oberflächensensitiver Meßmethoden wie z.B. die Bestimmung der Topographie (RKM), des Dichteprofiles (Neutronenstreuung), des Abstandes zwischen der Membran und der Oberfläche (Röntgenstreuung), der Zusammensetzung (chemische Analysen), der Membranorientierung (Antikörpermarkierung) und der Fluidität (FRAP) (Sackmann and Tanaka 2000).

Wie zuvor erwähnt, befindet sich zwischen einer immobilisierten Membran und der Festkörperoberfläche ein ca. 1 - 3 nm dicker Wasserfilm (Bayerl and Bloom 1990; Johnson, Bayerl et al. 1991). Dieser Abstand ist jedoch zu gering (Abbildung 8), um den Kontakt von transmembranen Proteinen und der Festkörperoberfläche zu verhindern, was zu deren eventueller Denaturierung führen kann (Sackmann and Bruinsma 2002; Goennenwein, Tanaka et al. 2003; Purruicker, Gonenwein et al. 2007).

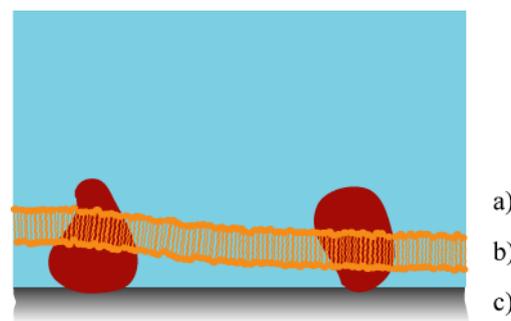


Abbildung 8: Transmembrane Proteine (a) in einer Lipidmembran (b) ragen mehrere nm aus der Lipidmembran hervor. Da sich zwischen der Lipidmembran und der Festkörperoberfläche (c) ein ca. 1 - 3 nm hoher Wasserfilm befindet, können transmembrane Proteine die Festkörperoberfläche berühren und eventuell denaturieren.

Zudem veranschaulicht dieses Modell den unterbrochenen Stofftransport über den dichten Festkörper sowie das geringe Volumen des Wasserfilms, der bei einem unterbundenen Stofftransport als Reservoirvolumen dienen würde.

Um die oben beschriebenen Nachteile der Modell-Systeme zu umgehen, wurden in dieser Arbeit alternative Methoden wie die Oberflächenbeschichtung mit hydrophilen, biokompatiblen Polymerschichten (Sackmann 1996; Sackmann and Tanaka 2000; Tanaka and Sackmann 2005) und poröse Oberflächen (Kansy, Senner et al. 1998) eingesetzt (Abbildung 9). Bei diesen Methoden werden die Membranproteine von der Oberfläche entkoppelt und behalten ihre natürliche Konformation bei (Salafsky, Groves et al. 1996; Baksh, Jaros et al. 2004).

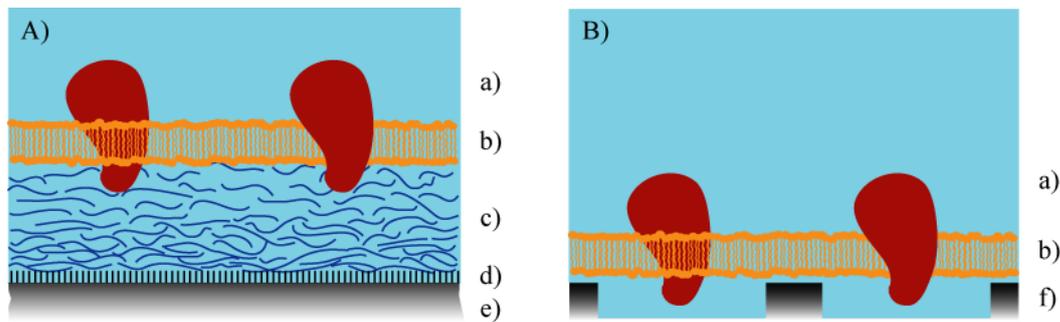


Abbildung 9: Schematische Darstellung von Systemen zur funktionellen Immobilisierung von festkörpergestützten, transmembranen Proteinen (a) rekonstituiert in Lipidmembranen (b) auf Festkörperoberflächen. In Skizze A) sind Polymerfilme (c) auf einer Silanmonolage (d) dargestellt, die als hydrophile, biokompatible Zwischenschichten fungieren und dadurch transmembrane Proteine von der dichten Festkörperoberfläche (e) entkoppeln. Darstellung B) zeigt eine poröse Oberfläche (f), die von der Lipidmembran (b) überspannt wird. Transmembrane Proteine (a), die sich oberhalb der Poren befinden, bleiben von der Festkörperoberfläche unbeeinträchtigt.

Die Beschichtung einer Festkörperoberfläche mit biokompatiblen Polymeren (Abbildung 9.A) kann mit Hilfe eines Langmuir-Blodgett Transfers auf einer Filmwaage erfolgen. Diese Technologie bietet den großen Vorteil, daß der mittlere, laterale Abstand der Polymere durch Änderung des Oberflächendrucks während des Langmuir-Blodgett Transfers sowie die Schichtdicke in Abhängigkeit der Anzahl der transferierten Monolagen präzise kontrolliert werden kann. Damit läßt sich der Abstand zwischen der immobilisierten Membran und der Festkörperoberfläche so einstellen, daß eine native und fluide Immobilisierung der Membran ermöglicht wird (Rehfeldt and Tanaka 2003). Biokompatible Zellulosepolymere können für die Immobilisierung künstlicher (Hillebrandt 1999, Purucker 2007, Tutus 2008) und natürlicher Zellmembranen eingesetzt werden (Tanaka, Kaufmann et al. 2001; Tanaka, Wong et al. 2004; Kaufmann, Weiss et al. 2007). Solche hydrophilen Polymerschichten können aus Materialien wie Proteine der Extrazellulären Matrix (Kollagen, Laminin) (Comper 1996) oder Kohlenhydraten wie Dextran oder Polyethylenglykol (Harris 1992) aufgebaut sein.

Eine weitere Strategie zur Entkopplung der Membran von der Festkörperoberfläche ist der Einsatz von porösen Oberflächen. Jede Lipidmembran besitzt eine charakteristische Biegespannung. Ist die Biegespannung hoch oder der Abstand der Oberflächenstrukturen klein, kann die Lipidmembran den Oberflächenstrukturen (z.B. Porenoberfläche) nicht folgen (Abbildung 9.B) (Swain and Andelman 1999). Die Lipidmembran kommt dann nur an den Porenrändern mit dem Festkörper in Kontakt und überspannt die Porenoberfläche, weshalb Membranproteine über den Poren ihre native Struktur und Aktivität beibehalten (Moya, Donath et al. 2000).

Zudem bietet die Immobilisierung auf Zellulosekissen und porösen Partikeln prozeßtechnisch den Vorteil, daß im Zellulosefilm und innerhalb der porösen Partikel ein vergrößertes Reservoir für den Stofftransport zur Verfügung steht.

Die beschriebenen Techniken zeigen auf, daß bezüglich der funktionellen Immobilisierung transmembraner Proteine, des Stofftransportes über den Festkörper (Unterlage), der Handhabung und der Steigerung der eingesetzten Membranfläche noch Optimierungsbedarf besteht. Das Ziel dieser Arbeit ist es,

1. eine einfache Immobilisierungstechnik mit dem Schwerpunkt, eine große Membranfläche pro Volumen einzusetzen, und
2. die natürliche Fluidität der Lipidmembran sowie die natürliche Proteinaktivität transmembraner Proteine auf einer Festkörperoberfläche zu erhalten.

Dazu wurden künstliche Modell-Membranen, natürliche Zellmembranen und natürliche Organellmembranen eingesetzt und auf planaren oder sphärischen, porösen Oberflächen charakterisiert.

<b>Membran-System</b>	<b>Oberfläche</b>
künstliche Modell-Membran Lipidmembran mit F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP-Synthase	planare, modifizierte Oberfläche
natürliche Zellmembran Erythrozyten Ghostzellen	gekrümmte, unmodifizierte Oberfläche
natürliche Organellmembran Sarkoplasmatisches Retikulum	gekrümmte, unmodifizierte Oberfläche

Die Arbeit ist in drei Schwerpunkte untergliedert. Der erste experimentelle Teil beschreibt, wie der asymmetrische, transmembrane Enzymkomplex F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase aus *Micrococcus lysodicticus* in künstliche Liposomen gerichtet rekonstituiert wird, um asymmetrische Membran-Modell-Systeme herzustellen. Anschließend wird dieses Membransystem auf planaren Festkörperoberflächen immobilisiert, mit dem Ziel, die Oberfläche vollständig zu beschichten und die hergestellte Membranasymmetrie auf der Festkörperoberfläche beizubehalten.

Im zweiten experimentellen Teil wird die Kinetik und die Qualität einer einfachen Partikelbeschichtung (1-Schritt Mechanismus) mit Ghostzellmembranen untersucht. Für die Beschichtung werden sphärische, poröse Silicapartikel mit konstanter Porengröße (1000 Å), aber unterschiedlichen Durchmessern (5 µm, 10 µm und 30 µm) eingesetzt. Ghostzellen besitzen die Eigenschaft, nach der Präparation ihre native Membranorientierung beizubehalten. Die eindeutige Membranorientierung der Ghostzellen erlaubt es, den Aufspreitmeechanismus der Ghostzellen bestimmen zu können (Tanaka, Kaufmann et al. 2001). Die eindeutige Membranorientierung wurde

durch Antikörpermarkierung der Membraninnenseite wie Membranaußenseite spezifisch nachgewiesen (Kaufmann and Tanaka 2003). Mit der monodispersen Größenverteilung der Ghostzellen konnte der Einfluß der Partikelgröße auf die Partikelbeschichtung und damit der Kontaktwinkel zwischen der Zellmembran und der Festkörperoberfläche bestimmt werden.

Im dritten experimentellen Teil wird die Proteinaktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) immobilisiert auf unbehandelten Silicapartikeln bestimmt. Die Hauptproteinkomponente der SR Membran ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit ca. 70% des Gesamtproteingehaltes (MacLennan and Holland 1975; Inesi 2003). Die Funktionsweise der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erlaubt es, die Proteinaktivität mit einer einfachen Phosphatanalyse quantitativ zu bestimmen und damit eine funktionelle Immobilisierung nachzuweisen. Aufgrund der hohen Dichte der Silicapartikel lassen sich diese leicht durch Sedimentation von in Lösung befindlichen, ungebundenen SR-Fragmenten trennen. Zudem stabilisieren die Partikel die SR-Membran auf ihrer Oberfläche. Die so beschichteten Partikel lassen sich in eine Chromatographiesäule füllen. In der Säule können durch einfachen Puffertausch die Reaktionsbedingungen präzise reguliert und katalytisch freigesetzte Produkte abgetrennt werden. Der Einsatz der Chromatographiesäule bietet zudem den Vorteil, daß die Säule durch bekannte scale-up Prozesse verschiedenen technischen Anforderungen leicht angepaßt werden kann.



# 1. Immobilisierung von asymmetrischen, künstlichen Membran-Modell-Systemen auf hydrophilen, biokompatiblen Zelluloseschichten auf planaren Oberflächen<sup>1</sup>

## Zusammenfassung

Das Ziel dieses Kapitels ist die uni direktionale Rekonstitution stark asymmetrischer Proteine in Liposomen mit dem Ziel, sie gerichtet auf eine Festkörperoberfläche zu immobilisieren. Dieses Verfahren erlaubt es, mit Hilfe der Asymmetrie eines rekonstituierten transmembranen Proteins ein asymmetrisches, artifizielles Proteoliposom herzustellen und dessen Membranorientierung nach der Immobilisierung zu untersuchen. Die  $F_0F_1$  ATP-Synthase aus *Micrococcus lysodicticus* wurde in einem schwachen Detergens solubilisiert und in kleine, uni lamellare Liposomen ( $\varnothing = 60$  nm) eingebaut. Die Proteinrekonstitution erfolgte in intakte Liposomen, was mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung gezeigt wurde. Auf eine Oberfläche beschichtet mit einem biokompatiblen ultradünnen Zellulosefilm (Höhe ca. 5 - 10 nm) wurde die Proteoliposomenmembran aufgespreitet und deren Homogenität mit Membran- und Proteinmarkierung dargestellt. Die Membranorientierung auf der Festkörperoberfläche wurde mit Antikörpermarkierung der ATP-Bindestelle und Rasterkraftmikroskopie bestimmt. Somit konnte gezeigt werden, daß die Proteoliposomenmembran unidirektional und homogen immobilisiert wurde und daß die ATP Bindestelle ihre native Konformation bei der Proteinaufreinigung, Rekonstitution und Immobilisierung beibehalten hat.

---

<sup>1</sup>Murat Tutus, Fernanda F. Rossetti, Emanuel Schneck, Giovanna Fragneto, Friedrich Förster, Ralf Richter, Thomas Nawroth and Motomu Tanaka

„Orientation-Selective Incorporation of Transmembrane  $F_0F_1$  ATP Synthase Complex from *Micrococcus luteus* in Polymer-Supported Membranes”, *Macromolecular Bioscience*, 2008, **8**, 1034

## Einleitung

Die Verwendung katalytischer Funktionen transmembraner Proteine erfordert die Berücksichtigung der Asymmetrie transmembraner Proteine innerhalb der Lipidmembranen. Die Asymmetrie der transmembranen Proteine beinhaltet unterschiedliche Proteinfunktionen entsprechend der Proteindomänen. Als Modell-System wurde der transmembrane Enzymkomplex  $F_0F_1$  ATP-Synthase aus *Micrococcus lysodicticus* ausgewählt, da er eine starke Asymmetrie aufweist, bestehend aus einem transmembranen  $F_0$ -Komplex, der in der Lipidmembran sitzt und einer  $F_1$ -Kopfgruppe, die einen Durchmesser von ca. 10 nm hat und aus der Lipidmembran herausragt (Boyer 1997).

Die Stabilität der Lipidmembran erfordert deren Dispersion in einem wäßrigen Medium. Zur einfachen Handhabung von Proteoliposomenmembranen wurden diese auf Festkörperoberflächen immobilisiert. Die unmittelbare Immobilisierung transmembraner Proteine auf Festkörperoberflächen kann zu deren Denaturierung führen (Bayerl and Bloom 1990; Sackmann and Bruinsma 2002; Tanaka and Sackmann 2005). Um Proteoliposomenmembranen von der Festkörperoberfläche zu entkoppeln, wurde die Festkörperoberfläche mit einem hydrophilen, biokompatiblen ultradünnen Zellulosefilm beschichtet (Rehfeldt and Tanaka 2003).

Aufgereinigte  $F_0F_1$  ATP-Synthase, stabilisiert in einem schwachen Detergens (TDOC), wurden unidirektional in artifizielle Liposomen rekonstituiert und gerichtet auf planaren biokompatiblen Zellulosefilmen immobilisiert (Nawroth, Conrad et al. 1989; Nomura, Nagata et al. 2001; Tutus, Rossetti et al. 2008). Die Homogenität der immobilisierten Membran wurde mit Membran- und Proteinmarkierung nachgewiesen. Die eindeutige und gerichtete Rekonstitution der  $F_0F_1$  ATP-Synthase in die Liposomen konnte nach der Immobilisierung auf Zellulosefilmen durch Immunofluoreszenzmarkierung und Rasterkraftmikroskopie eindeutig gezeigt werden (Tutus, Rossetti et al. 2008). Durch die Wahl des Antikörpers gegen das aktive Proteinzentrum der  $F_0F_1$  ATP-Synthase wurde gezeigt, daß die immobilisierte ATP-Synthase ihre native Form beibehalten hat.

## 1.1 Materialien

### 1.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (München, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Reinstwasser (Millipore, Molsheim, Frankreich) mit einem spezifischen Widerstand  $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$  wurde benutzt.

Das Lipid 1-Stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (SOPC) (Abbildung 1.1.a) sowie das an der Alkylkette fluoreszenzmarkierte Lipid 1-Oleoyl-2-[12-[7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl] amino] dodecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (NBD-PC) (Abbildung 1.1.b) wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) bezogen.

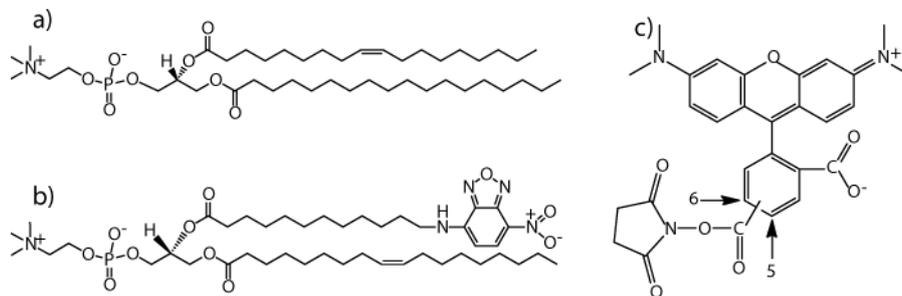


Abbildung 1.1: a) zeigt die Strukturformel von SOPC. b) zeigt die Strukturformel des Alkylketten markierten Lipids NBD-PC. TAMRA-SE c) wurde zur unspezifischen Fluoreszenzmarkierung der ATP-Synthase eingesetzt.

In der Aufreinigung der  $F_0F_1$  ATP-Synthase wurden die Detergenzien 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonat (CHAPS), alpha-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl]-omega-hydroxypoly (oxy-1,2-ethanediyl) (Triton X-100), reduziertes Triton RX-100 und 2-[(3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-24-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-yl] amino) ethanesulfonsäure (TDOC) eingesetzt.

Die unspezifische Fluoreszenzmarkierung der  $F_0F_1$  ATP-Synthase erfolgte mit dem Farbstoff 5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin Succinimidyl Ester (TAMRA-SE, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) (Abbildung 1.1.c). Die ATP-Synthase wurde mit einem monoklonalen Maus-Antikörper (Chemicon, Temecula, USA) gegen die ATP Bindestelle markiert. Mit einem polyklonalen Ziege-anti-Maus Antikörper, konjugiert mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), wurde der erste Antikörper nachgewiesen. Die

Proteoliposomenmembran wurde mit Rinderserum Albumin (RSA, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gesättigt.

Die Funktionalisierung der Glassubstratoberflächen erfolgte mit Octadecyltrimethylsilan (ODTMS, ABCR, Karlsruhe, Deutschland). Trimethylsilylzellulose (TMSZ) wurde aus Zellulosepulver (M.W. ~ 25 kDa, Fluka, Taufkirchen, Deutschland) hergestellt.

In der Bestimmung der Lipidkonzentration wurden Reinstwasser, Perchlorsäure, Ammoniummolybdat und Ascorbinsäure eingesetzt.

### **1.1.2 Festkörperoberflächen**

Objektträger und Deckgläschen (Assistent, Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland) aus Borosilikatglas wurden bei VWR (Ismaning, Deutschland) erworben. Silizium Wafer (Si 100) waren eine Spende von Wacker Chemie (München, Deutschland). Polierte Siliziumblocks (Si 100) wurden von Holm Siliciumbearbeitung (Tann, Deutschland) bezogen.

## 1.2 Methoden

### 1.2.1 RCA-Reinigung der Festkörperoberflächen

Alle Festkörper wurden nach einer verkürzten RCA (Radio Corporation of America) Methode gereinigt (Kern and Puotinen 1970). Bei der RCA-Methode handelt es sich um ein 2-stufiges Verfahren zur Reinigung von Festkörperoberflächen in der Halbleiterphysik. Die erste Reinigungsstufe besteht aus einer stark sauren Wasserstoffperoxidlösung zur Oxidation von organischen Kontaminationen (RCA-Ansatz: 1:1:5 (v/v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) : NH<sub>4</sub>OH (30%) : Reinstwasser). Die zweite Reinigungsstufe besteht aus einem stark basischen Schritt, in dem Metallkontaminationen durch Komplexbildung entfernt werden.

Schritt	RCA-Reinigung
1	in Aceton 3 min im Ultraschall behandeln
2	mit Aceton spülen (1 mal)
3	Schritt 1 & 2 mit a) Ethanol, b) Methanol und c) Reinstwasser wiederholen
4	im RCA-Ansatz 5 min im Ultraschall behandeln
5	30 min bei 60°C inkubieren
6	10 mal mit Reinstwasser spülen
7	im Reinstwasser 3 min im Ultraschall behandeln
8	10 mal mit Reinstwasser spülen
9	30 min bei 70°C erwärmen
10	Trocknen über Nacht im Vakuum

Tabelle 1.1: Schema zur RCA-Reinigung der Festkörperoberflächen. Die RCA-Reinigung wurde auf den ersten, stark sauren Oxidationsschritt zur Entfernung von organischen Kontaminationen gekürzt.

Siliziumwafer und Siliziumblocks wurden gereinigt geliefert. Deckgläschen und Objektträger besitzen ab Werk auf ihrer Oberfläche einen Ölfilm für die einfache Handhabung (organische Kontamination). Da die organische Kontamination die Hauptverschmutzung der Festkörperoberflächen darstellt, wurde die RCA-Reinigung aller Festkörperoberflächen auf den

ersten, stark sauren Oxidationsschritt gekürzt (Tabelle 1.1). Die Reinigung erfolgt in geschlossenen Glasboxen, in denen die Substrate anschließend aufbewahrt wurden.

### 1.2.2 Hydrophobe Funktionalisierung der Festkörperoberflächen

Die Substratoberflächen wurden mit ODTMS hydrophob funktionalisiert, um durch hydrophobe Interaktion der funktionalisierten Zellulosederivate die Oberfläche beschichten zu können. Bei der Silanisierung bilden die Trimethylsilangruppen des ODTMS mit dem Sauerstoff der Hydroxylgruppen der Glasoberflächen eine kovalente Bindung aus und ordnen sich mit ihren Alkylketten zu einer Monolage an (Tabelle 1.2). Die C18-Alkylketten formen dabei einen einschichtigen, dicht gepackten, hydrophoben Film auf den Festkörperoberflächen aus (Mooney, Hunt et al. 1996; Hillebrandt, Tanaka et al. 2002).

Trockene, RCA-gereinigte Substrate wurden in wasserfreies Toluol, Butylamin und ODTMS gegeben. Die Beschichtungsreaktion erfolgte im Ultraschallbad bei 15°C für 30 Minuten. Nach der Beschichtung wurde freies, ungebundenes ODTMS von der Substratoberfläche durch mehrfaches Spülen und Behandeln mit Ultraschall in Toluol und anschließend in Reinstwasser entfernt.

Schritt	Silanisierung
1	94,5 Vol% wasserfreies Toluol zugeben 0,5 Vol% Butylamin zugeben 5 Vol% ODTMS zugeben
2	für 30 min bei 15°C im Ultraschallbad beschichten
3	3 min im Ultraschallbad mit Toluol waschen
4	Spülen mit Toluol (1 mal)
5	10 mal spülen mit Reinstwasser
6	3 min im Ultraschallbad mit Reinstwasser waschen
7	Trocknen über Nacht in Vakuumschrank

Tabelle 1.2: Schema zur hydrophoben Funktionalisierung der Festkörperoberflächen. Die Funktionalisierung der Festkörperoberflächen hat das Ziel, durch hydrophobe Wechselwirkung der Oberflächen mit Zellulosederivate die Festkörperoberfläche zu beschichten.

### 1.2.3 Beschichtung der Festkörperoberflächen mit hydrophilen, biokompatiblen Zelluloseschichten

Das hydrophobe Zellulosederivat TMSZ wurde nach der Methode von Schaub et al. synthetisiert (Schaub, Wenz et al. 1993). Wegen seiner hydrophoben Eigenschaft kann TMSZ an der Luft-Wasser-Grenzfläche aufgespreitet und komprimiert werden. Wegen der hydrophoben Wechselwirkung von TMSZ mit der hydrophob funktionalisierten Festkörperoberfläche kann eine TMSZ Monolage von der Luft-Wasser-Grenzfläche auf die Festkörperoberfläche übertragen werden (Langmuir-Blodgett-Transfer) (Rädler and Sackmann 1997; Rehfeldt and Tanaka 2003).

Anhand einer Elementaranalyse von TMSZ wurde der Substitutionsgrad mit 2,1 bestimmt. Der Substitutionsgrad ist eine Kenngröße zur Angabe des Umsetzungsgrades von polyfunktionellen Polymeren und gibt die Zahl der Substituenten an, die an funktionellen Gruppen ausgetauscht wurden. Bei Zellulose enthält jede Anhydroglucose-Einheit 3 Hydroxygruppen, weshalb der Substitutionsgrad maximal den Wert 3 annehmen kann. Der Substitutionsgrad 2,1 ergab in Wasser unlösliches TMSZ, infolgedessen wurde das TMSZ in hochreinem Chloroform gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

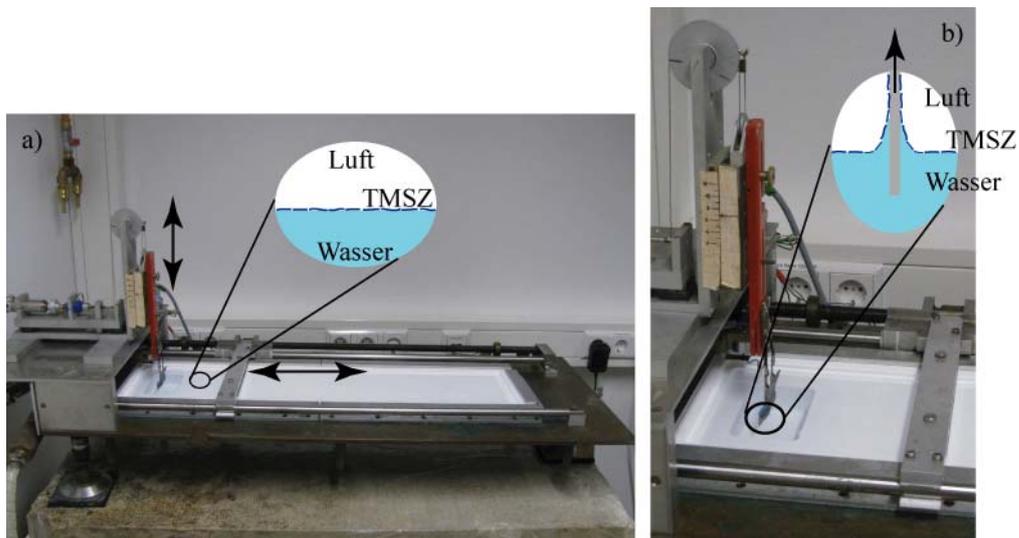


Abbildung 1.2: Bild a) zeigt eine präparative Filmwaage, mit der TMSZ Monolagen auf der Luft-Wasser-Grenzfläche komprimiert wurden. Mit der beweglichen Barriere (horizontaler Pfeil) wurde der Oberflächendruck während der Beschichtung konstant bei  $30 \text{ mN/m}$  gehalten. Die Skizze in Bild a) zeigt die Anordnung der TMSZ Monolage an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Bild b) zeigt eine Vergrößerung des Lifts und den Trog, in den die Substrate während der Beschichtung eintauchten. Mit dem Lift (vertikaler Pfeil Bild a) wurden die Festkörperoberflächen in die wässrige Phase eingetaucht, wodurch ein schichtenweiser Übertrag von TMSZ auf die hydrophobe Glasoberfläche erfolgte.

Für die Beschichtung der hydrophoben Festkörperoberflächen wurden  $100 \mu\text{l}$  der TMSZ-Stammlösung ( $1 \text{ mg/ml}$ ) auf die wässrige Oberfläche ( $1008 \text{ cm}^2$ ) einer selbstgebauten Filmwaage

(Abbildung 1.2.a) bei 20°C aufgespreitet. Anschließend wurde TMSZ an der Luft-Wasser-Phasengrenzfläche auf eine Oberflächenspannung von 30 mN/m komprimiert (Skizze in 1.2.a). Während des Langmuir-Blodgett-Transfers (Abbildung 1.2.b) wurde die Oberflächenspannung konstant gehalten (Druckkonstantmodus) und 10 Monolagen wurden auf die hydrophobe Substratoberfläche transferiert (Skizze in 1.2.b). Der Flächenübertrag von TMSZ betrug 100%. Die hydrophobe Trimethylsilylseitengruppe von TMSZ (Abbildung 1.3.a) wurde auf der Festkörperoberfläche durch Exposition an rauchender HCl abgespalten, wodurch hydrophile Zellulose (Abbildung 1.3.b) chemisch regeneriert wurde. Durch den schichtenweisen Langmuir-Blodgett-Transfer im Druckkonstantmodus und der Regeneration wurden auf den Festkörperoberflächen biokompatible, hydrophile Zellulosefilme (Abbildung 1.3.c) mit konkreten, höhenverstellbaren Schichtdicken und mittleren Abständen der Polymere hergestellt (Rädler and Sackmann 1997; Rehfeldt and Tanaka 2003).

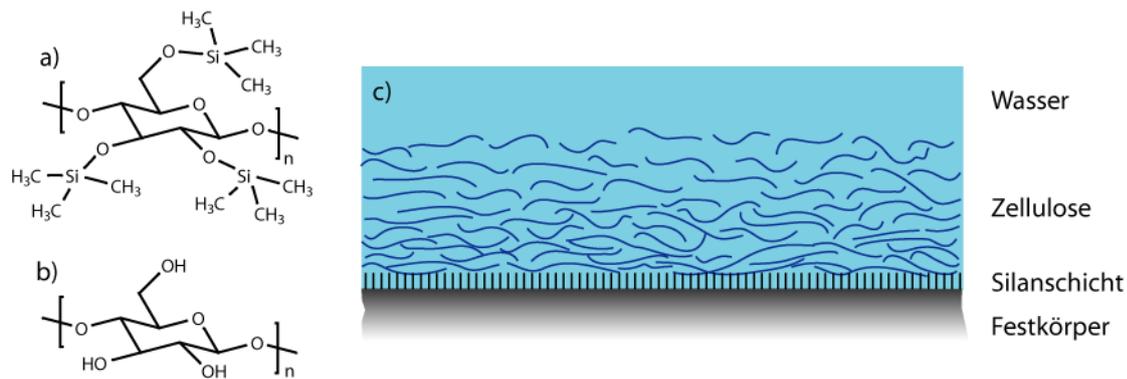


Abbildung 1.3: Strukturformel (a) zeigt die schematische Darstellung eines TMSZ-Monomers, Strukturformel (b) zeigt die der regenerierten Zellulose. Durch Langmuir-Blodgett-Transfer von TMSZ auf die Substratoberfläche und anschließender Regeneration entsteht eine biokompatible, hydrophile Zelluloseschicht auf den Substratoberflächen, deren Höhe wie lateraler Abstand der Polymere präzise kontrolliert werden kann.

#### 1.2.4 Neutronenreflektivität

Die Charakterisierung der festkörpergestützten Zellulosefilme erfolgte durch Neutronenreflektivitätsexperimente. Hierbei wurde die reflektierte Intensität des Neutronenstrahls als Funktion des senkrechten Impulsübertrags ( $q_z$ ) aufgezeichnet (Abbildung 1.4). Die Experimente wurden im „time of flight“-Modus (TOF-Modus) an der Beamline D17 im Institut Laue Langevin (ILL, Grenoble, Frankreich) (Cubitt and Fragneto 2002) von Dr. F. Rossetti und Dipl.-Phys. E. Schneck durchgeführt. Die Messungen erfolgten auf Siliziumblöcken zuerst gegen Luft und anschließend gegen D<sub>2</sub>O.

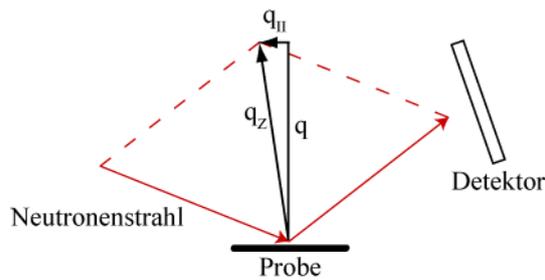


Abbildung 1.4: Strahlengeometrie der Neutronenreflektivität. Neutronenstrahlen treffen auf die beschichtete Substratoberfläche, wo sie auf einen Detektor reflektiert und nachgewiesen werden.

Im TOF-Modus wird  $q_z$  bei festem Reflexionswinkel durch die Wellenlänge der Neutronenstrahlung bestimmt. Aus den Reflexionsintensitäten wurde mit Hilfe des Parratt Formalismus das Streulängendichte-Profil (SLD Profil) der Substrate rekonstruiert. Dazu wurde ein Schichtmodell mit rauen Grenzflächen angenommen (Abelès 1950; Parratt 1954; Névoit and Croce 1980). Die Schichtsysteme wurden auf zweierlei Weise parametrisiert. An Luft wurde ein 3 Schicht Model mit SiO<sub>x</sub>, Octadecyltrimetoxysilan und Zellulose zwischen den Halbkontinua Luft und Silizium benutzt. Unter Wasser wurde ein ähnliches System eingesetzt, mit dem Unterschied, daß die Zelluloseschicht zweilagig betrachtet wurde, mit einer hydratisierten Schicht und einer nicht regenerierten TMSZ Schicht. Die nicht regenerierte TMSZ Schicht wurde mit dem Schichtmodell, die hydratisierte Zelluloseschicht mit einer exponentiell abklingenden Streulängendichte modelliert. Der Verlauf wurde durch eine abklingende und gestreckte Funktion exponentiell parametrisiert und durch eine Vielzahl von Schichten modelliert.

Die Auswertung der Schichtdicken erfolgte mit dem Programm Motofit (Nelson 2006), welches erlaubt, Rauigkeiten zwischen den Streulängendichten zu berücksichtigen.

### 1.2.5 Liposomenpräparation

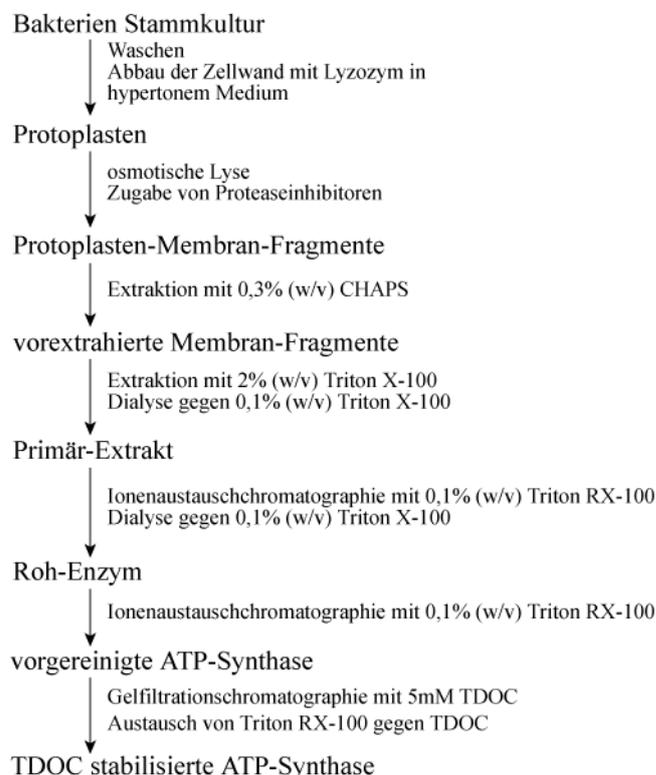
In allen Experimenten wurde ein Standard Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Puffer (TMN Puffer, pH = 8) eingesetzt:

TMN Puffer	Molarität
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
NaN <sub>3</sub>	1 mM

In Chloroform gelöstes SOPC wurde in einem Rotationsverdampfer langsam eingetrocknet und anschließend im Vakuumschrank über Nacht vollständig getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden in TMN Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und anschließend bei 40°C für 2 h bei gelegentlichem Vortexen emulgiert. Durch diese Präparationsmethode entstanden große, multi-lamellare Vesikel, die durch Extrusion (Liposofast, Avestin Inc., Ottawa, Kanada) in unilamellare Vesikel mit enger Größenverteilung umgewandelt wurden. Die Extrusion erfolgte durch 31 Passagen über 2 Polykarbonatmembranen mit Porenradien von 25 nm (Hope, Bally et al. 1985).

### 1.2.6 Aufreinigung der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase aus *Micrococcus lysodicticus*

Die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase (Abbildung 1.5.a) (Boyer 1997) wurde von PD Dr. Thomas Nawroth (Universität Mainz, Deutschland) aus Protoplasten des Bakteriums *Micrococcus lysodicticus* (ATCC 4698) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde durch fraktionierte Detergenswechsel-extraktion (Präparationsschema 1.1) nach einer modifizierten Methode von Chung et al. durchgeführt (Chung and Salton 1988; Gruber, Godovaczimmermann et al. 1994; Freisleben, Zwicker et al. 1995).



Präparationsschema 1.1: Aufreinigung der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase aus *Micrococcus lysodicticus*. Die fraktionierte Extraktion erlaubt es, die Aufreinigung der ATP-Synthase mit starken Detergenzien zu beginnen, die die Lipidmembran vollständig zerstören und die ATP-Synthase am Ende in ein schwaches Detergens wie TDOC zu überführen. Im Endprodukt ist die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase mit TDOC stabilisiert und liegt im wäßrigen Einfrier-TMN Puffer vor.

Nach dem Zellaufschluß erfolgte die Aufreinigung durch eine Vorextraktion mit dem Detergens CHAPS, gefolgt von einer Extraktion mit Triton X-100, das die Protoplastenmembran vollständig zerstörte. Anschließend wurde Triton X-100 durch reduziertes Triton RX-100 ersetzt, welches in einem letzten Schritt durch das schwache (CMC = 3 mM) Detergens TDOC (Abbildung 1.5.b) ausgetauscht wurde.

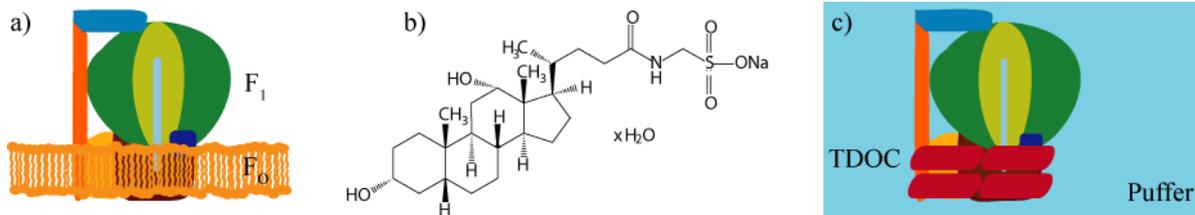


Abbildung 1.5: a) Schematische Darstellung des F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase Komplexes, wie er in einer Membran eingebaut vorliegt. b) Strukturformel von TDOC, welches im letzten Aufreinigungsschritt zum Solubilisieren der ATP-Synthase eingesetzt wurde. c) Schematische Darstellung der ATP-Synthase, wie sie im wässrigen Medium von TDOC (braune Balken) stabilisiert wurde.

Die aufgereinigte und mit TDOC stabilisierte F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase (Abbildung 1.5.c) wurde in flüssigem Stickstoff anschließend in Einfrier-TMN Puffer (pH = 8) gelagert.

Einfrier-TMN Puffer	Molarität
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	50 mM
TDOC	5 mM
Diisopropyl Fluorophosphat	0,1 mM
Glyzerol	10% (v/v)

Der Gesamtkomplex der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase besteht aus einem transmembranen F<sub>0</sub> Komplex, welcher aus 15 Untereinheiten besteht. Er transportiert Protonen entlang des Protonengradienten über die Lipidmembran hinweg und wird dabei in Rotation versetzt. Der katalytisch aktive F<sub>1</sub> Komplex besteht aus 9 Untereinheiten. Der F<sub>0</sub> Komplex und der F<sub>1</sub> Komplex sind über die  $\gamma$ -Untereinheit verbunden, die die Rotation des F<sub>0</sub> Komplexes an den F<sub>1</sub> Komplex überführt. Durch Weiterleitung der Rotationsenergie des F<sub>0</sub> Komplexes kommt es zu Konformationsänderungen an der  $\beta$ -Untereinheit des F<sub>1</sub> Komplexes. Infolge dieser Konformationsänderung wird ADP und Phosphat zu ATP synthetisiert (Boyer 1997).

### **1.2.7 Rekonstitution der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase in Liposomen**

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase in Einfrier-TMN Puffer wurde über Nacht in TMN Puffer mit 5 mM TDOC umdialysiert. TDOC stabilisierte F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase wurde in uni-lamellare Liposomen für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelapparat rekonstituiert. Nach erfolgter Rekonstitution kommt TDOC frei im Puffer als Mizelle und in den Proteoliposomen gelöst vor. Es wurde anschließend durch eine Gelpermeationschromatographie (GPC) in Sephadex G 25 (PD 10, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) aus dem Rekonstitutionsansatz entfernt (Horigome and Sugano 1983; Deisinger, Nawroth et al. 1993; Gruber, Godovaczimmermann et al. 1994).

In der GPC wurden 500 µl Rekonstitutionsansatz auf die Säule aufgetragen und mit TMN Puffer eluiert. Fraktionen von 500 µl wurden gesammelt. Durch UV Absorptionsmessungen bei  $\lambda = 280$  nm wurden die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration von F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase ermittelt. Diese Hauptfraktionen wurden in allen Experimenten eingesetzt.

### **1.2.8 Aufspreiten von Proteoliposomen auf hydrophile, biokompatible Zelluloseschichten**

Festkörperoberflächen oder Deckgläschen, beschichtet mit 10 Lagen regenerierter Zellulose, wurden in speziell angefertigte Edelstahlhalter eingebaut, wobei eine Kammer über dem Zellulosefilm entstand. Es wurde eine Proteoliposomenlösung (300 µl) auf den Zellulosefilm gegeben und für eine Stunde inkubiert. Dabei kam es zur Ausbildung einer Proteoliposomenmembran auf dem hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilm (Abbildung 1.6) (Brian and McConnell 1984; Kalb, Frey et al. 1992). Die Oberflächenbeschichtung erfolgte in einem Zellinkubator bei 37°C und bei Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. Danach wurden adhärente sowie ungebundene Proteoliposomen durch intensiven Puffertausch ausgewaschen. Anschließend wurde die Homogenität der Membran und die Verteilung der ATP Synthase in den festkörpergestützten Membranen durch eine spezifische Fluoreszenzmarkierung bestimmt.

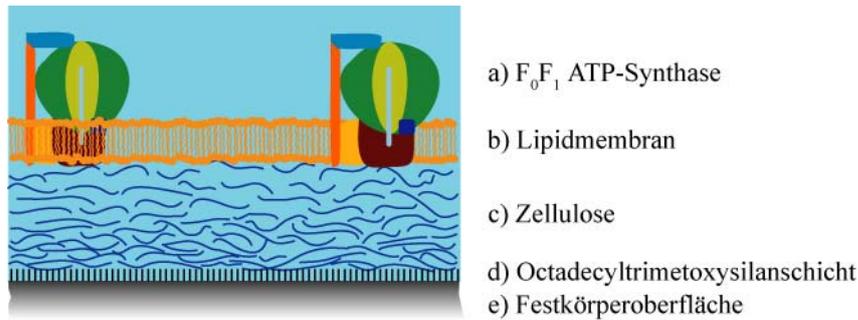


Abbildung 1.6: Schematische und maßstabsgetreue Darstellung einer Proteoliposomenmembran auf einer hydrophilen, biokompatiblen Zellosoeschicht (10 Monolagen), die auf einem silanisierten Deckglas aufgetragen wurden. Die Schichten sind: a)  $F_0F_1$  ATP-Synthase, b) Lipidmembran, c) 10 Monolagen Zellulose, d) Octadecyltrimetoxysilanschicht und e) Festkörperoberfläche.

Der Einsatz eines speziell konstruierten Probenhalters (Abbildung 1.7) bietet den Vorteil, daß mit der Probenoberfläche und dem Puffer nur chemisch inerte Materialien wie Teflon und Viton in Kontakt kommen und daher Kontaminationsquellen ausgeschlossen werden können.

Im Boden des Edelstahlhalters befindet sich eine Aussparung in den Abmessungen des Deckgläschens (24 mm x 24 mm x 0,1 mm). In diese Aussparung wurde das Deckgläschen eingelegt. Darüber wurde der Tefloneinbau eingesetzt und mit dem Deckel verschraubt. Durch das Verschrauben wurde der Teflonhalter mit einem Viton O-Ring auf die Oberfläche des Deckgläschens aufgepreßt und abdichtet. Es entstand eine dicht verschlossene Kammer, in die die Proteoliposomen nachfolgend zugegeben und gewaschen wurden.



Abbildung 1.7: Deckgläschenhalter bestehend aus Edelstahlboden, Edelstahldeckel und Tefloneinbau. Das Deckgläschen wurde mit dem Tefloneinbau in die Aussparung im Boden eingepreßt. Durch den Einsatz von gereinigten und chemisch inerten Materialien können Probenoberfläche und Puffer nicht verunreinigen.

### 1.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase Stammlösung sowie der Proteoliposomen wurde durch Absorptionsmessung ermittelt.

Es gibt keine Literaturreferenz für den Extinktionskoeffizient der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase von *Micrococcus lysodicticus*. Aber Zwicker (Zwicker 1992) hat in seiner Promotion den Extinktionskoeffizient der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase bestimmt. Dafür hat er das Absorptionsspektrum einer bekannten Konzentration der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase von *Micrococcus lysodicticus* bei  $\lambda = 280$  nm ermittelt, woraus er den molaren Extinktionskoeffizienten der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase von *Micrococcus lysodicticus* mit  $250.000 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bestimmen konnte.

Die Auswertung aller photometrischen Daten erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Es besagt, daß beim Durchgang von monochromatischem Licht durch ein absorbierendes, wäßriges Medium entsprechend der Weglänge durch das wäßrige Medium die Strahlungsintensität exponentiell abnimmt. Die Extinktion E ist somit gegeben als negativer, dekadischer Logarithmus des Quotienten aus transmittiertem Licht ( $I_1$ ) und eingestrahltm Lichtstrahl ( $I_0$ ), oder als die Summe des molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), multipliziert mit der Konzentration (c) der absorbierenden Substanz und der Weglänge (d) des Lichtes durch die Probe.

$$E = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Die Extinktion wurde mit dem Photometer (Genosys 10UV, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, USA) gemessen. Die Proteinkonzentration aller Fraktionen aus der GPC wurde bestimmt, aus denen anschließend die 2 Hauptfraktionen (Konzentration =  $1,2 \mu\text{mol}$ , Fraktion Nr. 14 und 15) für alle weiteren Experimente benutzt wurden.

### 1.2.10 Bestimmung der Lipidkonzentration

Die Lipidkonzentration der Proteoliposomen wurde nach der Methode von Fiske und Subbarow (Fiske and Subbarow 1925) für die Proteinhauptfraktionen (Fraktion Nr. 14 und 15) durchgeführt (Tabelle 1.3). In Phospholipiden wird die polare Kopfgruppe über eine Phosphatgruppe mit dem Glycerolgrundgerüst verbunden. Somit ergibt sich ein stöchiometrischer Faktor von 1 bezüglich der Phosphatgruppen zu Phospholipiden, folglich entspricht die ermittelte Phosphatkonzentration der vorhandenen Lipidkonzentration.

Für die Phosphatbestimmung wurden die Proteoliposomen in Perchlorsäure verascht und anschließend mit einer Lösung aus Ammoniummolybdat versetzt, was zur Ausbildung eines farbigen Ammoniummolybdat-Phosphatkomplexes führt. Dieser farbige Komplex wurde anschließend mit Ascorbinsäure stabilisiert. Die Extinktion wurde photometrisch bei  $\lambda = 797 \text{ nm}$  bestimmt. Zur Bestimmung der Lipidkonzentration wurde mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  eine Eichgerade aufgenommen und über die Eichgerade die Phosphatkonzentration ermittelt.

Schritt	Bestimmung der Lipidkonzentration
1	Veraschen von 100 $\mu\text{l}$ Probe für 5 min bei $180^\circ\text{C}$
2	Zugabe von 0,3 ml Perchlorsäure für 30 min bei $180^\circ\text{C}$
3	Zugabe 1,4 ml Reinstwasser
4	Zugabe von 0,2 ml Ammoniummolybdat (2,5% w/v)
5	Zugabe von 0,2 ml Ascorbinsäure (10% w/v)
6	Kochen für 5 min bei $100^\circ\text{C}$
7	Phosphatbestimmung bei $\lambda = 797 \text{ nm}$

Tabelle 1.3: Schema der Phosphatanalyse zur Bestimmung der Phospholipidkonzentration.

### 1.2.11 Fluoreszenzmarkierung der Lipidmembran und der $\text{F}_0\text{F}_1$ ATP-Synthase

Die Fluoreszenzmarkierung der Proteoliposomen erfolgte an der Lipidmembran mit NBD-PC oder an der ATP-Synthase unspezifisch mit TAMRA-SE beziehungsweise spezifisch mit Antikörpern. Somit konnte entsprechend der markierten Komponenten die Homogenität sowie die Verteilung der markierten Lipide und Proteine im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

Die Markierung der Lipidmatrix erfolgte während der Liposomenpräparation mit dem Lipidanalogen NBD-PC. NBD-PC sowie SOPC wurden in Chloroform gelöst, gemischt und anschließend gemeinsam eingetrocknet. Anschließend wurde die Lipidmischung im TMN-Puffer gequollen und extrudiert. Infolgedessen entstanden membranmarkierte Liposomen.

$\text{F}_0\text{F}_1$  ATP-Synthase wurde nach der Methode von Hu et al. (Hu, Finsinger et al. 2000) mit TAMRA-SE unspezifisch fluoreszenzmarkiert. Dabei band die reaktive Succinimidyl Ester an primäre wie sekundäre Amidgruppen. TRIS, die puffernde Substanz des TMN-Puffers, besitzt ein sekundäres Amid und wurde daher gegen Boratpuffer ( $\text{pH} = 7.4$ ) umdialysiert:

<b>Boratpuffer</b>	<b>Molarität</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> -NaOH	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
TDOC	5 mM
NaN <sub>3</sub>	1 mM

TAMRA-SE gelöst in DMF wurde eisgekühlt langsam der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase Lösung bis zu einem molaren Endverhältnis von TAMRA-SE zu ATP-Synthase von 60:1 zugegeben. Dieser Ansatz wurde in einem Überkopfrührer (5,5 Rotationen pro Minute) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proteine in einer Gelpermeationschromatographie (Sephadex G25, PD 10, Amersham, Uppsala, Schweden) vom ungebundenen Farbstoff getrennt. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und durch Absorptionsmessungen bei  $\lambda = 280$  nm die Konzentration der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase ermittelt. Die Konzentration des gebundenen Farbstoffes wurde durch Absorptionsmessung bei  $\lambda = 555$  nm bestimmt. Die Markierungseffizienz betrug ca. 10 Farbstoffe je F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase. Die fluoreszenzmarkierten F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthasen wurden anschließend wie in Abschnitt 1.2.7 beschrieben in Liposomen rekonstituiert.

Die Antikörpermarkierung der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase des *Micrococcus lysodicticus* kann wegen unvollständiger Sequenzierung der Aminosäuresequenz und fehlender kommerziell angebotener Antikörper gegen die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase nur über einen Umweg durchgeführt werden. Da ATP als ubiquitärer Energieträger in allen lebenden Organismen vorkommt, ist die Aminosäuresequenz der ATP Bindestelle in der  $\beta$  Untereinheit (F<sub>1</sub> Komplex) hoch konserviert und besitzt daher eine hohe Homologie zu verschiedenen ATP-Synthasen anderer Organismen. Aufgrund des Vergleichs der Aminosäuresequenzen (Swiss-Prot, EMBL, PDB) anderer Organismen, für die kommerzielle Antikörper angeboten werden, wurde ein Antikörper gegen die ATP-Synthase aus Rattenhirn Mitochondrien gewählt.

Eine Antikörpermarkierung des F<sub>0</sub> Komplexes ist nicht möglich, da die Aminosäuresequenz ihrer Loops außerhalb der Lipidmembran wenig konserviert sind und daher stark zwischen verschiedenen Organismen variieren.

Die Bindung des 1. monoklonalen Maus-Antikörpers gegen die ATP Bindestelle wurde mit einem 2. polyklonalen Ziege-anti-Maus Antikörper mit FITC konjugiert nachgewiesen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Proteoliposomenmembran zu verhindern, wurden alle Proben vor der Antikörpermarkierung mit 3 Gewichts-% RSA für eine Stunde inkubiert.

### 1.2.12 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine störungsfreie Methode zur Untersuchung biologischer Materialien wie Liposomen, die eine präzise Bestimmung der Größenverteilung im Å-Bereich ermöglicht. Dabei wird ein monochromatischer und kohärenter Laserstrahl auf die Probe gerichtet und von gelösten, diffundierenden Partikeln gestreut, wodurch es zu einer Interferenz zwischen verschiedenen, reflektierten Strahlen und damit zu einer Fluktuation in der Intensität des Laserlichtes kommt. Die Intensitätsänderung kann mit einem Autokorrelator nach der CONTIN Methode (Provencher 1982) bestimmt werden. Für die Bestimmung der Größenverteilung wurde folgende Autokorrelationsfunktion eingesetzt:

$$G(\tau) = N \langle |a|^2 \rangle \exp(-q^2 D \tau)$$

$G(\tau)$  ist die Autokorrelationsfunktion,  $\tau$  die Zeitverzögerung,  $N$  die Partikelanzahl,  $q$  der Streuvektor und  $D$  der Diffusionskoeffizient. Über die Autokorrelationsfunktion erhält man somit den Diffusionskoeffizienten  $D$ , mit dem über die Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius der Liposomen bestimmt werden kann:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H}$$

In der Gleichung ist  $D$  der Diffusionskoeffizient,  $k_B$  die Boltzmann Konstante,  $\eta$  die Viskosität,  $T$  die Temperatur und  $r_H$  der hydrodynamische Radius der Liposomen.

Die Größenverteilung der Liposomen wurde vor und nach Rekonstitution der Proteine bestimmt. Alle Messungen wurden in einem temperierbaren Probenhalter bei 20°C durchgeführt. Auf die Proben wurde ein Laserstrahl der Wellenlänge  $\lambda = 632,8$  nm gerichtet und das reflektierte Licht unter einem Winkel von 90° zur Lichtquelle mit einem Photomultiplier detektiert (Abbildung 1.8), der mit einem Autokorrelator verbunden war (ALV5000/E, Langen, Deutschland). Laserlicht, welches durch die Probe hindurchging, wurde von einer Strahlenfalle, die entgegengesetzt zum Laser angebracht war, absorbiert.

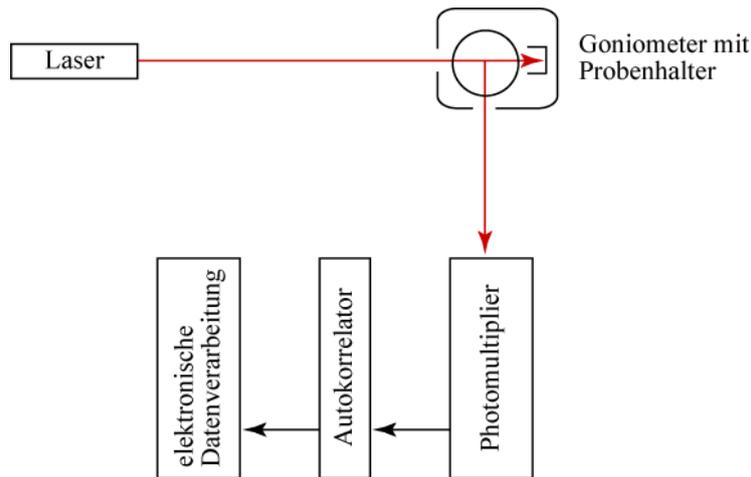


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des DLS Aufbaus zur Bestimmung der Liposomengröße. In die Probe wurde ein Laserstrahl gerichtet, der von frei diffundierenden Liposomen oder Proteoliposomen reflektiert wurde. Das reflektierte Licht wurde von einem Photomultiplier detektiert. Die Daten wurden im Autokorrelator ausgewertet und anschließend mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung in eine Größenverteilung umgerechnet.

### 1.2.13 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem invertierten Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen, ausgestattet mit einem Achroplan 63-fach „long distance“ (N.A. 0.75, Zeiss, Jena, Deutschland) und einem 20-fach „long distance“ (N.A. 0.40, Zeiss, Jena, Deutschland) Objektiv. Die Beleuchtung der Proben erfolgte mit einer Quecksilber-Hochdrucklampe (HBO 100, Zeiss, Jena, Deutschland) und Filtern entsprechend der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe. Bilder wurden mit einer gekühlten CCD Kamera (Orca ER, Hamamtsu Photonics, Hersching, Deutschland) aufgenommen, mit einer Framegrabberkarte (Stemmer Imaging, Puchheim, Deutschland) digital abgespeichert und mittels einer selbstentwickelten Software (Keller, Schilling et al. 2001) elektronisch ausgewertet.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird mit Hilfe eines Anregungsfilters das Licht auf die Anregungswelle des eingesetzten Farbstoffes reduziert. Es wird über einen dichroitischen Spiegel auf die Probe geleitet, wo es den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Das emittierte Licht wird auf dem umgekehrten Weg über einen Emissionsfilter auf die Kamera geleitet.

Die Fluoreszenzmarkierung der Lipidmatrix erfolgte mit NBD-PC (Absorptionsmaximum = 463nm, Emissionsmaximum = 536 nm) und einem geeigneten Filterset. Die ATP-Synthase wurde unspezifisch mit TAMRA-SE (Absorptionsmaximum = 555 nm, Emissionsmaximum = 580 nm) und spezifisch mit FITC konjugiertem Antikörper (Absorptionsmaximum = 495 nm, Emissionsmaximum = 520 nm) markiert und mit einem passenden Filterset nachgewiesen.

### 1.2.14 Rasterkraftmikroskopie

Die Topographie der Polymer-gestützten Membran kann mit der Rasterkraftmikroskopie (RKM, NanoWizard, JPK Instruments, Berlin, Deutschland) mit hoher lateraler und hoher vertikaler Auflösung bestimmt werden (Binnig, Quate et al. 1986). Eine an einer Blattfeder angebrachte Spitze (Cantilever) wird in die Nähe oder auf die Oberfläche der Probe gebracht. Mit Hilfe eines Piezo-Tischs, der in alle drei Raumrichtungen präzise verschoben werden kann, wird die Oberfläche vom Cantilever abgetastet. Beim Abtasten wird der Cantilever durch einwirkende Kräfte von der Oberfläche abgelenkt. Auslenkungen der Feder können durch einen Laserstrahl, der auf die Spitze des Cantilevers ausgerichtet ist und von dort auf eine segmentierte Photodiode reflektiert wird (Abbildung 1.9), detektiert werden. Die Meßsignale werden in ein Höhenprofil umgerechnet und graphisch als Oberflächenrelief dargestellt. Die Oberflächenrauigkeit wird als quadratischer Mittelwert (root mean square, RMS-Rauigkeit) angegeben.

Als Trägersubstrate für die RKM wurden polierte Siliziumwafer (1 cm x 1 cm) mit thermisch oxidierte Oberfläche eingesetzt. Die Vermessung der beschichteten Siliziumwafer erfolgte ausschließlich unter Wasser, weshalb die Proben in eine Fluidkammer eingebaut wurden. Die Fluidkammer und der Cantilever wurden vor dem Einbau mit Reinstwasser gereinigt. Die Wafer wurden auf speziell angefertigte Probenhalter angebracht und in die Apparatur eingebaut. Liposomen oder Proteoliposomen wurden auf das Trägersubstrat gegeben, eine Stunde inkubiert und anschließend mit Puffer intensiv gespült. Der Aufbau wurde dann für 30 min thermisch bei Raumtemperatur äquilibriert.

Die Messungen wurden im Kontaktmodus bei einer Scanrate von 8 Hz angefertigt. Die Spitze wurde dabei in Kontakt zur Oberfläche gebracht, während des Abtastens wurde die Auslenkung der Spitze an der Oberfläche konstant gehalten, was gleichzusetzen ist mit einer konstanten Aufdruckkraft des Cantilevers. Um die Aufdruckkraft konstant halten zu können, wurde das Auslenkungssignal des Cantilevers als Regelgröße in die Bewegung der Cantileveraufhängung eingearbeitet.

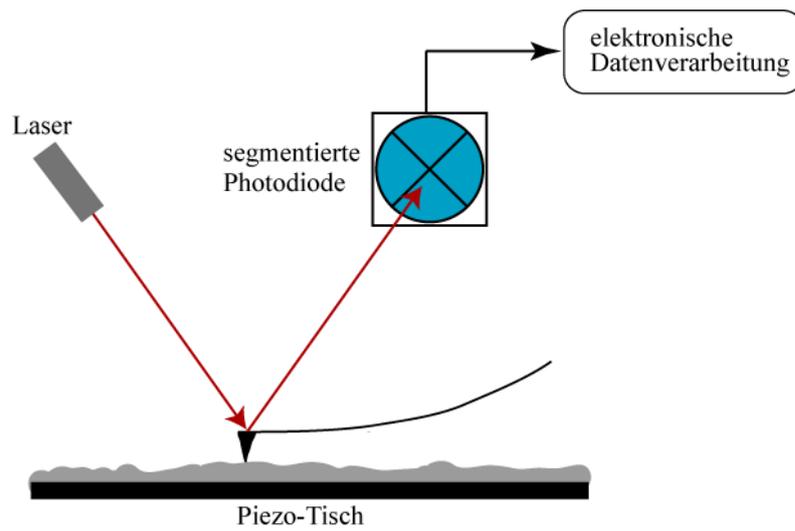


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Rasterkraftmikroskopie. Laserlicht wurde von einem Cantilever reflektiert und einer segmentierten Photodiode ausgelesen. Die ermittelten Auslenkungen des Cantilevers wurden in ein Höhenprofil umgerechnet.

## **1.3 Ergebnisse und Diskussionen**

### **1.3.1 Lipid- und Proteinkonzentration**

Proteoliposomen wurden durch die Rekonstitution von TDOC stabilisierter  $F_0F_1$  ATP-Synthase in Liposomen hergestellt. Im Rekonstitutionsansatz kommt TDOC in der Proteoliposomenmembran gelöst vor und wurde, wie in Kapitel 1.2.7 beschrieben, aus dem Rekonstitutionsansatz mit Hilfe einer GPC entfernt. Von den gesammelten Fraktionen aus der GPC wurde die Proteinkonzentration mit  $0,2 \mu\text{M}$   $F_0F_1$  ATP-Synthase bestimmt (Zwicker 1992).

Von der Hauptfraktion wurde anschließend die Lipidkonzentration durch Phosphatanalyse (Fiske 1925) mit  $1,1 \text{ mM}$  bestimmt. Aus den molaren Konzentrationen der Proteine und der Lipide läßt sich das molare Verhältnis von Proteinen zu Lipiden mit  $1:5500$  bestimmen. In allen Beschichtungsexperimenten wurde die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration eingesetzt.

### **1.3.2 Dynamische Lichtstreuung**

Die Größenverteilung der Liposomen wurde vor und nach Einbau der ATP-Synthase quantitativ mit Hilfe der DLS untersucht. Die DLS Daten wurden mit der Stokes-Einstein Gleichung ausgewertet, die den hydrodynamischen Radius bestimmt. Der hydrodynamische Radius beschreibt eine hypothetische Kugel, die dieselbe Diffusionsgeschwindigkeit besitzt. In Abbildung 1.10 wurden die Ergebnisse der Anzahl-gewichteten Größenverteilung von Liposomen (gefüllte Quadrate) und Proteoliposomen (leere Kreise) dargestellt. Nach der Bestimmung der Größenverteilung wurden die Liposomen für die Rekonstitution der ATP-Synthase eingesetzt. Anschließend wurde die korrespondierende Größenverteilung der Proteoliposomen ermittelt.

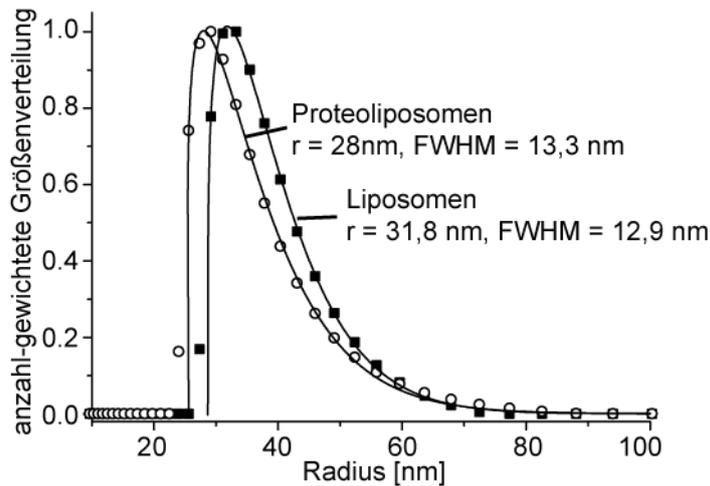


Abbildung 1.10: Anzahl-gewichtete Größenverteilung der hydrodynamischen Radien von Liposomen und korrespondierenden Proteoliposomen. Die Größenverteilung der Liposomen ist mit ausgefüllten Quadraten (Radius = 31,8 nm, FWHM = 12,9 nm), die der Proteoliposomen mit leeren Kreisen dargestellt (Radius = 28 nm, FWHM = 13,3nm). Die Weibull-Wahrscheinlichkeitsverteilung der Meßwerte ist als durchgezogene Linie in den Graphen eingezeichnet.

Die Größenverteilung der durch Extrusion (Porenradius = 25 nm) hergestellten Liposomen zeigt eine Peakposition (Radius) von 31,8 nm mit einer Halbwertsbreite (FWHM) von 12,9 nm und einer asymmetrischen Verbreiterung zu größeren Radien hin. Die Peakposition gibt den Radius der Hauptfraktion an. Diese asymmetrische Verbreiterung kann sehr gut mit der Weibull-Wahrscheinlichkeitsverteilung charakterisiert werden, weil sie statistisch eine Schiefe, d.h. eine ungleichmäßige Verteilung, berücksichtigt. Die Schiefe charakterisiert die Abweichung der Symmetrie vom Mittelwert. In Abbildung 1.10 wurden die Meßwerte (gefüllte Quadrate, leere Kreise) und die Weibull-Wahrscheinlichkeitsverteilung (durchgezogene Linie) eingezeichnet. (Korgel, van Zanten et al. 1998) Die Größenverteilung wurde nach folgender Funktion ermittelt:

$$f(d) = \frac{\delta}{\eta} \left( \frac{d-d_0}{\eta} \right)^{\delta-1} \exp \left( - \left( \frac{d-d_0}{\eta} \right)^{\delta} \right)$$

In der Formel ist d der Liposomendurchmesser,  $d_0$  der kleinste Liposomendurchmesser,  $\eta$  kann als die Effektivität der Liposomenfragmentierung interpretiert werden.  $\delta$  besitzt den Wert 3, der die Dimension von Liposomen (Kugel) wiedergibt.

Nach der Größenbestimmung der Liposomen wurde in diese Probe  $F_0F_1$  ATP-Synthase rekonstituiert und ebenfalls die Größenverteilung ermittelt. Phosphatanalysen aller GPC Fraktionen haben gezeigt, daß nur in einer Fraktion Proteoliposomen vorhanden waren. Die Größenverteilung dieser Proteoliposomen (Abbildung 1.10) wurde mit der Weibull-Wahrscheinlichkeitsverteilung

(leere Kreise) bestimmt, die die Peakposition von 28 nm mit einer Halbwertsbreite von 13,3 nm besaß. Durch den Vergleich der Größenverteilung (Tabelle 1.4) konnte gezeigt werden, daß sich die Größenverteilung vor und nach Rekonstitution nicht signifikant verändert hat.

	Größe [nm]	Halbwertsbreite [nm]
Liposomen	31,8	12,9
Proteoliposomen	28,0	13,3

Tabelle 1.4: Vergleich der Größenverteilung von Liposomen und der korrespondierenden Proteoliposomen. Nach der Größenbestimmung der Liposomen wurde in diese Probe  $F_0F_1$  ATP-Synthase rekonstituiert und anschließend ebenfalls die Größenverteilung bestimmt.

Daß sich die Größe der Proteoliposomen im Vergleich zu den Liposomen nicht geändert hat, ist ein zentrales Ergebnis dieser Experimente.

Im Reaktionsansatz befindet sich das Detergens TDOC. Obwohl TDOC ein schwaches Detergens (CMC = 3 mM) ist, besteht die Möglichkeit, daß durch TDOC die Liposomen fusionieren, wodurch ihre enge Größenverteilung gestört wird. Zudem besteht die Möglichkeit, daß durch die Rekonstitution einer großen Anzahl  $F_0F_1$  ATP-Synthase die Größe der Liposomen ebenfalls verändert wird. Mit dem Vergleich der Größenverteilung wurden beide Eventualitäten ausgeschlossen.

Im Rekonstitutionsansatz wurde die  $F_0F_1$  ATP-Synthase mit TDOC stabilisiert. TDOC akkumuliert in der Lipidmembran und setzt dadurch die Grenzflächenspannungen herab, wodurch die Fusion von Liposomen begünstigt wird (Nawroth, Conrad et al. 1989). Der einfachste Fall der Liposomenfusion ist die Fusion von 2 Liposomen (Radius = 31,8 nm, Liposomenoberfläche =  $12.700 \text{ nm}^2$ ). Dabei würden sich die Oberflächen addieren und es entstände ein Liposom mit einem Radius von 45 nm. Die Größenverteilung der Proteoliposomen betrug aber 28 nm mit einer Halbwertsbreite von 13,3 nm. Aus den Zahlenwerten geht hervor, daß während der Rekonstitution Liposomen nicht fusionierten und sich daher die Größenverteilung nicht signifikant veränderte.

Die geringe Abweichung von 3,8 nm der Proteoliposomen hin zu kleineren Radien resultierte aus der GPC. Die GPC ist eine Größenausschluß-Chromatographie und trennt Proteoliposomen hinsichtlich ihres Durchmessers, wobei es zu einer genaueren Auftrennung unterschiedlicher Liposomen nach ihrer Größe kommt.

Eine Größenzunahme der Liposomen durch die Anzahl der rekonstituierten Proteine kann durch die ermittelten Lipid- und Proteinkonzentrationen bestimmt werden. In Proteoliposomen wurde 1 Protein pro 5500 Lipide eingebaut (Kapitel 1.3.1). Mit der Lipidkonzentration von 1,1 mM, der mittleren molekularen Fläche für Lipide in einer Lipidmembran von  $0,7 \text{ nm}^2$  (Chapman 1984) und

dem mittleren Durchmesser der Liposomen von 31,8 nm wurde die Anzahl der Liposomen pro ml Volumen bestimmt. Aus der Konzentration der  $F_0F_1$  ATP-Synthase Moleküle wurde die Anzahl der Proteine pro ml Volumen errechnet. Somit konnte bestimmt werden, daß in jedem Liposom 6 ATP-Synthasen eingebaut wurden.

Durch den Einsatz von bekannten Konzentrationen der ATP-Synthase im Rekonstitutionsansatz wurden die Dichte und der laterale Abstand der ATP-Synthase in der Liposomenmembran kontrolliert. Der transmembrane  $F_0$  Komplex der  $F_0F_1$  ATP-Synthase besitzt eine Querschnittsfläche von  $20 \text{ nm}^2$  (Boyer 1997; Gruber 2000). Unter Berücksichtigung der Gesamtfläche der  $F_0$  Komplexe von 6 ATP-Synthase Molekülen wurde die Flächenzunahme mit  $120 \text{ nm}^2$  pro Proteoliposom ermittelt. Die Radiuszunahme der Proteoliposomen verursacht durch 6 ATP-Synthasen beträgt ca. 0,1 nm und ist somit zu niedrig, um sie als signifikante Radiuszunahme bestimmen zu können.

Es wurde nachgewiesen, daß durch den Einsatz unter den gegebenen Bedingungen TDOC Liposomen nicht fusionieren. Zudem wurde durch die geringe Anzahl der rekonstituierten ATP-Synthasen der Radius der Proteoliposomen nicht beeinflusst. Diese experimentelle Vorgehensweise zeigte, daß Membran-Modell-Systeme mit definierten Größen im nm-Bereich gezielt hergestellt wurden.

### **1.3.3 Rekonstitution der $F_0F_1$ ATP-Synthase in Liposomen**

Die Detergens-vermittelte Rekonstitution der  $F_0F_1$  ATP-Synthase in Liposomen kann über 2 unterschiedliche Wege (Abbildung 1.11) erfolgen: über einen „platzenden“ Weg (zerstörend), bei dem Liposomen zerstört werden und anschließend unkontrolliert fusionieren, oder über einen „nicht-platzenden“ Weg (nicht-zerstörend), bei dem Liposomen während der Rekonstitution intakt bleiben. Diese Mechanismen wurden im Wesentlichen mit dem eingesetzten Detergens gesteuert. Standard-Detergenzien wie SDS und Triton X-100 werden als „starke“ Detergenzien bezeichnet, da sie eine geringe kritische Micellen-Konzentration ( $\text{CMC} = 1 \text{ mM}$ ) besitzen. Sie zerstören in geringen Konzentrationen Lipidmembranen und werden daher in der Aufreinigung von transmembranen Proteinen eingesetzt. Um die Zerstörung der Liposomenmembran zu umgehen, wurde das „schwache“ Detergens TDOC eingesetzt. Es besitzt eine CMC von 3 mM, weshalb es die Lipidmembran weniger beeinflusst (Nomura, Nagata et al. 2001). Die fraktionierte Extraktion erlaubt es, die Aufreinigung der ATP-Synthase mit starken Detergenzien wie Triton X-100 zu beginnen und am Ende die ATP-Synthase in das schwache Detergens TDOC zu überführen.

Unter der Annahme eines „platzenden“ Mechanismus bei der Rekonstitution würde das vorhandene Detergens die Liposomen zerstören. Die Membranfragmente der Proteoliposomen würden

anschließend in einem unkontrollierten Prozeß fusionieren, bei welchem die Größe und die Orientierung der Membranfragmente nicht mehr kontrolliert werden kann. Beim „nicht-platzenden“ Mechanismus hingegen werden Liposomen durch das eingesetzte Detergens nicht zerstört. Nach der Rekonstitution der  $F_0F_1$  ATP-Synthase entstehen Proteoliposomen, die die ursprüngliche Größenverteilung der Liposomen beibehalten.

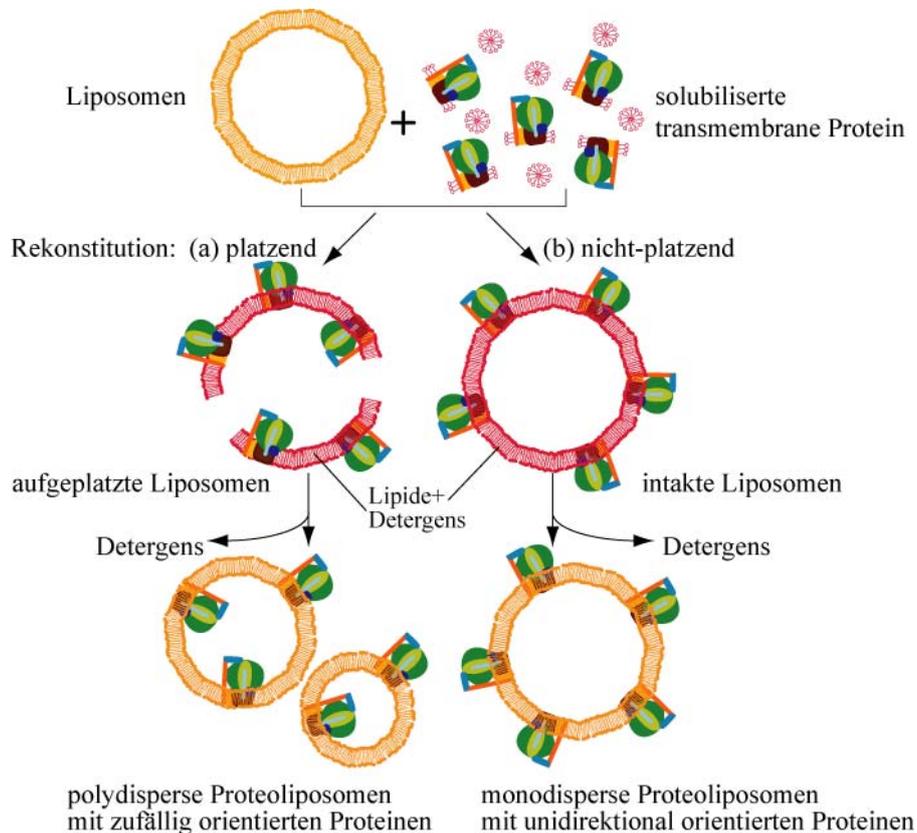


Abbildung 1.11: Szenarien zur Rekonstitution von TDOC stabilisierten ATP-Synthasen in Liposomen. Die Rekonstitution kann wie unter a) platzend sein, bei dem die Liposomen fragmentieren und sich anschließend unkontrolliert wieder zusammensetzen. Die Rekonstitution kann auch wie unter b) nicht-platzend ablaufen, bei dem das Detergens die Liposomen nicht zerstört. Da die ATP-Synthase eine große, hydrophile Kopfgruppe besitzt, ist die Passage der Kopfgruppe durch die Liposomenmembran energetisch unterbunden.

Das Ergebnis der DLS, daß eine gleiche Größenverteilung der Liposomen und der Proteoliposomen vorliegt, bestätigt die Annahme, daß die Rekonstitution über den „nicht-platzenden“ Mechanismus (Abbildung 1.11 b) erfolgte. Dieses Ergebnis wird durch eine weitere Eigenschaft von TDOC gestützt. TDOC ist negativ geladen und wird bei der Rekonstitution von Proteinen in die äußere Lage der Liposomen eingebaut (Mazer 1980). Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Liposomen untereinander werden diese durch die negative Ladung des TDOC zusätzlich stabilisiert (Nawroth, Conrad et al. 1989). Zudem ist TDOC ein schwaches Detergens mit einer CMC = 3 mM. Diese CMC wurde während der Rekonstitution nicht erreicht.

Der ermittelte Rekonstitutionsmechanismus zeigt, daß die  $F_0F_1$  ATP-Synthase in nicht zerstörte Liposomen eingebaut wurde. Dieses Ergebnis stimmt gut mit früheren Beobachtungen überein, in denen der gerichtete Einbau der ATP-Synthase und Bakteriorhodopsin in kleine, ultraschallbehandelte Vesikel gezeigt wurde (Gruber, Godovaczimmermann et al. 1994; Freisleben, Zwicker et al. 1995).

Beim „nicht-zerstörenden“ Einbaumechanismus ist die stark strukturelle Asymmetrie der ATP-Synthase von Vorteil: Die ATP-Synthase besitzt eine „pilzartige“ Form mit einem kleinen, hydrophoben, transmembranen  $F_0$  Komplex (Radius = 2,5 nm) (Gruber 2000). Der hydrophobe transmembrane Komplex ist über die  $\gamma$ -Untereinheit mit dem hydrophilen  $F_1$  Komplex verbunden, der einen Durchmesser von 10 nm hat. Wird bei der Rekonstitution der  $F_0F_1$  ATP-Synthase die Liposomenstruktur nicht zerstört, kann der hydrophile  $F_1$  Komplex die Membran nicht durchqueren. Dabei wird die vollständige ATP-Synthase in die Lipidmembran gerichtet, das heißt vektoriell eingebaut. Dies bedeutet, daß dieses Zell-Modell-System die natürliche Asymmetrie einer biologischen Membran besitzt. Um eine umfangreichere Charakterisierung der Membran-Asymmetrie durchführen zu können, wurde diese Modellmembran auf Festkörperoberflächen immobilisiert. Hierdurch konnte eine Vielzahl von physikalischen Oberflächen-Charakterisierungsmethoden eingesetzt werden.

#### **1.3.4 Charakterisierung der hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilme**

Werden Lipidmembranen auf eine Festkörperoberfläche aufgespreitet, trennt sie ein Wasserfilm von ca. 15 – 30 Å Dicke von der Festkörperoberfläche (Bayerl and Bloom 1990; Johnson, Bayerl et al. 1991; Lambacher and Fromherz 2002). Aus den maßstabsgetreuen Szenarien der Proteinrekonstitution (Abbildung 1.11) geht hervor, daß die transmembrane  $F_0F_1$  ATP-Synthase in der Innen- wie Außenseite der Proteoliposomen aus der Lipidmembran herausragt, wobei die Kopfgruppe der  $F_0F_1$  ATP-Synthase mit ca. 10 nm am weitesten aus der Lipidmembran hervorsteht. Der Abstand zwischen der Proteoliposomenmembran und der Festkörperoberfläche ist niedrig (15 – 30 Å), die Kopfgruppe kommt deshalb in Kontakt mit der Festkörperoberfläche und denaturiert in Folge dessen (Leckband and Israelachvili 2001). Um den Kontakt mit der Festkörperoberfläche zu verhindern wurden die Oberflächen mit hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilmen beschichtet.

Bei den eingesetzten hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilmen handelt es sich um exakt 10 Monolagen regenerierter Zellulose, die mit Hilfe des Langmuir-Blodgett Transfers von der Luft-Wasser-Grenzfläche auf Festkörperoberflächen übertragen wurden. Diese Technik ermöglicht es,

eine konkrete Anzahl von Zellulosefilmen zu übertragen und dadurch die Schichthöhe gezielt ändern zu können. Weiterhin ermöglicht diese Technik, daß der mittlere Abstand der Zellulosepolymere kontrolliert und variiert werden kann. Dadurch kann eine definierte Schichthöhe von ~ 10 Monolagen mit einer Höhe von 5 - 10 nm gequollen in Puffer hergestellt werden.

Vor dem Aufspreiten der Proteoliposomen wurde der hydrophile, biokompatible Zellulosefilm mit Hilfe der Neutronenreflektivität hinsichtlich seiner Schichtdicke und Oberflächenrauigkeit charakterisiert. Die Analyse der Reflektivitätskurven (Abbildung 1.12.a) erfolgte mit dem Schichtmodell für die Messungen in Luft (Abbildung 1.12.b) oder der Kombination der gestreckten exponentiellen Abnahme und dem Schichtmodell für die Messungen in D<sub>2</sub>O (Abbildung 1.12.c). Sie ermöglichen die Bestimmung der Schichtdicke, der Streulängendichte und der RMS-Rauigkeit des Zellulosefilms.

Der trockene Zellulosefilm hatte eine Schichtdicke von 4,9 nm in Luft und besaß eine RMS-Rauigkeit von 1,7 nm. Obwohl die Dicke des Zellulosefilms gut mit Ellipsometriedaten (Rehfeldt and Tanaka 2003) und RKM Daten übereinstimmt, scheint die RMS-Rauigkeit größer zu sein als bei Messungen mit der Röntgenreflektivität (RMS-Rauigkeit von 0,8 nm) (Schaub 1993). Dies kann der größeren Beleuchtungsfläche des Neutronenstrahls zugeordnet werden, der sich im Bereich mehrerer cm<sup>2</sup> befand.

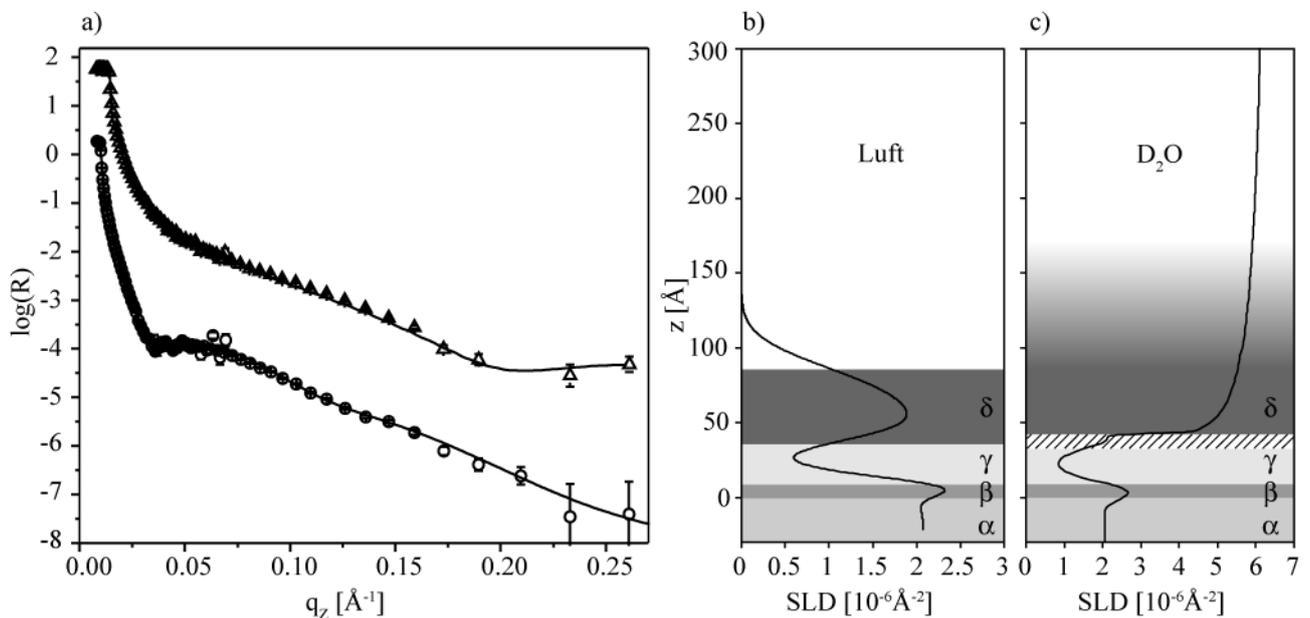


Abbildung 1.12: Neutronen-Reflektivität regenerierter Zellulose, hergestellt durch Langlaur-Blodgett Transfer von 10 Monolagen TMSZ auf einem hydrophoben Siliziumblock. a) Neutronen Reflektivitätskurven eines Zellulosefilms an Luft (○) und derselbe Zellulosefilm in D<sub>2</sub>O (Δ). Die Meßpunkte in D<sub>2</sub>O sind der besseren Übersichtlichkeit halber nach oben verschoben worden. Die durchgezogenen Linien entsprechen den besten Fits, die in Graphik b) gezeigt werden. b) Die durchgezogenen Linien entsprechen den Profilen der vertikalen Streulängendichte (SLD).  $\alpha$ : Silizium,  $\beta$ : SiO<sub>2</sub>,  $\gamma$ : ODTMS,  $\delta$ : Zellulose

Es muß hervorgehoben werden, daß Neutronenreflektivitätsdaten in D<sub>2</sub>O nur dann sinnvoll analysiert werden können, wenn der Zellulosefilm als zwei separate Schichten modelliert wird: eine gering hydratisierte Schicht über dem ODTMS und eine Schicht, die in D<sub>2</sub>O stark gequollen war (Abbildung 1.12.c). Die gering hydratisierte Schicht kann damit erklärt werden, daß während der kurzen Phase der Regeneration (20 Sekunden) der HCl Dampf nicht die untersten Schichten der TMSZ (nahe der Deckglasoberfläche) erreichen konnte und diese daher nicht regeneriert wurde.

Das Quellen der Zellulose in D<sub>2</sub>O wurde durch den Einsatz der gestreckten exponentiellen Abnahme modelliert, das einen Gradienten in der Streulängendichte entlang der z-Achse berücksichtigt (1.11.c).

Die Daten der Neutronenreflektivität zeigen einen homogenen, ca. 10 nm hohen Zellulosefilm auf der Festkörperoberfläche. Die Höhe und die geringe Rauigkeit des Zellulosefilms beweisen, daß die Lipidmembran von der Festkörperoberfläche entkoppelt wurde. Durch seine intrinsische Eigenschaft hydrophil und biokompatibel zu sein, ist der Zellulosefilm gut geeignet, Proteoliposomenmembranen „streßfrei“ und nativ zu stützen (festkörpergestützte Membran).

### **1.3.5 Vergleich des Aufspreiitverhaltens von unspezifisch markierten Proteoliposomen auf unbeschichteten Glasoberflächen und auf hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilmen**

Die Darstellung der festkörpergestützten Proteoliposomen erfolgte durch unspezifische Fluoreszenzmarkierung der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase. Die Umschreibung „unspezifisch“ bezieht sich auf die Bindungsreaktion des Farbstoffs, wobei die Succinimidyl Ester Gruppe des TAMRA-SE chemisch an primäre wie sekundäre Aminogruppen unspezifisch bindet. Diese proteinmarkierten Proteoliposomen wurden anschließend auf eine RCA gereinigte Glasoberfläche (Deckgläschen) (Bild 1.13.a) und auf eine Glasoberfläche, beschichtet mit 10 Monolagen Zellulose (Bild 1.13.b), aufgespreitet.

Fluoreszenzaufnahmen der unbeschichteten Glasoberflächen (Bild 1.13.a) zeigten eine inhomogene Fluoreszenz, welche auf eine ungleichmäßige Verteilung der fluoreszierenden Proteine in der immobilisierten Membran hindeutet und auf zahlreiche lokale Defekte hinweist. Die ungleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz kommt dadurch zustande, daß der Abstand der Proteoliposomenmembran und der Oberfläche zu gering ist, so daß die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-Synthase Moleküle an die Glasoberfläche adhärieren und die aufgespreiteten Proteoliposomen auf die Glassoberfläche fest haften (Nissen, Gritsch et al. 1999). Dadurch entstehen vereinzelte Flecken auf der Oberfläche, die im Fluoreszenzmikroskop als heterogene Fluoreszenz sichtbar wurden. Eine

Verdopplung der Inkubationszeit von einer Stunde auf zwei Stunden führte nicht zu einer homogenen Beschichtung der Oberfläche.

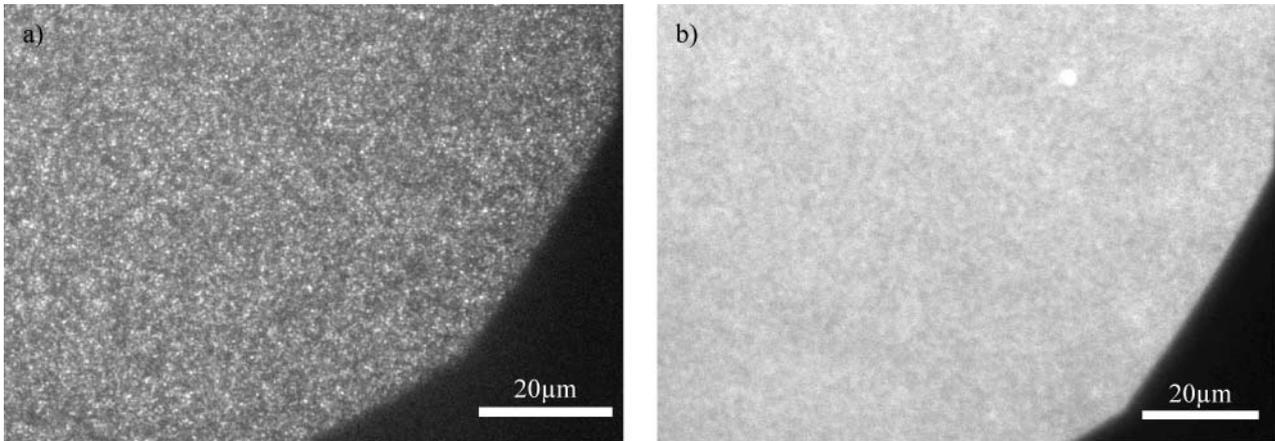


Abbildung 1.13: Fluoreszenzbild von TAMRA markierten Proteoliposomen, aufgespreitet auf eine unbehandelte Deckglasoberfläche (a) und auf 10 Monolagen Zellulose (b). Die ATP-Synthase wurde vor der Rekonstitution mit TAMRA fluoreszenzmarkiert. Bild a) weist eine inhomogene Fluoreszenz auf, was auf eine inhomogene Verteilung der ATP-Synthase hinweist. Wohingegen in Bild b) eine homogene Fluoreszenz zu erkennen ist,

Proteoliposomen aufgespreitet auf 10 Monolagen Zellulosefilme hingegen zeigten nach der gleichen Inkubationszeit (1 Stunde) eine homogene Fluoreszenz (Bild 1.13.b), was auf eine gleichmäßige Verteilung der fluoreszierenden Proteine innerhalb der festkörpergestützten Membran auf der Zelluloseoberfläche hinweist. 10 Monolagen Zellulosefilm verhinderten somit die feste Adhäsion der  $F_0F_1$  ATP-Synthase auf die Glasoberfläche, was mit der Entkopplung der Proteoliposomenmembran von der Festkörperoberfläche erklärt werden kann (Elender and Sackmann 1994). Diese gezielte Entkopplung der aufgespreiteten Membranen ermöglichte es, die vereinzelt immobilisierten Membranflecken auf der Oberfläche fluide zu halten, weshalb sie fusionieren konnten und dadurch eine homogene Beschichtung ausgebildet haben (Goennenwein, Tanaka et al. 2003; Purrucker, Förtig et al. 2004; Purrucker, Gonenwein et al. 2007). Die homogene Verteilung der Proteine weist drauf hin, daß adhäsive Kräfte zwischen der Membran und der Festkörperoberfläche so weit moduliert wurden, daß ein „Membrangleiten“ auf der Oberfläche stattfand (Rädler, Strey et al. 1995; Tanaka and Sackmann 2005).

Das Ergebnis der Beschichtung der Glasoberflächen verdeutlicht, daß Proteoliposomen auf die Festkörperoberfläche stark adhären. Dabei geht die  $F_0F_1$  ATP-Synthase mit der Festkörperoberfläche eine feste Verbindung ein, so daß kein „Membrangleiten“ der Proteoliposomenmembranen stattfindet und sich daher eine inhomogene (fleckige) Verteilung der Lipidmatrix auf der Festkörperoberfläche einstellt (Rädler, Strey et al. 1995; Nissen, Gritsch et al. 1999).

### 1.3.6 Verteilung der Proteoliposomenmembran auf hydrophilen, biokompatiblen

#### Zellulosefilmen

Da die TAMRA Markierung der  $F_0F_1$  ATP-Synthase keine Aussage über die Verteilung der Lipidmatrix auf dem Zellulosefilm zuläßt, wurden Matrix-markierte Proteoliposomen auf die biokompatiblen Zellulosefilme aufgespreitet. Das Fluoreszenzsignal der Lipidmatrix (Abbildung 1.14) zeigte ein gleichmäßiges und kontinuierliches Signal, das eine homogene Lipidmembran auf dem Zellulosefilm darstellt. Zusammenfassend beweist die homogene, laterale Verteilung der TAMRA markierten  $F_0F_1$  ATP-Synthase und die homogene, membranmarkierte Lipidmembran eine gleichmäßige Verteilung der Membran und der Proteine auf dem Zellulosefilm (Hillebrandt, Wiegand et al. 1999).

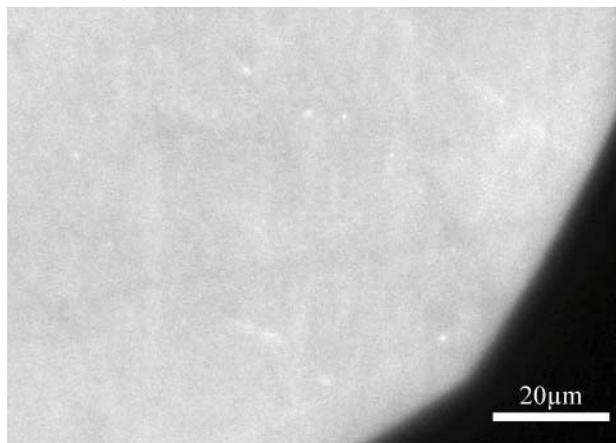


Abbildung 1.14: Fluoreszenzbild von NBD-PC markierten Proteoliposomen, die auf einer mit Zellulosefilmen beschichteten Oberfläche aufgespreitet wurden. Die homogene Fluoreszenz zeigt eine homogene Verteilung der Lipidmembran über der Zellulose.

### 1.3.7 Spezifische Antikörpermarkierung der Proteoliposomenmembran auf hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilmen

Nachdem gezeigt wurde, daß Proteoliposomen auf biokompatiblen Zellulosefilmen homogene, planare Lipidmembranen mit homogen verteilten ATP-Synthasen ausbilden, muß die Frage gestellt werden:

- a) ob die  $F_0F_1$  ATP-Synthase vollständig in die Lipidmembran eingebaut wurde, oder
- b) welche Orientierung die  $F_0F_1$  ATP-Synthase in der gestützten Membran angenommen hat („right side up“ oder „right side down“).

Um diese Frage beantworten zu können, wurden Proteoliposomen auf Zellulosefilme aufgespreitet und mit monoklonalen Antikörpern gegen die ATP-Bindestelle markiert (Bild 1.15.a). Durch die Wahl eines selektiven Antikörpers gegen die ATP-Bindestelle wurde der  $F_1$  Komplex ( $\beta$ -Untereinheit) der  $F_0F_1$  ATP-Synthase spezifisch markiert. Dieser erste Antikörper wurde mit einem zweiten, FITC markierten Antikörper nachgewiesen (Bild 1.15.b).

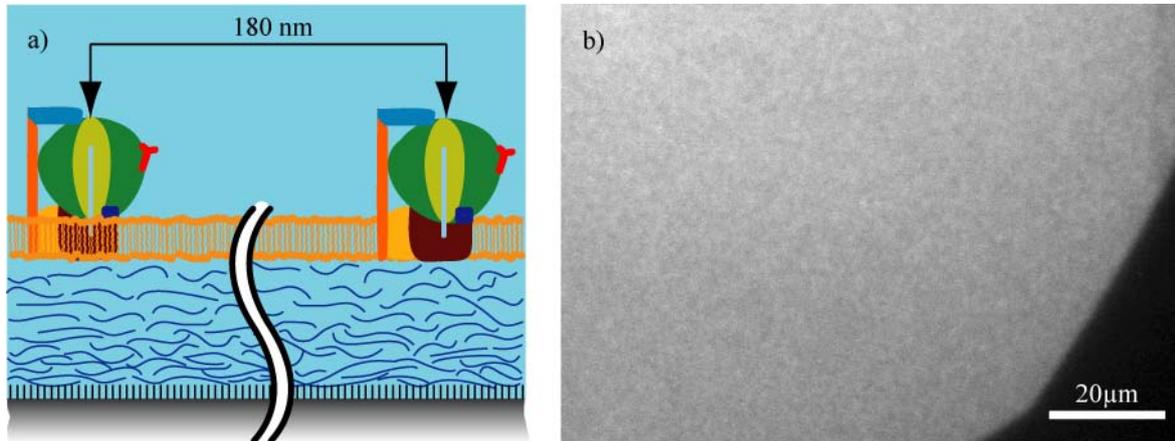


Abbildung 1.15: a) Schema zu Zellulosefilmen gestützten Proteoliposomenmembran, in denen die ATP-Synthase durch Antikörpermarkierung nachgewiesen wurde. Bild b) zeigt eine Fluoreszenzaufnahme von Proteoliposomen, die auf Zellulosekissen aufgespreitet wurden. Die ATP-Synthase wurde nach dem Aufspreiten mit einem monoklonalen Antikörper gegen die ATP Bindestelle markiert. Der erste Antikörper wurde mit einem zweiten, FITC markierten Antikörper nachgewiesen.

Ein positives Fluoreszenzsignal der Antikörpermarkierung zeigte, daß der  $F_1$  Komplex in der Lipidmembran immobilisiert vorkommt. Dies beweist, daß die  $F_0F_1$  ATP-Synthase während der Aufreinigung, der Rekonstitution in die Liposomen und des Aufspreitens auf die Festkörperoberfläche als Gesamtkomplex erhalten geblieben ist. Darüber hinaus zeigt die Fluoreszenz, daß der Antikörper an die ATP Bindestelle gebunden hat.

Gegenwärtig ist ein kommerzieller Antikörper zur Markierung der zytoplasmatischen Domäne des transmembranen  $F_0$  Komplex von *Micrococcus lysodicticus* (ATCC 4698) nicht vorhanden. Diese Domänen sind wenig konserviert, weshalb Antikörper gegen diese Domänen anderer Organismen nicht eingesetzt werden können. Daher ist ein immunochemischer Nachweis der zytoplasmatischen Domäne der ATP-Synthase nicht möglich.

Es muß festgehalten werden, daß die maximale optische Auflösung eines Mikroskops physikalisch immer die Hälfte der eingesetzten Wellenlänge ist. Somit muß darauf hingewiesen werden, daß alle Informationen, die hier gewonnen wurden, im  $\mu\text{m}$ -Maßstab anzusetzen sind. Eine genauere lokale Untersuchung wurde mit Hilfe der RKM durchgeführt.

### 1.3.8 Mögliche Aufspreitmeehanismen von Proteoliposomen

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen verdeutlichen, daß die homogene Beschichtung einer Festkörperoberfläche nur nach der Modulation der Kräfte zwischen der Lipidmembran und der Festkörperoberfläche erfolgen kann (Elender and Sackmann 1994; Sackmann and Bruinsma 2002). Diese Modulation erfolgte hier durch das Einfügen von 10 Monolagen Zellulose. Nach Keller et al. (Keller and Kasemo 1998) findet die homogene Beschichtung einer Oberfläche in 2 Phasen statt:

1. Adsorption und Platzen der Proteoliposomen auf der Substratoberfläche und
2. Beschichten der Substratoberflächen.

Aus diesem Beschichtungsprozeß geht nicht hervor, welche Orientierung Proteoliposomenmembranen auf der Festkörperoberfläche einnehmen. Für biotechnologische Anwendungen ist die Orientierung der Membran entscheidend, da durch die Asymmetrie der Membranproteine unterschiedliche Proteinfunktionen entstehen (Reichstein and Blostein 1975; Daley, Rapp et al. 2005). Es gibt 2 theoretische Aufplatzmechanismen (Abbildung 1.16):

- a) die Außenseite der Proteoliposomen wird zum Puffer hin exponiert  
„right side out“ (RSO)
- b) die Innenseite der Proteoliposomen wird zum Puffer hin exponiert.  
„in side out“ (ISO)

Mit den Ergebnissen der Antikörpermarkierung (Abbildung 1.15.b) wurde gezeigt, daß die ATP-Synthase rekonstituiert in ca. 60 nm große Liposomen den  $F_1$  Komplex zum Puffer hin exponiert. Daraus geht der Aufspreitmeehanismus 1.16.a hervor. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Studien, in denen Proteoliposome mit Photosynthetischen Reaktionszentren und Wachstumsfaktoren untersucht wurden (Contino, Hasselbacher et al. 1994; Salafsky, Groves et al. 1996).

Die negativ Kontrolle der Proteinorientierung, also der Nachweis der zytoplasmatischen Domänen der transmembranen  $F_0$  Untereinheit, ist durch Antikörpermarkierung nicht möglich. Daher konnte mit den Ergebnissen der Antikörpermarkierung nicht eindeutig nachgewiesen werden, daß eine asymmetrische Proteoliposomenmembran hergestellt und gerichtet auf die Festkörperoberfläche immobilisiert wurde. Diese Frage wurde anschließenden mit RKM Messungen beantwortet.

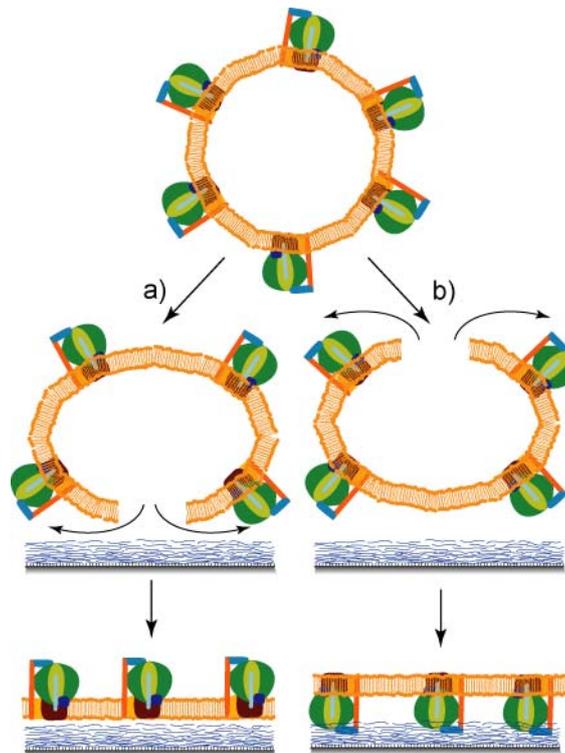


Abbildung 1.16: Mögliche Aufspreitmechanismen von Proteoliposomen auf einer Zellulose beschichteten Oberfläche. Darstellung a) beschreibt den RSO Mechanismus, nachdem Proteoliposomen ihre „Außenseite“ zum Puffer hin exponieren. Darstellung b) zeigt den ISO Mechanismus, nachdem die „Innenseite“ der Proteoliposomen zum Puffer hin exponiert wurde.

Der ermittelte Aufspreitmechanismus von ca. 60 nm großen Proteoliposomen ist entgegengesetzt zu früheren Studien mit  $\mu\text{m}$ -großen Liposomen und humanen Erythrozyten Ghostzellmembranen, bei denen nur die innere (zytoplasmatische Domäne) der Membranen nachgewiesen wurde (Abbildung 1.16.b) (Tanaka, Kaufmann et al. 2001; Tanaka, Wong et al. 2004). Dieser Unterschied in der Membranorientierung einer gestützten Zell- oder Proteoliposomenmembran weist darauf hin, daß der Aufspreitmechanismus von der Größe der Membranen abhängt und daher der effektive Kontaktwinkel zwischen Membran und planarer Oberfläche, d.h. der Größenunterschied zwischen Proteoliposomen ( $\text{\O} \sim 50 \text{ nm}$ ) und Zellen ( $\text{\O} \sim 5 \mu\text{m}$ ), den Aufplatzmechanismus ausschlaggebend beeinflusst (Tanaka, Kaufmann et al. 2001).

### 1.3.9 Bestimmung der Orientierung und des lateralen Abstands der $\text{F}_0\text{F}_1$ ATP-Synthase mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie

Die Proteinorientierung und die Bestimmung des mittleren Abstands der Proteine in der Lipidmembran wurden mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (RKM) im Kontaktmodus vermessen.

Hierfür wurden die Proben nicht auf eine Deckglasoberfläche, sondern auf eine Siliziumwaferoberfläche aufgespreitet. Die Oberfläche von Deckgläsern besitzt eine hohe Rauigkeit. Die „niedrige“ Oberflächenrauigkeit der Beschichtungen wäre damit nicht von der „hohen“ Oberflächenrauigkeit der Deckgläser zu differenzieren. Dagegen kann die Oberfläche von polierten Siliziumwafern als eine atomar „terrassierte“ Oberfläche angesehen werden, die eine RMS-Rauigkeit im Å-Bereich auf den Terrassen besitzt. Somit können geringe Rauigkeiten der Oberflächenbeschichtungen ermittelt werden.

Abbildung 1.17 zeigt die ODTMS beschichtete Oberfläche eines Siliziumwafers. Ein 500nm x 500nm Ausschnitt ist gezeigt, der eine RMS-Rauigkeit von 3 Å besitzt. Aus der Topographie geht hervor, daß die Siliziumoberfläche defektfrei beschichtet wurde. Aus der Neutronenreflektivität in Abbildung 1.12.b und 1.12.c kann abgelesen werden, daß die ODTMS Monolage eine Höhe von ca. 1 nm besitzt. Die Kombination der Daten aus der Neutronenreflektivität und der RKM Messungen zeigt, daß die Siliziumoberfläche defektfrei mit einer Monolage ODTMS beschichtet wurde.

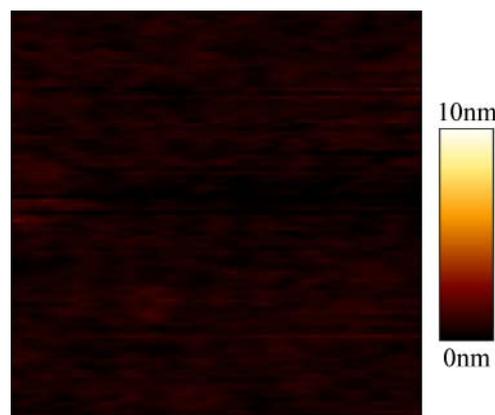


Abbildung 1.17: Eine 500 nm x 500 nm große RKM Aufnahme eines ODTMS beschichteten Siliziumwafers (RMS Rauigkeit = 3 Å). Die Topographie zeigt eine homogene Beschichtung der Siliziumwafer-Oberfläche.

Abbildung 1.18.a zeigt die Oberflächentopographie eines regenerierten Zellulosefilms auf ODTMS. Die RMS-Rauigkeit einer 500 nm x 500 nm großen Zelluloseoberfläche beträgt 1,7 nm und zeigt eine bis auf wenige lokale Defekte gleichmäßig beschichtete Oberfläche. Bei Beschichtung der Zelluloseschicht mit Liposomen (Abbildung 1.18.b) änderte sich die RMS-Rauigkeit geringfügig auf 1,9 nm. Aus der RMS-Rauigkeit von 1,9 nm kann gefolgert werden, daß durch die Liposomenmembran keine weiteren Defekte auf der Zelluloseoberfläche generiert wurden (homogene Oberflächenbeschichtung) oder Liposomen adhärent vorlagen.

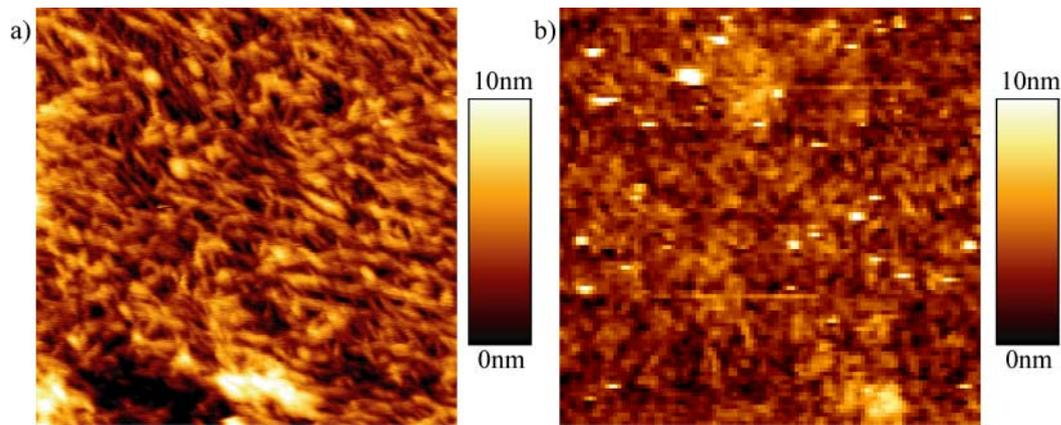


Abbildung 1.18: a) Eine 500 nm x 500 nm große RKM Aufnahme eines Zellulosefilms (RMS Rauigkeit = 1,7 nm). Die Aufnahme zeigt, daß die Substratoberfläche gleichmäßig mit Zellulosefasern beschichtet ist. b) Eine 500nm x 500nm große Aufnahme einer Lipidmembran (RMS Rauigkeit = 1,9 nm) auf einem Zellulosefilm. Die Aufnahme zeigt eine Oberfläche, die gleichmäßig mit der Lipidmembran beschichtet ist.

Bild 1.19.a zeigt die Topographie einer 1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$  großen festkörpergestützten Proteoliposomenmembran auf 10 Monolagen Zellulose, die eine RMS-Rauigkeit von 1.6 nm besitzt. Die Topographie zeigt zudem homogen verteilte Ausstülpungen, die lateral gleichmäßig verteilt sind und zudem eine homogene Höhenverteilung besitzen. Die Höhenverteilung wurde mit Hilfe eines Linienprofils (Abbildung 1.19.b) als Gesamthöhe von ca. 9 nm bestimmt. Zudem kann über die Anzahl der ermittelten Ausstülpungen (5 verschiedene Aufnahmen) ihr mittlerer Abstand mit 180 nm bestimmt werden.

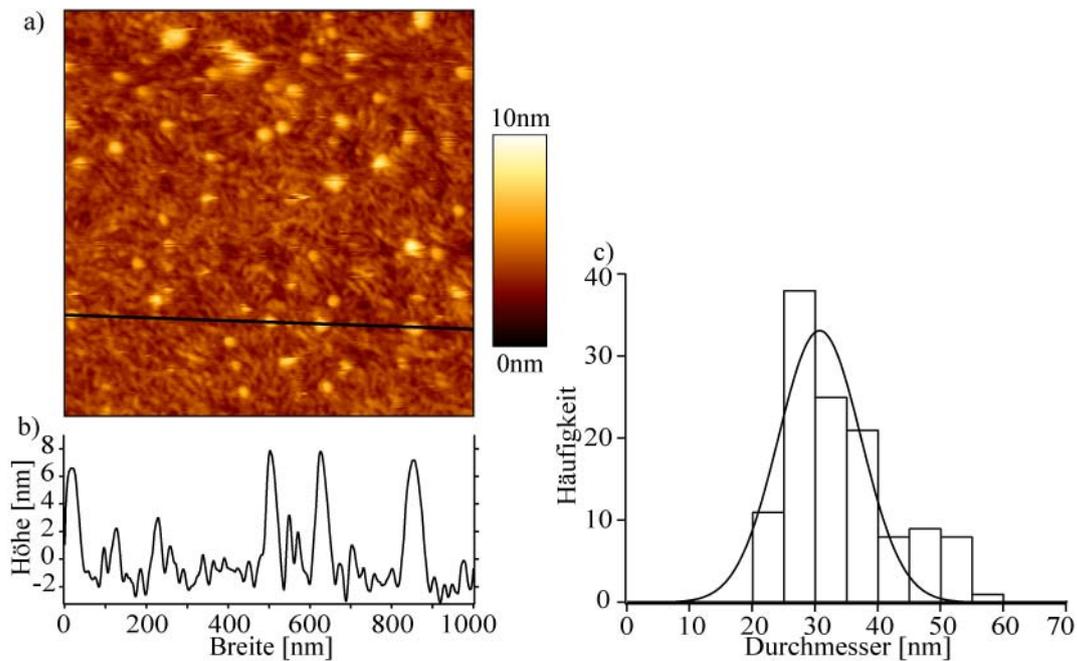


Abbildung 1.19: Bild a) zeigt eine 1 µm x 1 µm große RKM Aufnahme der Oberflächentopographie einer Proteoliposomenmembran auf einer Zellosegeschicht. Die Oberfläche ist homogen beschichtet und zeigt einige Ausstülpungen. Bild b) zeigt das Höhenprofil entlang der eingezeichneten Linie. Aus dem Höhenprofil kann die Gesamthöhe der Ausstülpungen mit ca. 9 nm bestimmt werden. Im Histogramm c) wurde der Durchmesser der Ausstülpungen ermittelt und mit einer Gauss-Verteilung analysiert. Das Maximum der Gauss-Verteilung beträgt ca. 30nm.

Im Histogramm (Abbildung 1.19.c) wurde die mittlere laterale Ausdehnung der Ausstülpungen ermittelt. Durch Bildverarbeitung wurden die Fläche von ca. 120 Ausstülpungen bestimmt sowie deren Durchmesser unter der Annahme einer kreisförmigen Grundfläche ausgerechnet. Mithilfe der Gauss-Verteilung wurde der maximale Durchmesser der Ausstülpungen mit ca. 30 nm bestimmt. Laterale Größen, die mit der RKM ermittelt wurden, müssen unter der Einschränkung der Abbildungsverzerrung betrachtet werden (Engel, Schoenenberger et al. 1997). Die Abbildungsverzerrung wird durch die Geometrie der Cantileverspitze verursacht und kann für ein sphärisches Objekt mit folgender Gleichung ermittelt werden:

$$FWHM = 2\sqrt{rL + \frac{L^2}{4}}$$

Dabei wird die Halbwertsbreite (FWHM) des topographischen Profils in Relation zum Radius r der Cantileverspitze und zur lateralen Länge L des Objekts gesetzt. Der Spitzeradius wurde laut Herstellerangabe mit 10 nm angenommen und als FWHM der Ausstülpungen der Wert von 30 nm, aus dem Histogramm 1.18.b, angenommen. Unter Berücksichtigung der Abbildungsverzerrung ergibt

sich eine laterale Ausdehnung der Ausstülpungen von 5 - 10 nm, welche in guter Übereinstimmung mit der Ausdehnung der Kopfgruppe der  $F_1$  ATP-Synthase von 10 nm steht, die aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelt wurde (Boyer 1997).

Weitergehend stimmt der mit der RKM gemessene mittlere Abstand der Ausstülpungen (Abbildung 1.20) von 180 nm sehr gut mit den erwarteten mittleren Abständen aus den Molarenverhältnissen (140 nm) überein. Die molaren Verhältnisse wurden aus der Lipid- und Proteinkonzentration sowie des damit verbundenen Flächenbedarfs der Lipide und Proteine ermittelt.

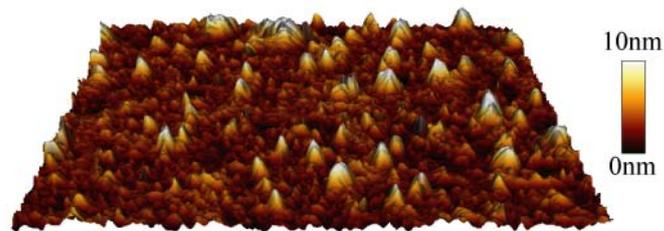


Bild 1.20: 3 dimensionale Darstellung der Oberflächentopographie gezeigt in 1.15. Deutlich sind eine gleichmäßige laterale Verteilung und die gleichmäßige Höhe der Ausstülpungen zu erkennen.

Somit kann aus den Ergebnissen der RKM-Messungen zusammengefaßt werden, daß die ermittelten Ausstülpungen den  $F_1$  Komplex der ATP-Synthase darstellen. Es konnte gezeigt werden, daß der  $F_1$  Komplex verankert in der Lipidmembran vorkommt und zum Puffer hin gerichtet ist. Zudem sind der gemessene mittlere Abstand von 180 nm und der ausgerechnete mittlere Abstand von 140 nm der ATP-Synthase starke Hinweise darauf, daß die ATP-Synthase unidirektional in der festkörpergestützten Membran vorliegt.

Der Aufspreitmechanismus ist monodirektional, daß heißt, daß er nur nach einem Mechanismus erfolgt (Abbildung 1.16.a). Unter Berücksichtigung der unidirektional vorliegenden ATP-Synthase in der festkörpergestützten Membran darf daher geschlußfolgert werden, daß die ATP-Synthase in Liposomen unidirektional eingebaut und auf einer Festkörperoberfläche immobilisiert wurde. Diese Asymmetrie natürlicher Membranen wurde mit der  $F_0F_1$  ATP-Synthase im Membran-Modell-System eindeutig konstruiert. Es wurde zudem mit der Hilfe der spezifischen Antikörpermarkierung an der ATP-Bindestelle nachgewiesen, daß dieses Membran-Modell-System funktional auf die Festkörperoberfläche immobilisiert vorlag.

Durch die gewonnenen Kenntnisse, daß der Aufspreitmechanismus durch die Größe der Proteoliposomen gesteuert werden kann und daß die gewünscht Proteine vektorieell in Liposomen eingebaut werden können, besitzt man nun die Möglichkeit, Proteindomänen gezielt auf Festkörperoberflächen vektorieell zu immobilisieren, und zwar so, daß diese katalytisch-aktiv für technische Prozesse eingesetzt werden können.

## 1.4 Resumée

Mit Hilfe der DLS Messungen wurde bestätigt, daß die Rekonstitution der  $F_0F_1$  ATP-Synthase in intakte Liposomen folgte. Dies ist dahingehend von großer Bedeutung, da die  $F_0F_1$  ATP-Synthase eine starke Asymmetrie mit einer transmembranen Domäne, in der Höhe der Lipidmembran, und einem hydrophilen Kopf mit einem Durchmesser von 10 nm besitzt. Diese Asymmetrie konnte vorteilhaft in der Rekonstitution eingesetzt werden, da keine Defekte in den Liposomen existierten, die die Passage der hydrophilen  $F_1$ -Untereinheit der ATP-Synthase zuließen.

Die Validierung der gerichteten Rekonstitution der  $F_0F_1$  ATP-Synthase erfolgte auf festkörpergestützten Proteoliposomenmembranen. Um eine homogene Oberflächenbeschichtung auf einer dichten Festkörperoberfläche zu ermöglichen, wurde zuerst die Festkörperoberfläche mit einem ultradünnen, hydrophilen, biokompatiblen Zellulosefilm beschichtet. Die Filmdicke wurde mit Hilfe ihrer Streulängendichte analysiert und lieferte eine Filmhöhe von ca. 10 nm, die ein effektives Entkoppeln der Proteoliposomenmembran von der Oberfläche ermöglichte.

Durch Markierung der Lipidmembran mit fluoreszenzmarkierten Lipiden wurde auf den Zellulosefilmen eine homogene Membranbeschichtung nachgewiesen. Chemisch markierte  $F_0F_1$  ATP-Synthasen zeigten eine homogene Verteilung der Proteine innerhalb der Lipidmembran. Die gerichtete Rekonstitution wurde mit spezifischer Antikörpermarkierung der  $F_0F_1$  ATP-Synthase durchgeführt, in der die Kopfgruppe der ATP-Synthase ( $F_1$  Untereinheit) nachgewiesen wurde. Der Antikörper war spezifisch gegen die ATP-Bindestelle der  $F_1$  Untereinheit, wodurch die native Immobilisierung der  $F_0F_1$  ATP-Synthase nachgewiesen wurde. Eine Negativkontrolle, die den umgekehrten Einbau in die Liposomen und damit die umgekehrte Immobilisierung auf dem Zellulosefilm nachweisen kann, ist nicht möglich, da es keine kommerziellen Antikörper gegen zytosolische Domänen der  $F_0F_1$  ATP-Synthase von *Micrococcus lysodicticus* gibt. Daher wurden durch Bestimmung der Topographie der immobilisierten Membran die hydrophilen Kopfgruppen detektiert und über eine Bildanalyse der mittlere Abstand mit 180 nm der  $F_0F_1$  ATP-Synthase bestimmt. Ebenfalls wurde der mittlere Abstand der  $F_0F_1$  ATP-Synthase aus der Lipid- und Proteinkonzentration mit einem Wert von 140 nm ermittelt. Aus diesen Werten ist ersichtlich, daß die Rekonstitution der  $F_0F_1$  ATP-Synthase unidirektional in die Liposomen erfolgte und daß deren Immobilisierung auf biokompatiblen Zellulosefilmen ebenfalls unidirektional stattfand.

## 2. Beschichtungskinetik von Membranpräparaten aus humanen Erythrozyten auf unmodifizierten, porösen Partikeloberflächen unter Berücksichtigung der Partikelgrößen<sup>2</sup>

### **Zusammenfassung**

Die Beschichtungskinetik von unmodifizierten und porösen Silicapartikeln mit konstanten Porengrößen (1000 Å), aber unterschiedlichen Durchmessern (5, 10 und 30 µm), wurde mit Ghostzellen aus humanen Erythrozyten untersucht. Die Beschichtungskinetik ist von der Partikelgröße und damit vom Kontaktwinkel zwischen der Ghostzelle und der Partikeloberfläche abhängig. Mit Hilfe von Antikörpermarkierung wurde eindeutig nachgewiesen, daß Ghostzellen nach der Präparation die native Orientierung der Erythrozyten beibehalten, wohingegen Ghostzellen bei der Partikelbeschichtung die Membranorientierung invertieren. Im Gegensatz zu planaren Oberflächen bieten sphärische poröse Partikeloberflächen den Vorteil, eine größere Fläche zu immobilisieren und keine Oberflächenmodifikation für eine homogene Oberflächen-beschichtung zu benötigen, wodurch ihre Herstellung stark vereinfacht wird.

---

<sup>2</sup> Murat Tutus, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka

„Spreading Kinetics of Human Erythrocyte Membranes on Particle Supports: Influence of Contact Curvatures“, in preparation

## Einleitung

In einem ersten Schritt wurde die Beschichtungskinetik poröser, sphärischer Silicapartikel mit Ghostzellmembranen bestimmt. Unmodifizierte Partikel verschiedener Durchmesser, aber mit konstanten Porengrößen (1000 Å), wurden eingesetzt, deren Oberflächenrauigkeit sich in der gleichen Größenordnung befand (charakteristischer Abstand der Oberflächenstrukturen ca. 113 - 176 nm). Die Partikelbeschichtung erfolgte mit Ghostzellen aus humanen Erythrozyten, die eine monodisperse Größenverteilung (Durchmesser 4 µm) besitzen. Durch die zeitliche Bestimmung der immobilisierten Membranfläche der Ghostzellen auf der Partikeloberfläche wurde gezeigt, daß die Beschichtungskinetik von der Partikelgröße und somit vom Kontaktwinkel zwischen Partikeloberfläche und Ghostzellmembran abhängig ist.

Zudem konnte mit membranmarkierten Ghostzellen nachgewiesen werden, daß unmodifizierte, poröse Partikeloberflächen homogen beschichtet wurden. Dies steht im Gegensatz zur Beschichtung von planaren Oberflächen, die nur nach Modifikation der Oberflächen homogen mit Proteoliposomenmembranen beschichtet wurden (Tanaka, Kaufmann et al. 2001; Tanaka, Wong et al. 2004; Kaufmann, Weiss et al. 2007).

Mit spezifischen Antikörpern, die Proteindomänen der Innenseite (Bande3) beziehungsweise Außenseite (Glykophorin) der Ghostzellmembranen erkennen, wurde gezeigt, daß Ghostzellen die native Membranorientierung der Erythrozyten beibehalten haben (Schwoch and Passow 1973), wohingegen die immobilisierte Ghostzellmembran auf Silicapartikeln eine invertierte Membranorientierung aufzeigt (Kaufmann and Tanaka 2003). Aus dieser Änderung der Membranorientierung geht ein invertierender Aufspreitmechanismus hervor, der die Proteindomänen der Innenseite der Ghostzellen zum Puffer hin exponiert.

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden falls nicht anders erwähnt wie in Teil 1 beschrieben von Sigma Aldrich und Carl Roth bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Reinstwasser (Millipore, Molsheim, Frankreich) mit einem spezifischen Widerstand  $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$  wurde benutzt. Das Lipidanalogen 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamin Triethylammonium Salz (Texas-Red DHPE) (Avanti Polarlipids, Alabaster, USA) wurde eingesetzt (Abbildung 2.1.a). Alle Antikörper wurden von Sigma Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Als erster Antikörper wurden in Maus exprimierter Antikörper gegen Bande3 und ein Antikörper gegen Glykophorin eingesetzt. Der zweite Antikörper war ein Ziege Anti-Maus FITC (Abbildung 2.1.b) konjugierter, polyklonaler Antikörper (ganzer Antikörper).

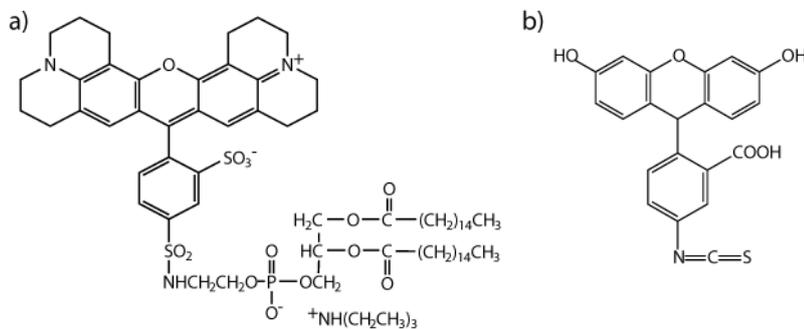


Abbildung 2.1: Strukturformel von Texas-Red DHPE (a), das ein Kopfgruppen markiertes Lipidanalogen ist. Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes FITC (b), der konjugiert am zweiten Antikörper vorlag.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Ghostzellen erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Deutschland).

Für die Bestimmung der Lipidkonzentration wurden Reinstwasser, Perchlorsäure, Ammoniummolybdat und Ascorbinsäure eingesetzt.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden Ready Gels (linearer Gradient 4-15% Tris-HCl) und Molekular-Gewichtsmarker (10-250 kDa, Bio Rad, München, Deutschland) benutzt.

### 2.1.2 Silicapartikel

Es wurden Silicapartikel aus hochreinem Silica (Si-OH) in den Größen 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  und 30  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit einer Größenverteilung von  $\pm 1,5 \mu\text{m}$  eingesetzt. Alle Partikel sind sphärisch und besitzen einen netzwerkartigen Aufbau mit einem Porenvolumen von 0,8ml/g und einer einheitlichen Porengröße von 1000  $\text{\AA}$  (Abbildung 2.2).

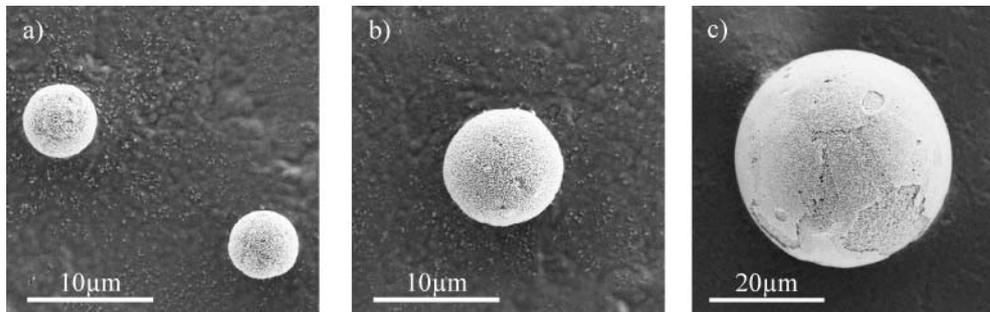


Abbildung 2.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der eingesetzten Partikel. Gezeigt sind in a) 5  $\mu\text{m}$ , b) 10  $\mu\text{m}$  und c) 30  $\mu\text{m}$  große Silicapartikel.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Erythrozyten Membranenpräparation

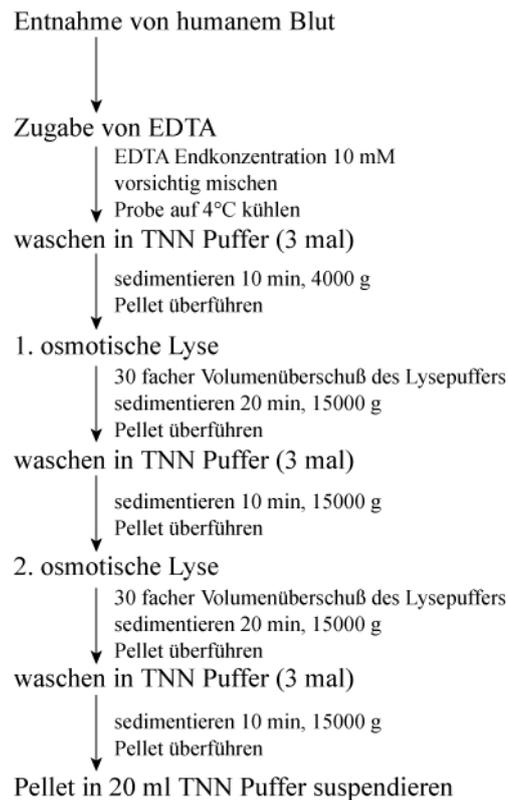
In der Präparation - wie in allen Experimenten mit Ghostzellen - wurde ein Standard TNN Puffer (pH = 8,0) verwendet.

TNN Puffer	Molarität
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	10 mM
NaCl <sub>2</sub>	150 mM
NaN <sub>3</sub>	1 mM

Die osmotische Lyse der Erythrozyten erfolgte in einem Lysepuffer, bei dem es sich um TNN Puffer (pH = 8,0) ohne 150 mM NaCl<sub>2</sub> handelt.

Frisch entnommenem, humanem Blut wurde sofort EDTA (Endkonzentration 10 mM) zugegeben, um die Blutkoagulation zu unterbinden (Präparationsschema 2.1). Alle weiteren Präparationsschritte wurden nachfolgend bei 4°C durchgeführt. Das entnommene Blut wurde 3 mal in TNN Puffer gewaschen (10 min, 4.000 g), um Blutserum und alle nicht zellulären Bestandteile (Blutplasma: Albumine, Globuline, Lipide, Blutzucker, etc.) zu entfernen. Der zelluläre Bestandteil des Blutes besteht zu einem großen Teil aus Erythrozyten (pro µl Blut bis zu 6.000.000 Erythrozyten). Erythrozyten wurden in einem hypotonischen Lysepuffer für 10 Minuten bei 4°C lysiert. Das freigesetzte Hämoglobin der Erythrozyten wurde durch mehrmaliges Waschen (20 min, 15.000 g) entfernt. Um das Hämoglobin vollständig aus den Erythrozyten zu entfernen, wurden die Hämolysen und die folgenden Waschschrte 1 mal wiederholt (Schwoch and Passow 1973).

Durch die Lyse wurden alle zytosolischen Elemente (hauptsächlich das Hämoglobin) entfernt. Erythrozyten Membranpräparate sedimentieren leicht (10 min, 15.000 g), bilden dabei ein weißes, „weiches“ Pellet und erscheinen in der Phasenkontrastmikroskopie als durchsichtige Membranpräparate. Daher werden Erythrozyten Membranpräparate in der Fachliteratur auch als „Ghostzellen“ bezeichnet.



Präparationsschema 2.1: Aufreinigung von Erythrozyten Membranpräparaten aus humanem Blut.

### 2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung der Ghostzellen erfolgte nach der Methode von Bradford mit einem Bio-Rad Proteinassay (Bradford 1976). Bei der kolorimetrischen Konzentrationsbestimmung bindet Coomassie Brilliant Blau G250 an aromatische Aminosäuren von Proteinen. Die Komplexbildung erfolgte in zwei Schritten: in einem ersten Schritt wurde das freie Proton des Coomassie an ionisierbare Gruppen (aromatische Aminosäuren) der Proteine abgegeben, wodurch es zu Änderungen der räumlichen Struktur der Proteine kam. Hydrophobe Domänen der Proteine wurden nach außen exponiert, die in einem zweiten Schritt über van-der-Waals Interaktionen an unpolare Regionen des Farbstoffs gebunden haben. Dabei verschob sich das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595 nm, welches photometrisch bestimmt wurde.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Microassay Methode durchgeführt. Dafür wurden 980 µl Bradfordreagenz mit 20 µl Ghostzellen gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration des entstandenen Farbkomplexes wurde photometrisch ermittelt und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt.

### 2.2.3 Bestimmung der Lipidkonzentration

Die Bestimmung der Lipidkonzentration erfolgte wie unter Teil 1 beschrieben nach der Methode von Fiske und Subbarow (Fiske and Subbarow 1925).

### 2.2.4 Fluoreszenzmarkierung von Ghostzellen

Die Lipidmembran der Ghostzellen wurde unspezifisch mit dem kopfgruppenmarkierten Lipidanalogen Texas-Red DHPE fluoreszenzmarkiert (Tabelle 2.1) (Pagano, Longmuir et al. 1983; Haverstick and Glaser 1987). Die Membranmarkierung erlaubt es, das Vorhandensein und die Verteilung der Lipidmembran mit der Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen.

Die Fluoreszenzmarkierung (Tabelle 2.1) wurde mit 0,1 mol% Texas-Red DHPE (Absorptionsmaximum = 595 nm, Emissionsmaximum = 615 nm) durchgeführt. Dieses molare Verhältnis führt zu einem deutlichen Fluoreszenzsignal bei niedrigsten Farbstoffkonzentrationen. Es garantiert zudem, daß die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Ghostzellmembranen durch die Kopfgruppen des Lipidanalogs nicht gestört werden.

In Chloroform gelöstes Texas-Red DHPE (10 µg) wurde in einem Rotationsverdampfer eingetrocknet. Über Nacht wurde der getrocknete Lipidfilm im Vakuumschrank gelagert, um Chloroformreste vollständig zu entfernen. Nach Trocknung wurde Texas-Red DHPE in 6 µl Ethanol gelöst. Der Einsatz des schwach amphiphilen Lösungsmittels Ethanol ermöglichte es amphiphile Moleküle wie Texas-Red DHPE zu lösen und gleichzeitig die Löslichkeit in wäßrigem Puffer zu garantieren. Texas-Red DHPE bildete in Ethanol Liposomen aus, die sich spontan in die Lipidmembran von Ghostzellen einbauten. Markierte Ghostzellmembranen wurden anschließend in einem Waschschrift (10 min, 10000 g) von ungebundenem Texas-Red DHPE getrennt.

Schritt	Fluoreszenzmarkierung der Ghostzellmembran
1	eintrocknen von 10 µg Texas-Red DHPE (entspricht 0,1 mol% Lipid)
2	Texas-Red DHPE in 6 µl Ethanol resuspendieren
3	Zugabe von 1 mg Ghostzellen
4	Im Überkopfrührer für 1 h bei RT inkubieren
5	abtrennen der Texas-Red DHPE Mizellen von den Ghostzellen für 10 min bei 10000 g
6	markierte Ghostzellen in TNN Puffer aufnehmen
7	markierte Ghostzellen 2 mal in TNN Puffer waschen

Tabelle 2.1: Schema zur Membranmarkierung der Ghostzellen

Die Membranorientierung sowie die Verteilung der Membranproteine der Ghostzellen wurden durch spezifische Antikörpermarkierung (Tabelle 2.2) von Epitopen der transmembranen Proteine Bande3 und Glykophorin nachgewiesen.

Für die Antikörpermarkierung wurde 1 ml der Ghostzellsuspension (Proteinkonzentration = 2mg/ml) abzentrifugiert und anschließend mit 1 ml 3% (w/v) RSA-Lösung bei RT für 1h inkubiert, um ein unspezifisches Binden von Antikörpern zu verhindern. Die passivierten Ghostzellen wurden aliquotiert und anschließend der erste Antikörper zugegeben. Ungebundene Antikörper wurden durch Sedimentation der Ghostzellen getrennt und dann der zweite FITC konjugierte Antikörper zugegeben (Absorptionsmaximum = 485 nm, Emissionsmaximum = 514 nm). Anschließend wurden die Ghostzellen in TNN gewaschen und mit der Fluoreszenzmikroskopie betrachtet.

Schritt	Fluoreszenzmarkierung von transmembranen Proteinen	
1	1 ml Ghostzellen sedimentieren (10 min, 10000 g) und Überstand verwerfen	
2	1 ml 3% (w/v) RSA zugeben, 1h passivieren	
3	aufteilen der Probe	
4	sedimentieren der passivierten Ghostzellen für 10 min, 10000 g	
5	Zugabe von monoklonalen anti-Bande3 Antikörpern (Titer 1:500)	Zugabe von monoklonalen anti-Glykophorin Antikörpern (Titer 1:150)
6	1 h bei RT inkubieren	
7	sedimentieren der Antikörper markierten Ghostzellen für 10 min, 10000 g	
8	Zugabe des 2. FITC konjugierten Antikörpers und Inkubation 1h	
9	waschen in TNN Puffer (10 min, 10000 g) und resuspendieren in TNN Puffer	

Tabelle 2.2: Spezifische Antikörpermarkierung der Ghostzellen zur Bestimmung der Membranorientierung und der Proteinverteilung

### 2.2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Die Auflösung eines Mikroskops ist im wesentlichen von der Wellenlänge der verwendeten elektromagnetischen Strahlung abhängig, d.h. es können mit kleineren Wellenlängen feinere Strukturen aufgelöst werden. In der Rasterelektronenmikroskopie (REM) verwendet man Elektronenstrahlen mit Wellenlängen von  $10^{-2}$  nm, wodurch Strukturen im nm-Bereich aufgelöst werden können (Abbildung 2.2).

Im Rasterelektronenmikroskop (Leo 1550, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) wurden Partikeloberflächen im Ultrahochvakuum mit einem Elektronenstrahl abgerastert. Die

Charakterisierung der Oberflächentopographie erfolgte mit Sekundärelektronen, die durch Interaktion mit der Oberfläche entstanden und die Oberflächentopographie der Partikel darstellten.

### 2.2.6 Charakterisierung der Silicapartikeloberflächen

Um die Beschichtungskinetik aller Partikelgrößen vergleichen zu können, müssen Einflüsse der Materialien sowie der Oberflächenstrukturen ausgeschlossen werden. Erst dann können den einzelnen Partikelgrößen Beschichtungskinetiken zugeordnet und darüber hinaus zueinander in Verbindung gestellt werden.

Materialeffekte konnten ausgeschlossen werden, da alle Partikel die gleiche chemische Zusammensetzung aus hochreinem, unmodifiziertem Silica (Si-OH) besaßen. Oberflächeneinflüsse wurden durch den Einsatz von Partikeln mit einheitlicher Porengröße von 1000 Å ausgeschlossen. Es muß aber angemerkt werden, daß sich durch die variierenden Partikelgrößen unterschiedliche Oberflächenkrümmungen ergeben, die möglicherweise die Oberflächenrauigkeit beeinflussen (siehe Kapitel 2.2.7).

Betrachtet man die unterschiedlichen Oberflächenkrümmungen in Verbindung mit der konstanten Größe der Ghostzellen, so ergibt sich eine Geometrie, bei dem die Änderung des Kontaktwinkels (Abbildung 2.3) zwischen Ghostzellen und Partikeloberfläche, der einzige variierende Parameter ist (Kaufmann and Tanaka 2003).

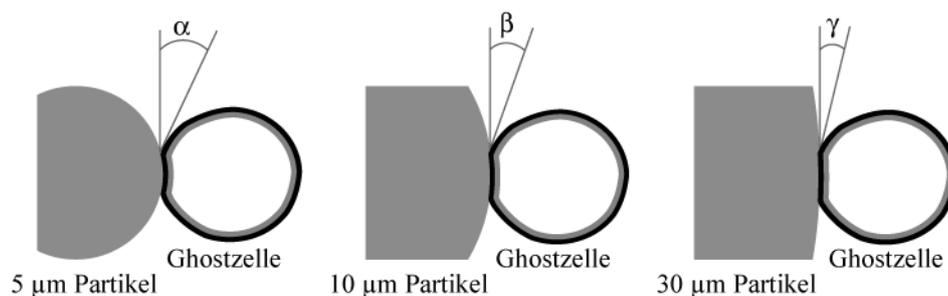


Abbildung 2.3: Schematische und maßstabsgetreue Darstellung des Kontaktwinkels zwischen 5 µm, 10 µm und 30 µm großen Partikeloberflächen und Ghostzellen ( $\varnothing = 4 \mu\text{m}$ ). Die Darstellung zeigt eindeutig eine Änderung des Kontaktwinkels.

### 2.2.7 Ermittlung der Oberflächenrauigkeit von gekrümmten Oberflächen mit Hilfe der Autokorrelation

Alle Partikel besaßen Poren gleicher Größe von 1000 Å. Da aber die Partikelkrümmungen variierten, mußte die von der Krümmung verursachte Änderung der Topographie und deren Einfluß auf die Oberflächenrauigkeit analysiert werden. Diese Analyse der Oberflächenrauigkeit erfolgte mit der Autokorrelation.

Für die Bestimmung des charakteristischen Abstandes des Oberflächenprofils wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen aller Partikelgrößen angefertigt. Um Abbildungsverzerrungen am Partikelrand auszuschließen, wurde ein zentraler Bereich herausgeschnitten. Anschließend wurde dieser Ausschnitt mit Hilfe der Analyse-Software IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) in den Fourierraum transformiert, dort quadriert und anschließend zurücktransformiert, wodurch man die Autokorrelation des Bildes erhielt. Die Position des ersten Maximums der Autokorrelation gibt den charakteristischen Abstand der Oberflächenstrukturen an.

### 2.2.8 Partikelbeschichtung

Um die Beschichtungskinetiken vergleichen zu können, wurden alle Partikeloberflächen ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ ) konstant gehalten. Entsprechend den Partikeloberflächen wurden Ghostzellmembranen im 10 fachen Oberflächenüberschuß ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ ) zugegeben und die Probenvolumina konstant gehalten.

Aus der Lipidkonzentration und dem Flächenbedarf eines Lipidmoleküls von  $70 \text{ Å}^2$  (Chapman 1984) in einem Monolayer wurde die Membranfläche der Ghostzellen errechnet und entsprechend eingestellt.

Die Partikeloberfläche wurde bestimmt, indem über das Schüttgewicht ( $\rho = 0,45 \text{ g cm}^{-3}$ ) der Partikel und dem Partikelvolumen ( $V_{\text{Partikel}}$ ) die Anzahl der Partikel (N) bestimmt wurde.

$$N_{\text{Partikel}} = (\rho \cdot V_{\text{Partikel}})^{-1} = \left( \rho \cdot \frac{4\pi r^3}{3} \right)^{-1}$$

Das Schüttgewicht gibt das Volumen der Schüttung und sein Gewicht an. Mit den bekannten Durchmessern konnte das Partikelvolumen errechnet werden. Die Division des Schüttgewichts durch das Partikelvolumen ergibt die Partikelanzahl pro Gewichtseinheit (Kaufmann and Tanaka

2003). Unter der Annahme sphärischer Silicapartikel und bekannter Partikelanzahl wurde deren Oberfläche (Tabelle 2.3) pro Gewichtseinheit bestimmt.

<b>Partikelgröße</b>	<b>Partikeloberfläche [m<sup>2</sup>/g]</b>
5 µm	2,7
10 µm	1,3
30 µm	0,4

Tabelle 2.3: Ermittelte Partikeloberflächen der unterschiedlichen Partikelgrößen

Vor der Beschichtung wurden die Silicapartikel 3 mal in TNN Puffer gewaschen. Dafür wurden sie für 1 min in einem Überkopfrührer mit 5,5 Rotationen pro Minute (RPM) gemischt und für 10 s bei 3.000 g sedimentiert. Die Beschichtung der Silicapartikel erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Überkopfrührer mit 5,5 RPM. Anschließend wurden die Partikel 3 mal in TNN Puffer gewaschen und für 10 s bei 3.000 g sedimentiert, um ungebundene, adhärenente und nicht aufgeplatzte Ghostzellen von den Silicapartikeln zu entfernen.

### **2.2.9 SDS-PAGE zur Proteinzusammensetzung ungebundener und immobilisierter Ghostzellen auf Silicapartikeln**

Die Proteinzusammensetzung der Ghostzellen wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert (linearer Gradient 5-15% Acrylamid Bisacrylamid) (Laemmli 1970). Dabei wurde die Proteinzusammensetzung von freien und auf Silicapartikeln gebundenen Ghostzellmembranen verglichen.

Als Puffer kamen Denaturierungspuffer (Lämmli Puffer), Laufpuffer, Färbelösung und Entfärbelösung nach Lämmli zum Einsatz.

Alle Proben wurden in Mercaptoethanol/SDS-haltigem Denaturierungspuffer aufgenommen. Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken der Proteine, weshalb die Tertiärstruktur zerstört wurde. SDS als stark negativ geladenes Detergens dekoriert die Eigenladung der denaturierten Proteine. Während der SDS-PAGE wird über das Gel ein elektrisches Feld angelegt, in dem durch das SDS negativ dekorierte Proteine zur Anode laufen. Dabei werden innerhalb des Gels die Proteine nach ihrer Größe getrennt.

Denaturierungspuffer	Konzentration
TRIS	65 mM
SDS	3,3% w/v
Glycin	5% w/v
Bromphenolblau	0,005% (w/v)
Mercaptoethanol	5%(w/v)

Laufpuffer	Konzentration
TRIS	15 mM
SDS	0,1% (w/v)
Glycin	192 mM

Entfärbelösung	Volumen
Methanol	500 ml
Essigsäure	750 ml
Reinstwasser	7500 ml

Färbelösung	Volumen
Methanol	450 ml
Essigsäure	90 ml
Coomassie R 250	2,5 g

Die Proben wurden im Volumenverhältnis 2:1 (v/v) Denaturierungspuffer gelöst und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Silicapartikel wurden sedimentiert, anschließend wurden 15µl der Probenüberstände auf Polyacrylamidgele (Bio-Rad, München, Deutschland) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 125 V, 35 A und 1,5 h im Laufpuffer. Die Proteinbanden wurden in einer Coomassie Färbelösung für 30 min bei leichtem Schütteln angefärbt, danach wurde ungebundener Farbstoff aus der Gelmatrix mit Entfärberlösung für 20 min entfärbt.

### 2.2.10 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie wurde, wie in Teil 1 beschrieben, durchgeführt und für die Darstellung von membranmarkierten und antikörpermarkierten Ghostzellen eingesetzt.

Phasenkontrastmikroskopie ermöglicht die Darstellung von kontrastarmen Objekten, die in der Hellfeldmikroskopie nicht oder schlecht sichtbar wären. Man bedient sich der Dichteunterschiede der Objekte, was gleichzusetzen ist mit deren Brechungsindizes. Die Objekte verändern die Phase des durch sie hindurchtretenden Lichtes, wohingegen die Amplitude des Lichtes unverändert bleibt. Wird nun das phasenverschobene Licht im Objektiv mit dem ursprünglichen Licht übereinandergelegt, kommt es zu Interferenzen. Dabei werden Objekte mit höherer Dichte und damit höherem Brechungsindex dunkler, daher kontrastreicher, abgebildet.

In der Phasenkontrastmikroskopie (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Deutschland) wurde eine Halogenlampe im Durchlichtprinzip (HAL 100, Zeiss, Jena, Deutschland) mit Phasenkontrastobjektiven (Planapo, 63-fach „long distance“ N.A. 0,75 und 20-fach „long distance“ N.A. 0,40 Zeiss, Jena, Deutschland) eingesetzt.

### 2.2.11 Spinning Disk konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie kann man 3 dimensionale Bilder anfertigen. Dafür wurden durch die Objekte präzise und in konkreten Abständen senkrecht zur Bildebene Bildschnitte angefertigt. Dieser Bilderstapel wurde anschließend mit Hilfe eines Computerprogramms dekonvolviert und 3 dimensional dargestellt (Abbildung 2.4).

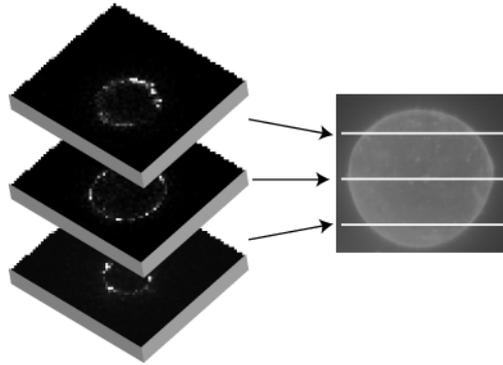


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Prinzips der konfokalen Mikroskopie. Stapel von 2 dimensionalen Bildern (links) werden mithilfe eines Bildbearbeitungsprogramms in eine 3 dimensionale Darstellung (rechts) überführt.

Eine Dekonvolution wurde durchgeführt, da durch die Brechungsindizes der Linsen und die Brechungsindizes der Medien, durch die das Licht passiert, mikroskopische Aufnahmen in ihrer Bildschärfe gestört werden. Diese Unschärfe kann durch eine Punktspreizfunktion (engl. point spread function) mathematisch modelliert werden. Im Rückschluß kann durch eine bekannte Punktspreizfunktion eine mikroskopische Aufnahme dekonvolviert werden, wobei unscharfe fluoreszierende Signale auf ihre ursprüngliche Größe zurückgerechnet werden. Durch die Dekonvolution (Huygens, Scientific Volume Imaging, Hilversum, Niederlande) wurde die laterale Auflösung auf ca. 93 nm erhöht. Die Höhenauflösung (z-Richtung) der konfokalen Aufnahmen betrug ca. 220 nm.

Die Bilder wurden mit einem invertierten Mikroskop (Nikon Eclipse TE2000-U, Japan), einem Wasserimmersions-Objektiv (Planapo VC, 60-fach, N.A. 1,2, Nikon, Japan) und einem real-time Spinning Disk konfokalen Aufbau (UltraView ERS, Perkin Elmer, Llantrisant, UK) im Nikon Imaging Center (Bioquant, Universität Heidelberg, Deutschland) angefertigt.

### 2.3.12 Beobachtung des Beschichtungsprozesses

Für die Darstellung des Beschichtungsprozesses wurde auf einem Deckglas ein 5 mm hoher Teflonring mit Silikonpaste (Baysilone, mittelviskos) aufgebracht, wodurch eine „Wanne“ über dem Deckglas gebildet wurde. Diese Wanne wurde mit 1 ml Puffer aufgefüllt und dazu eine geringe

Anzahl von Partikeln zugegeben. Die Partikel sedimentierten. Anschließend wurde mit einer Mikrokapillare (Femtotips, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), die an einem Mikromanipulator (FemtoJet, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) befestigt war, von der Deckglasoberfläche ein Partikel aufgenommen und in die Fokusebene des Mikroskops gebracht. Es wurden 10  $\mu\text{l}$  Texas-Red DHPE markierte Ghostzellen zugegeben und der Beschichtungsprozeß wurde mit einer Kamera mit einer Bildfolge von 117 ms verfolgt (Abbildung 2.5).

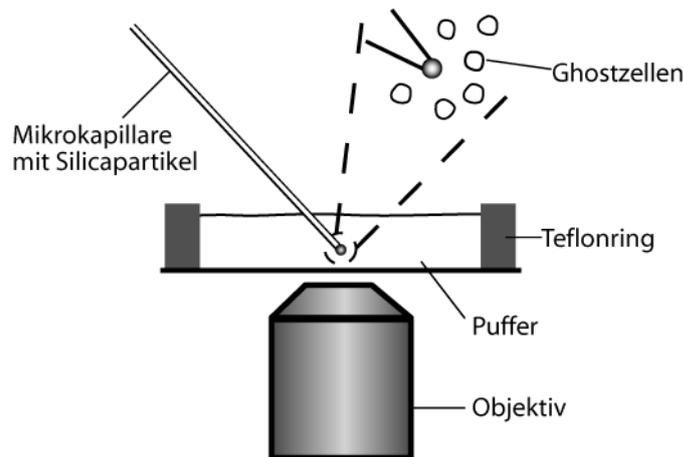


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Partikelbeschichtung. Silicapartikel ( $\text{\O} \sim 5, 10$  and  $30 \mu\text{m}$ ) wurden mit einer Glaskapillare eines Mikromanipulators in die Fokusebene des Objektivs gebracht. Anschließend wurden membranmarkierte Ghostzellen zugegeben. Die Darstellung der Mikroskopieaufnahmen erfolgte durch Überlagerung von Hellfeld- und Fluoreszenzmoden.

Der Beschichtungsprozeß wurde mit einer Überlagerung von Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen verfolgt. Im Hellfeldmodus wurden die Kapillare und das gebundene Partikel, im Fluoreszenzmodus die membranmarkierten Ghostzellen dargestellt.

### 2.2.13 Environmental Rasterelektronenmikroskopie

Eine besondere Variante der REM stellt die Environmental REM (EREM) dar (Abbildung 2.6), bei der die Probenkammer im Grobvakuum ( $100 - 1000 \text{ Pa}$ ) betrieben wird und eine feuchte Atmosphäre eingestellt werden kann. Dies ermöglicht die Untersuchung von biologischen Membranen in ihrer natürlichen Form.

Über eine Reihe von Konstruktionselementen wurde das für die Elektronenquelle notwendige Ultrahochvakuum an der Kathode von der Probenkammer entkoppelt. Somit konnten in der Probenkammer Drücke von einigen Hundert Pascal eingestellt werden, in der zudem die

Luftfeuchtigkeit veränderbar war. Durch die feuchte Atmosphäre wurde garantiert, daß die Membranen der Ghostzellen auf den Silicapartikeln thermodynamisch stabilisiert wurden.

Trifft nun der Elektronenstrahl auf die Membranoberfläche werden sekundär Elektronen emittiert, die von einer angelegten Spannung zwischen Probenhalter und Detektor zum Detektor hin beschleunigt werden. Auf diesem Weg werden zusätzlich Gasatome der feuchten Atmosphäre ionisiert, die am Detektor zu einer Signalverstärkung führten (Danilatos 1993).

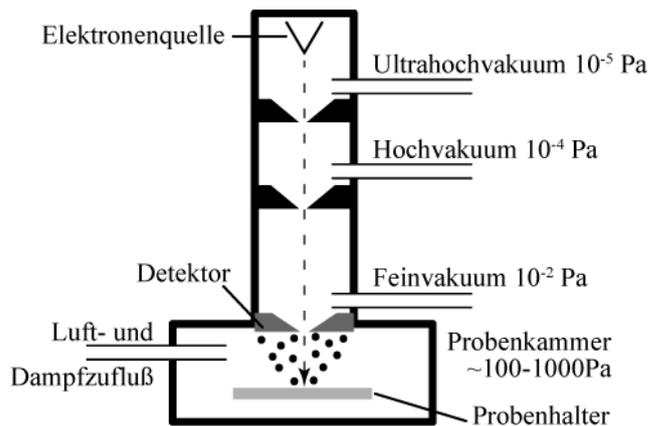


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau eines EREMs. Bei der EREM steht die Meßkammer nicht unter Ultrahochvakuum, sondern ist von der Elektronenquelle über eine Reihe technischer Maßnahmen entkoppelt, so daß in der Probenkammer Drücke von einigen Hundert Pascal sowie eine feuchte Atmosphäre eingestellt werden kann.

Die Aufnahmen von unbeschichteten und beschichteten Silicapartikeln wurden bei einem Umgebungsdruck von 680 Pa und bei Wasserdampf gesättigter Atmosphäre aufgenommen.

#### 2.2.14 Antikörpermarkierung beschichteter Silicapartikel

Silicapartikel wurden mit Ghostzellen wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben beschichtet (Tabelle 2.4). Die beschichteten Partikel wurden aliquotiert, mit einem Teil wurde die Membraninnenseite und mit dem anderen Teil die Membranaußenseite nachgewiesen. Wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben wurde die Antikörpermarkierung durchgeführt.

Vor der Antikörpermarkierung wurden die Membranoberflächen mit RSA für 1 h bei RT inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Die Antikörpermarkierung der Membranaußenseite erfolgte für 1 h bei RT mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Glykophorin (Titer 1:150). Die Membraninnenseite wurde mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von Bande3 (Titer 1:500) durchgeführt. Anschließend wurden durch

Waschschritte die ungebundenen Antikörper von den immobilisierten Ghostzellmembranen auf den Silicapartikeln entfernt.

Die ersten monoklonalen Antikörper waren in Maus exprimiert. Diese wurden durch Inkubation für 1h bei RT mit einem zweiten polyklonalen, FITC konjugierten Ziege-Anti-Maus Antikörper nachgewiesen. In einem folgenden Waschschritt wurden ungebundene zweiten Antikörper in TNN Puffer ausgewaschen und Partikelbeschichtung durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Schritt	Antikörpermarkierung	
1	Silicapartikel in TNN Puffer waschen	
2	Ghostzellen sedimentieren (10 min, 15.000 g)	
3	Ghostzellen : Silicapartikel im Oberflächenverhältnis 10:1 mischen	
4	2 h im Überkopfrührer inkubieren & anschließend waschen (10 s, 1.000 g)	
5	1 h in 3% RSA passivieren, anschließend sedimentieren & teilen	
6	Zugabe monoklonaler anti-Bande3 Antikörper (Titer 1:500)	Zugabe monoklonaler anti-Glykophorin Antikörper (Titer 1:150)
7	1 h bei RT inkubieren, anschließend waschen (30 s, 1.000g)	
8	2. FITC konjugierter Antikörper zugeben und 1h inkubieren	
9	waschen und in TNN Puffer resuspendieren	

Tabelle 2.4: Antikörpermarkierung von immobilisierten Ghostzellen auf Silicapartikeln

### 2.2.15 Bestimmung der Partikelbeschichtungskinetik

Um die Beschichtung der Partikel mit Hilfe der Phosphatanalyse bestimmen zu können, wurden pro Ansatz 2 mg Partikel mit dem dazugehörigen 10 fachen Überschuß an Ghostzelloberfläche eingesetzt. Diese Menge garantiert die vollständige Beschichtung der Partikel und bindet gleichzeitig eine genügende Menge an Ghostzellmembranen, um ein ausreichend großes Signal für die Phosphatanalyse zu erzielen.

In der Partikelbeschichtung (Abbildung 2.7) wurden 260 mg Silicapartikel und 40 ml Ghostzellen (1 mg/ml) eingesetzt. Die Beschichtung erfolgte bei RT in einem Überkopfrührer mit 5,5 RPM. Proben (2 mg Silicapartikel für jeden Meßpunkt) wurde in 2, 5 und 10 Minuten Abständen entnommen und sofort vorsichtig in TNN Puffer gewaschen (30 s bei 1.000 g). Das Pellet wurde anschließend weitere 2 mal gewaschen, um ungebundene und adhärenente Ghostzellen von der Oberfläche der Silicapartikel zu entfernen. Anschließend wurde der Phosphatgehalt bestimmt (Fiske and Subbarow 1925) und die Menge an gebundenen Lipiden mit einer Eichgeraden ermittelt.

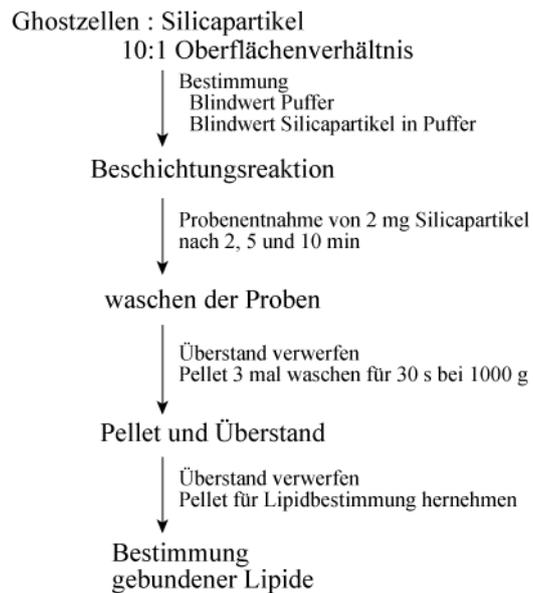


Abbildung 2.7: Schematischer Ablauf zur Bestimmung der Kinetik der Partikelbeschichtung. Nach der Inkubation des Reaktionsansatzes wurden Proben entnommen. Die Proben wurden 3 mal gewaschen. Die Lipidkonzentration der gebundenen Ghostzellmembranen wurde über die Phosphatbestimmung der beschichteten Silicapartikel ermittelt. Anschließend konnte die Fläche der Ghostzellmembranen durch den Flächenbedarf der gebundenen Lipide ermittelt werden.

## 2.3 Ergebnisse und Diskussionen

### 2.3.1 Protein- und Lipidkonzentration

Bei der Lyse der Erythrozyten wurde das Hämoglobin vollständig entfernt, wodurch Ghostzellen entstanden, die aus der Lipidmembran und den Membranproteinen gebildet wurden.

Die Proteinkonzentration der Ghostzellen wurde als 2 mg/ml ermittelt. Dieser Wert gibt die Gesamtproteinkonzentration der Ghostzellen an, die sich aus transmembranen, membran-assoziierten Proteinen und Proteinen des Zytoskeletts zusammensetzt.

Eine direkte Bestimmung der Proteinkonzentration auf den Silicapartikeln nach der Bradford Methode ist kolorimetrisch nicht möglich, da Ghostzellen auf der Partikeloberfläche immobilisiert vorliegen. Der gebildete Protein-Farbstoff-Komplex ist ebenfalls an die Partikel gebunden und sedimentiert daher mit den Silicapartikeln. Silicapartikel sind lichtundurchlässig, weshalb sie den Meßstrahl streuen und dadurch die Messung zusätzlich verhindern.

Da Detergenzien stark mit der Bradfordreagenz interagieren, kann die Konzentrationsbestimmung der Membranproteine nicht durch Solubilisierung und anschließender Analyse erfolgen. Ausfällen der Proteine und eine anschließende Konzentrationsbestimmung ergab Meßwerte mit großen Fehlern und war somit ungeeignet für die Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry 1951) ist nicht möglich, da Ghostzellen in einem TNN Puffer gelöst vorliegen und die Amidgruppe des TRIS ebenfalls nach Lowry nachgewiesen würden.

Da die Bestimmung der Proteinkonzentration auf Silicapartikeln nicht durchführbar war und die Bestimmung der Membranfläche im Vordergrund stand, wurde der Schwerpunkt auf die Lipidkonzentration der Membran gelegt.

Phospholipide stellen ca. 80% der Lipide einer Ghostzellmembran dar (Virtanen, Cheng et al. 1998). Da jedes Phospholipid nur eine Phosphatgruppe enthält, kann durch Phosphatbestimmung aus dem einfachen stöchiometrischen Verhältnis von einem Phosphatmolekül zu einem Phospholipid die Lipidkonzentration ermittelt werden. Die Lipidkonzentration wurde mit 1 mg/ml bestimmt.

Es muß erwähnt werden, daß in der Arbeit von Fiske und Subbarow nachgewiesen wurde, daß 1mg Silikat ein Signal von ca. 0,4 mg Phosphat-Äquivalent verursacht. Dieser Wert bezieht sich auf

Phosphatanalysen pflanzlicher wie tierischer Zellen, die kolloidales Silikat einlagern. Dieses kolloidale Silikat sedimentiert nicht, weshalb es während der photometrischen Bestimmung detektiert wurde. Die eingesetzten Silicapartikel sind jedoch so groß, daß sie innerhalb weniger Sekunden bei 1 g sedimentieren und daher die photometrische Messung nicht stören. Diese Annahme wurde durch die Bestimmung des Blindwertes von  $\sim 0 \mu\text{mol}$  für Silicapartikel bestätigt, womit nachgewiesen wurde, daß keine störenden Siliziumteilchen in der Meßlösung verbleiben sind.

### 2.3.2 Form und Größe der Ghostzellen

Ghostzellen wurden durch die Lyse in einem salzfreien Puffer (hypotonisch) aus Erythrozyten hergestellt. Im hypotonischen Lysepuffer dringt Wasser in die Erythrozyten ein und bringt diese durch den osmotisch generierten Überdruck zum Aufplatzen, wodurch alle zytosolischen Elemente (hauptsächlich das Hämoglobin) entfernt wurden. Das Aufplatzen der bikonkaven Erythrozyten ( $2\mu\text{m} \times 7\mu\text{m}$ ) stellt eine starke mechanische Beanspruchung der Zellmembran dar, wobei die Stützfunktion des Zytoskeletts zerstört wird und sie ihre bikonkave Form verlieren (Abbildung 2.8). Durch den Verlust der Stützfunktion nehmen die Ghostzellen eine kugelige Form (Durchmesser =  $4\mu\text{m}$ ) an (Schwoch and Passow 1973).

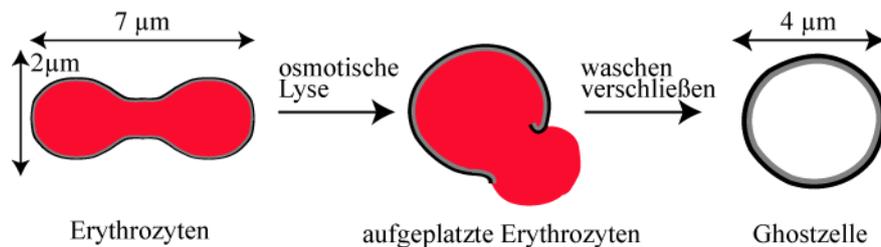


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Präparationsverlaufs von Ghostzellmembranen. Bikonkave Erythrozyten, in denen Hämoglobin durch die rote Farbe angedeutet wird, wurden durch mehrfache osmotische Lyse zum Aufplatzen gebracht. Dabei wurden alle zytosolischen Elemente, wie z.B. Hämoglobin, entfernt. Es entstanden farblose, sphärische Ghostzellen, die wegen ihrer Formänderung einen Durchmesser von ca.  $4 \mu\text{m}$  besaßen.

Die Lyse der Erythrozyten ist ein unkontrollierbarer Prozeß. Dabei besteht die Möglichkeit, daß Erythrozyten zerfallen, fusionieren oder ihre natürliche Orientierung verlieren. Um diese Vorgänge zu untersuchen, wurden die Ghostzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Ein möglicher Zerfall oder eine mögliche Fusion von Ghostzellen wurde mit einer Größenkontrolle der Ghostzellen überprüft. Daher wurde nach der Präparation die Form und die Größe der

Ghostzelle im Phasenkontrast- und Fluoreszenzmodus kontrolliert. Membranmarkierte Ghostzellen erscheinen in der Fluoreszenzmikroskopie als ein geschlossener Kreis (Rand der Kugel) mit ca. 4  $\mu\text{m}$  Durchmesser (Abbildung 2.9).

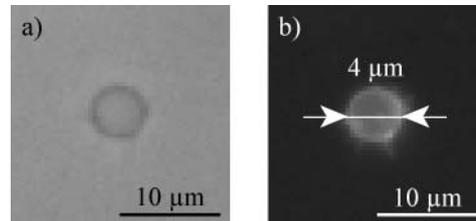


Abbildung 2.9: Korrespondierende, mikroskopische Aufnahmen einer membranmarkierten Ghostzelle im Phasenkontrastmodus (a) und Fluoreszenzmodus (b). Eine kreisförmig geschlossene Ghostzelle mit gleichmäßiger Fluoreszenz wurde beobachtet.

Die Oberfläche eines intakten, bikonkaven Erythrozyten beträgt 13  $\mu\text{m}^2$  (Houchin, Munn et al. 1958). Legt man diese Oberfläche zugrunde und nimmt man eine Formänderung zur sphärischen Ghostzelle an, kann über die konstante Oberfläche der Durchmesser der Ghostzelle ausgerechnet werden. Der Durchmesser einer sphärischen Ghostzelle beträgt unter dieser Annahme 4  $\mu\text{m}$ .

In allen mikroskopischen Aufnahmen von Ghostzellen wurde eine homogene Größe von ca. 4  $\mu\text{m}$  ermittelt. Dieser Durchmesser bestätigt, daß während der Lyse der Erythrozyten kein Verlust an Membranfläche oder eine Fusion aufgeplatzter Ghostzellen erfolgte.

### 2.3.3 Kontrolle der Membranoberfläche und der Membranorientierung der Ghostzellen

Da es sich bei mikroskopischen Aufnahmen um 2 dimensionale Darstellungen über die gesamte Objekthöhe handelt, kann über den gleichmäßig fluoreszierenden Rand (Abbildung 2.9.b) keine Aussage über die Membranoberfläche getroffen werden. Eine Aussage über die Membranoberfläche kann nur in einer 3 dimensionalen konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme getroffen werden.

Dafür wurde von einer membranmarkierten Ghostzelle ein konfokales 3 dimensionales Bild aus einem Bilderstapel aus 23 Bildern mit einem Abstand von 220 nm rekonstruiert. Die Überprüfung der einzelnen Bilder zeigte immer einen homogen fluoreszierenden und geschlossenen Rand (Abbildung 2.10.b). Die 3 dimensionale Rekonstruktion zeigte eine geschlossen und kugelförmig Ghostzelle, die eine homogene Markierung über die gesamte Membranoberfläche aufwies (Abbildung 2.10.a).

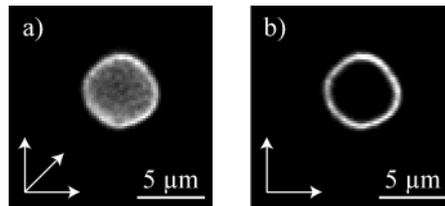


Abbildung 2.10: Konfokale Aufnahme einer Texas-Red DHPE membranmarkierten Ghostzelle. Bild a) zeigt eine Ghostzelle im konfokalen Modus, in der aus einer Bilderserie aus 23 Bildern eine 3 dimensionale Darstellung rekonstruiert wurde. Bild b) zeigt ein einzelnes Bild aus der Mitte des Bilderstapels, was einer 2 dimensional Darstellung entspricht. Aus der Bilderserie geht hervor, daß die Oberfläche der Ghostzellen homogen mit dem Farbstoff Texas-Red DHPE markiert wurde.

Mit der Membranmarkierung und der Größenbestimmung wurde bestätigt, daß die Erythrozyten während der Lyse nicht zerfielen oder fusionierten. Die Frage, ob sie ihre native Orientierung beibehalten haben, wurde anschließend mit einer Antikörpermarkierung überprüft.

Erythrozyten können sich während der Lyse über 2 hypothetische Wege wieder zusammenfügen:

1. Ghostzellen behalten die native Membranorientierung der Erythrozyten bei  
(right side out = RSO)
2. Ghostzellen invertieren die Membranorientierung der Erythrozyten.  
(in side out = ISO)

Der einheitliche Durchmesser der Ghostzellen von 4  $\mu\text{m}$  verdeutlicht, daß keine Membranteile während der Präparation der Ghostzelle aus der Lipidmembran herausgelöst wurden. Daher kann man davon ausgehen, daß die gesamte Membranoberfläche über alle Lyseschritte einheitlich der Membranorientierung folgte.

Als Proteinmarker (Abbildung 2.11) wurden daher transmembrane Proteine ausgesucht. Für die Membraninnenseite wurde ein spezifischer Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von Bande3 und für die Membranaußenseite ein Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Glykophorin eingesetzt. Diese primären Antikörper wurden von einem zweiten FITC konjugierten Antikörper gebunden und konnten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Die Markierung von Bande3 von ungebundenen Ghostzellen zeigte keine Fluoreszenz. Die Antikörpermarkierung von Glykophorin konnte hingegen zeigen, daß alle Ghostzellen fluoreszierten. Dieser spezifische, eindeutige Nachweis demonstriert, daß Ghostzellen die natürliche Orientierung der Erythrozyten während der Präparation beibehalten haben.

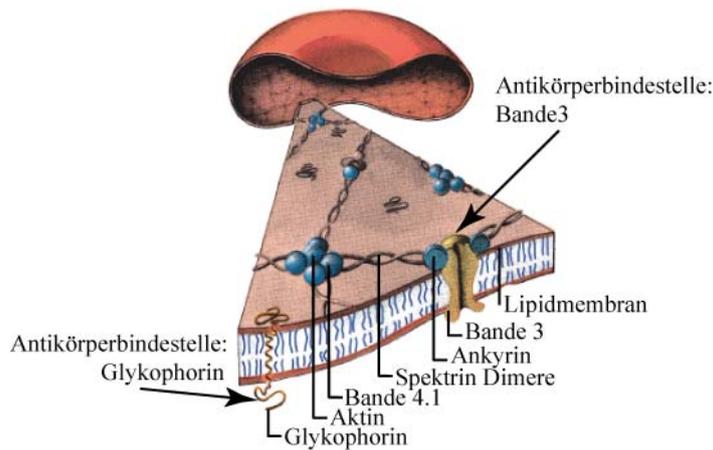


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Erythrozytenmembran. Hervorgehoben sind die Proteinmarker der Antikörpermarkierung. Zur Detektion der Membraninnenseite wurde eine zytosolische Domäne von Bande3 und zur Detektion der Membranaußenseite eine extrazelluläre Domäne von Glykophorin ausgewählt (adaptiert aus Junqueiro Carneiro, Histologie, 6. Auflage, Springer Lehrbücher).

### 2.3.4 Beschichtungsanalyse der Partikeloberflächen

Die Verteilung der Lipidmembran auf der Partikeloberfläche wurde durch Beschichtung mit Texas-Red DHPE membranmarkierten Ghostzellen untersucht und mit Hilfe der Antikörpermarkierung wurde die Proteinverteilung auf den beschichteten Partikeln analysiert.

Die beschichteten Silicapartikel wurden mit Hilfe einer Phasenkontrastaufnahme (Abbildung 2.12.a) analysiert, die die Form der Silicapartikel wiedergab. Diese Aufnahmen wurden mit korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 2.12.b) verglichen. Die Fluoreszenzaufnahme zeigte das Vorhandensein der membranmarkierten Ghostzellen. Partikel, die mit markierten Ghostzellen beschichtet waren, wurden im Fluoreszenzbild mit einem durchgehenden, fluoreszierenden Partikelrand dargestellt. Einzelne helle Flächen oder unscharfe, helle Punkte auf der Partikeloberfläche wurden durch adhärente Ghostzellen innerhalb beziehungsweise außerhalb der Fokusebene verursacht.

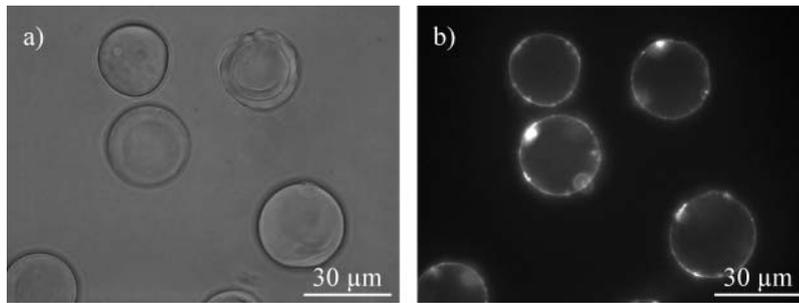


Abbildung 2.12: Phasenkontrastbild a) und korrespondierendes Fluoreszenzbild b) beschichteter Silicapartikel ( $\text{\O} \sim 30\mu\text{m}$ ). Die Beschichtung der Silicapartikel erfolgte mit Texas-Red DHPE markierten Ghostzellen.

Auch die Qualität der Antikörpermarkierung wurde durch den Vergleich von Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen bestimmt. Der Antikörper gegen Glykophorin (Membranaußenseite) zeigte kein Fluoreszenzsignal, wohingegen die Antikörpermarkierung gegen Bande3 (Membraninnenseite) ein homogenes Fluoreszenzsignal auf der Partikeloberfläche ergab (Abbildung 2.13.a und 2.13.b). Die Antikörpermarkierung demonstriert eindeutig, daß Ghostzellen nach der Präparation ihre native Membranorientierung beibehalten haben, die Membranorientierung aber beim Beschichten der Silicapartikel invertierte.

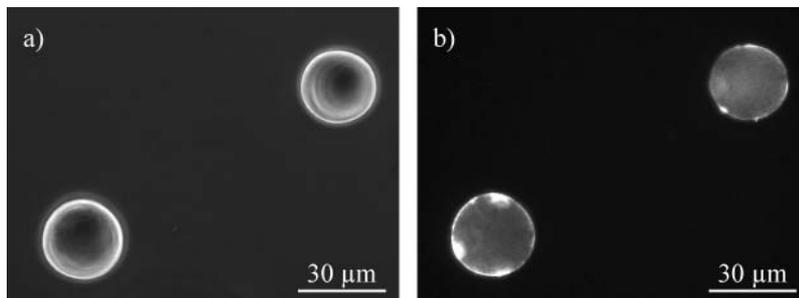


Abbildung 2.13: Bild a) Phasenkontrastbild und b) Fluoreszenzbild zeigen Silicapartikel, die mit Ghostzellen beschichtet wurden. Anschließend wurde die Membranorientierung mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen die zytosolische Domäne von Bande3 nachgewiesen. Der Nachweis von Bande3 zeigt, daß die Ghostzellen in einem invertierenden Mechanismus die Partikeloberflächen beschichtet haben.

Die homogene Membranverteilung und Proteinverteilung der invertierten Ghostzellen wurde bei allen Partikelgrößen ermittelt.

Kalish et al. (Kalish, Cohen et al. 1978) beschreiben die Beschichtung von ca.  $30\mu\text{m}$  großen, Polylysin beschichteten Partikeln mit Erythrozyten in 4 Schritten:

1. Annähern der Ghostzellen
2. Adhäsion der Ghostzellen
3. Aufplatzen der Ghostzellen
4. laterale Beschichtung und Fusion der Membran.

Entscheidend in diesem Ablauf ist der dritte Schritt, in dem beim Aufplatzen die Inversion der Membranorientierung (Abbildung 2.14) erfolgt.

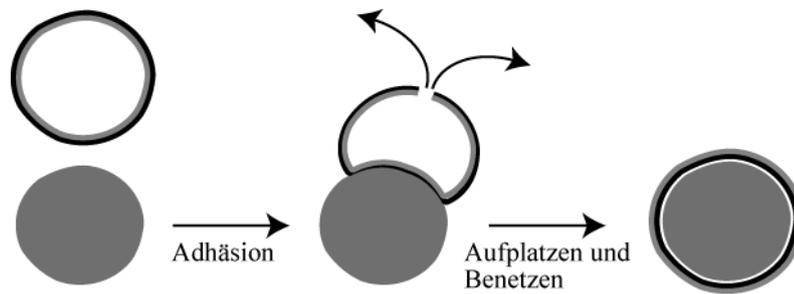


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des von Kalish et al. vorgeschlagenen Beschichtungsmechanismus von 30µm großen Polylysin beschichteten Partikeln. Hervorgehoben ist die Inversion der Membranorientierung während des Beschichtungsprozesses.

Die Antikörpermarkierung der immobilisierten Ghostzellen bestätigte den von Kalish et al. vorgeschlagenen Mechanismus, indem der Beschichtungsprozess in einem invertierenden Aufplatzenmechanismus abläuft. Hervorzuheben ist, daß bei immobilisierten Ghostzellmembranen ausschließlich die Membraninnenseite der Ghostzellen nachgewiesen wurde. Dies verdeutlicht, daß die Ghostzellen ohne Fragmentierung die Silicapartikel beschichteten und ihre Orientierung wechselten.

Bemerkenswert ist, daß Kalish et al. in ihren Experimenten das Aufplatzen der Erythrozyten mit einem osmotischen Schock oder einer kurzen Ultraschallbehandlung induzieren mußten. Das Aufspreiten von Ghostzellen auf Silicapartikeloberflächen hingegen benötigt keinen zusätzlichen Präparationsschritt, die Partikelbeschichtung verläuft selbständig. Hinzukommt, daß die Silicapartikel bei 1 g sedimentieren, die Ghostzellen aber nicht. Dieser Umstand vereinfacht die Trennung von beschichteten Silicapartikel von ungebundenen Ghostzellen und ermöglicht die Herstellung großer Mengen beschichteter Silicapartikel.

### 2.3.5 Qualität der Partikelbeschichtung

Die Analyse der qualitativen Partikelbeschichtung erfordert die Differenzierung der Partikeloberfläche. Da die eingesetzten Silicapartikel vollständig mit Poren durchzogen sind, besitzen sie zwei unterschiedliche Oberflächen:

1. Partikeloberfläche
2. Porenoberfläche

Theoretisch kann die Beschichtung eines porösen Partikels der Partikeloberfläche oder der Porenoberfläche folgen. Um beide Beschichtungsverläufe unterscheiden zu können, bedarf es 3 dimensionaler Beschichtungsanalysen mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops.

Partikel der Größen 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  und 30  $\mu\text{m}$  wurden mit homogen membranmarkierten Ghostzellen analog zu Kapitel 2.3.3 beschichtet. Anschließend wurde die Partikelbeschichtung im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Silicapartikel zeigten einen durchgehend homogen fluoreszierenden Rand, der sich vom nicht fluoreszierenden Partikelinneren abgrenzte. Dieser Fluoreszenzverlauf ist ein Hinweis für die Beschichtung der Partikeloberfläche. Er gibt aber keine eindeutige Information über den Membranverlauf auf der Porenoberfläche.

Um den Beschichtungsverlauf auf der Porenoberfläche verfolgen zu können, wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie der präzise Verlauf der Beschichtung analysiert. Am Beispiel von 10  $\mu\text{m}$  großen Silicapartikeln wurde ein Bilderstapel von 14 Bildern aufgenommen, aus dem eine dekonvoluierte, 3 dimensionale Darstellung zusammengesetzt wurde. Die Fokusebene innerhalb des Partikelvolumens zeigte Fluoreszenz am Partikelrand, aber nicht auf der Porenoberfläche (Partikelinnenfläche) (Abbildung 2.15), wodurch ein Beweis für die Partikelbeschichtung erbracht wurde.

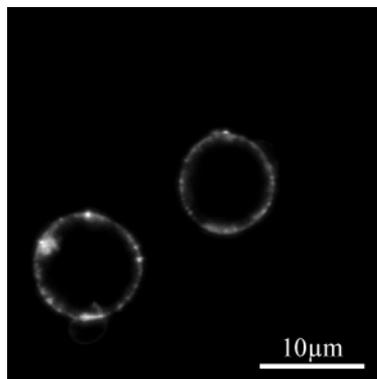


Abbildung 2.15: Konfokale Aufnahme von Partikeln (Durchmesser 10  $\mu\text{m}$ ) beschichtet mit Texas-Red DHPE markierten Ghostzellmembranen. Das Bild wurde aus der Mitte des Bilderstapels entnommen, um die Porenoberfläche hervorzuheben. Der fluoreszierende Partikelrand beweist die Partikelbeschichtung.

Die Analyse der beschichteten Partikeloberfläche erfolgte ergänzend mit EREM Aufnahmen, die den Membranverlauf auf der Partikeloberfläche mit Genauigkeit im nm-Bereich darstellt. In Abbildung 2.16 wurden EREM Aufnahmen von unbeschichteten und beschichteten Silicapartikeln ( $\text{\O} \sim 10 \mu\text{m}$ ) bei einem Druck von 680 Pa bei Wasserdampf gesättigter Atmosphäre verglichen. Das unbeschichtete, poröse Partikel (Abbildung 2.16.a) zeigt helle Punkte auf seiner Oberfläche, die die Porenränder darstellen. Da die Silicapartikel vor den Aufnahmen in Puffer gewaschen wurden, sind die Poren mit Puffer gefüllt und erscheinen daher nicht als tiefe Furchen. Ein Vergleich mit REM

Aufnahmen in Abbildung 2.2 zeigt, daß die Partikeloberfläche mit Furchen durchzogen ist. Aus der Furchengeometrie folgt, daß einzelne Punkte aus der Oberfläche herausragen, die in Abbildung 2.16.a als helle Punkte zu erkennen sind.

In Abbildung 2.16.b ist ein beschichtetes Partikel dargestellt, welches aus der Präparation der membranmarkierten konfokalen Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 2.10 und 2.15) entnommen wurde. Im Vergleich zur Abbildung 2.16.a ist die Partikeloberfläche glatt, woraus geschlossen werden kann, daß sich die Ghostzellen auf der Partikeloberfläche anlagerten und der Oberflächenkrümmung folgten. Dies kann damit erklärt werden, daß die Poren zu eng sind und die Biegesteifigkeit der Lipidmembran so hoch ist, daß die Ghostzellmembran nicht in die Poren eindringt, sondern ausschließlich der Partikeloberfläche folgt (Swain and Andelman 1999).

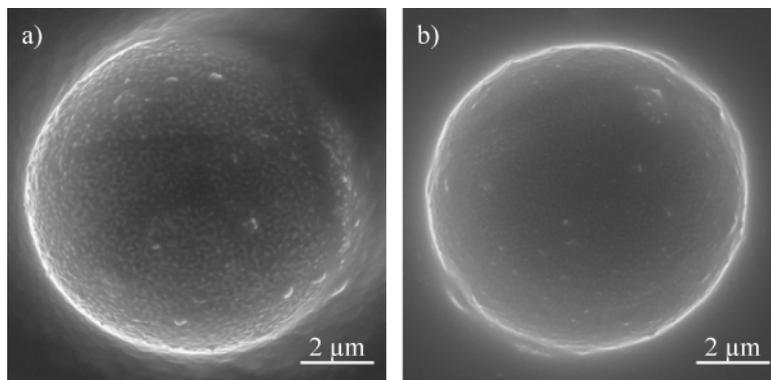


Abbildung 2.16: EREM Bilder von Silicapartikeln (Durchmesser 10 µm), aufgenommen bei 680 Pa und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. Bild a) zeigt ein unbeschichtetes Silicapartikel, auf dem die Poren (rauhe Oberfläche) zu erkennen sind. Bild b) ein mit Ghostzellen beschichtetes Partikel. Die Membran der Ghostzellen folgt der Krümmung der Partikeloberfläche. Aufgrund der Biegesteifigkeit der Membran folgt sie der großen Oberflächenkrümmung, nicht aber der feinen Porenkrümmung, weshalb es zum Überspannen der Poren kommt und diese dadurch überdeckt werden.

### 2.3.6 Theorie der Partikelbeschichtung auf strukturierten Oberflächen

Swain und Andelman (Swain and Andelman 1999) haben in ihrer theoretischen Analyse der Oberflächenbeschichtung mit Lipidmembranen gezeigt, wie die Lipidmembran auf eine planare, strukturierte Oberfläche adhärierte und sie benetzte. Sie bedienen sich in ihrer analytischen Methode der Deryagin Annäherung, die das harmonische Potential an der Oberfläche als eine lokale Funktion der Membranhöhe ausdrückt.

Swain und Andelman wiesen mathematisch nach, daß das Wechselwirkungspotenzial positionsabhängig auf einer strukturierten Oberfläche war und daher die Lipidmembran der Partikeloberfläche folgte. Die Beschichtung einer rauhen Partikeloberfläche wurde von der

Membranspannung und Biegesteifigkeit gedämpft, da sie Bindungsenergie kostet. „Rauhigkeiten“ mit kurzen Abständen (wie Poren) sind daher für die Membran schwer zu folgen, wohingegen „Rauhigkeiten“ mit großen Abständen (wie Partikeloberflächen) gut verfolgt werden können.

Das Kräfteverhältnis innerhalb der Lipidmembran auf der Partikeloberfläche sieht so aus, daß die Oberflächenrauhigkeit der Silicapartikel die Biegeenergie der Lipidmembran beeinflusst. Die potentielle Energie beeinflusst die freie Energie der Membran. Die Biegeenergie versucht die Membran zu glätten und so die Membran von der Partikeloberfläche zu entfernen, wodurch geometrische Effekte reduziert werden. Andererseits ist die potentielle Energie attraktiv und zieht die Membran an die Partikeloberfläche heran. Aus diesem Ansatz folgt, daß die Membran der Ghostzellen nicht in die Poren eindringt, aber der Partikeloberfläche folgt.

### 2.3.7 Analyse der Proteinzusammensetzung von ungebundenen Ghostzellen und Ghostzellen immobilisiert auf Silicapartikeln

Mit SDS-PAGE wurden die Proteine und die Proteinzusammensetzung von Ghostzellen in Lösung und immobilisiert auf Partikeln verglichen. Abbildung 2.17 zeigt die Coomassie gefärbten Proteinbanden auf SDS-PAGE aufgetragenen Ghostzellmembranen. Auf der linken Seite des Gels sind die Molekulargewichtsmarker skaliert präsentiert, Spur 1 zeigt Ghostzellen in Puffer und Spur 2 zeigt Ghostzellen immobilisiert auf Silicapartikeln. Aufgrund der molekularen Gewichte konnten Aktin, Spektrin und Bande3 nachgewiesen werden.

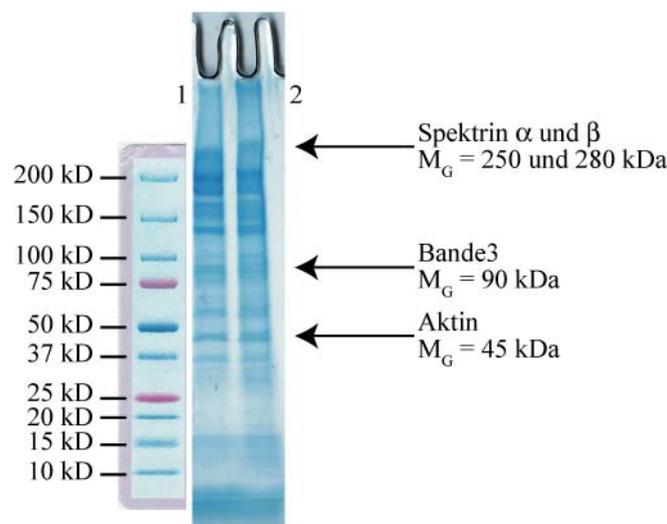


Abbildung 2.17: SDS-PAGE von Ghostzellen. Der Molekulargewichtsmarker ist auf der linken Seite des Bildes skaliert dargestellt. Spur 1 zeigt die Bande von Ghostzellen in Puffer und Spur 2 die Bande von immobilisierten Ghostzellen auf Partikeln. Aus dem Vergleich der Bandenmuster geht hervor, daß die Zusammensetzung der Proteine während der Präparation und des Aufspreitens sich nicht geändert hat.

Hauptkomponenten des Zytoskeletts sind Aktin (Molekulargewicht = 45 kDa) und Spektrin. Das Spektrin ist aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette aufgebaut (Molekulargewicht  $\alpha$ -Kette = 250 kDa und  $\beta$ -Kette = 280 kDa) und bildet ein Netzwerk (Zytoskelett) aus, das zytosolisch über der Lipidmembran an das Protein 4.1 und das transmembrane Glykophorin C assoziiert vorkommt. Das Vorhandensein von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin in Ghostzellmembranen beweist, daß während der Lyse und während des Aufspreitens der Ghostzellen assoziierte Membranproteine nicht von der Membran abgelöst wurden.

Humane Bande3 Proteine sind transmembrane Proteine mit einem Molekulargewicht von 90 kDa (Guidotti 1972; Reichstein and Blostein 1975). Bande3 konnte nach Coomassie Färbung sowohl in ungebundenen Ghostzellmembranen (Spur 1) als auch in immobilisierten Ghostzellmembranen (Spur 2) nachgewiesen werden.

Glykophorin ist ein transmembranes, stark glykolisiertes Protein, dessen Aminosäurekette ein Molekulargewicht von 15 kDa aufweist. Jedes Monomer ist N-terminal mit ca. 100 Zuckerresten glykolisiert, weshalb sich für jedes Monomer ein Molekulargewicht von ca. 31 kDa ergibt. Glykophorin läßt sich mit Coomassie nicht färben und konnte daher in der SDS-PAGE nicht nachgewiesen werden.

Ungebundene Ghostzellen sowie immobilisierte Ghostzellen zeigten das gleiche Bandenmuster und besaßen annähernd die gleiche Intensität. Das gleiche Bandenmuster sowohl ungebundener als auch immobilisierter Ghostzellen zeigt, daß durch das Aufspreiten und dem damit verbundenen Prozeß des „Aufreißens“ und des Invertierens die Proteinzusammensetzung der Ghostzellen nicht verändert wurde. Durch die Inversion der Membranausrichtung wurde bei der Beschichtung der Partikeloberfläche die Oberflächenkrümmung der Membran ebenfalls invertiert. Die Membraninnenseite, an der das Zytoskelett gebunden ist, wurde „umgestülpt“, wodurch es einerseits zu einer Zunahme des Durchmessers und andererseits zu einer Zunahme der Abstände der Ankerpunkte des Zytoskeletts in der Membran kam. Diese Änderungen ergeben eine unnatürliche, starke physikalische Spannung des Zytoskeletts. Daher ist benennenswert, daß keine Effekte in der Zusammensetzung des Zytoskeletts festgestellt wurden.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE Analyse wurden auch durch Antikörpermarkierung bestätigt, wobei das transmembrane Protein Bande3 (Abbildung 2.13) sowie das Spektrin des Zytoskeletts nachgewiesen wurden (Fluoreszenzbild nicht gezeigt).

### 2.3.8 Darstellung des Beschichtungsprozesses

Abbildung 2.18 zeigt den Beschichtungsprozeß eines Silicapartikels. Die Bilder wurden in zeitlicher Reihenfolge aufgelistet, in der die Zeitindizes den zeitlichen Abstand zum ersten Bild angeben.

In den Aufnahmen sind ein Silicapartikel mit einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  gebunden an der Spitze einer Kapillare und eine frei schwimmende Ghostzelle mit einem Durchmesser von ca. 4  $\mu\text{m}$  zu sehen. Das Bild zum relativen Zeitpunkt 0,0 s zeigt die Annäherung der Ghostzelle an das Partikel. In Bild 2,2 s nähert sich die Ghostzelle von oben links an das Partikel an, wo es zum Zeitpunkt 2,6 s das Partikel berührt und dabei nach rechts unten aufplatzend umklappt und dadurch Partikel beschichtet. Bild 5,4 s zeigt den korrespondierenden Ausschnitt nur im Fluoreszenzmodus und verdeutlicht das Vorhandensein der membranmarkierten Ghostzelle auf dem Silicapartikel.

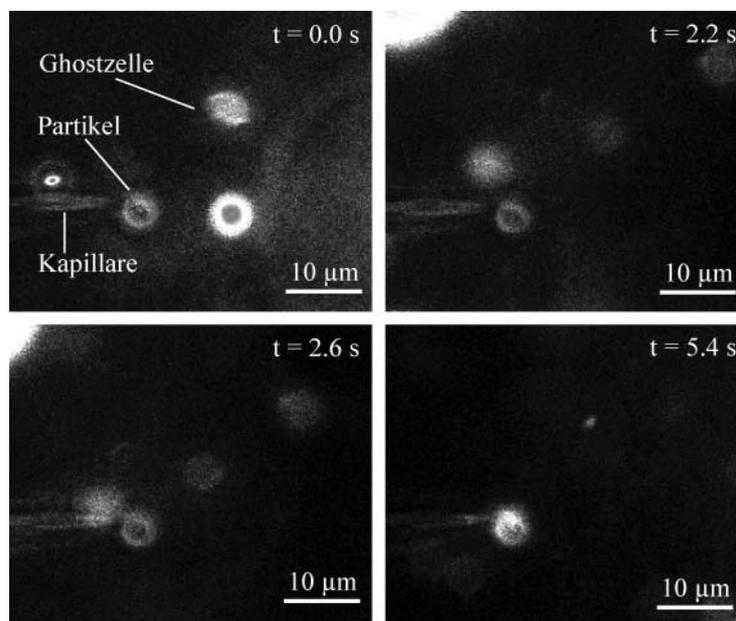


Abbildung 2.18: Momentaufnahmen der Beschichtung eines Silicapartikels mit membranmarkierten Ghostzellen. Die Ghostzelle nähert sich dem fixierten Silicapartikel ( $\text{Ø} = 5 \mu\text{m}$ ), adhärirt und platzt dabei auf. Die Adhäsion und das Aufplatzen ereignen sich außerhalb der zeitlichen Auflösung der Kamera (117 ms). Bilder bis zum Zeitpunkt 2,6 s sind Überlagerung von Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen. Bild 5,4 s hingegen ist eine reine Fluoreszenzaufnahme, die nur die membranmarkierte Ghostzelle zeigt. Die Fluoreszenzaufnahme in Bild 5,4 s zeigt eindeutig, daß die Ghostzelle das Silicapartikel beschichtet hat.

Ein Vergleich der Lichtintensitäten des Silicapartikels vor und nach der Beschichtung (Abbildung 2.19) zeigt eine signifikante Erhöhung. Das Bild zum Zeitpunkt  $t = 2,6 \text{ s}$  ist eine Überlagerung eines Phasenkontrast- und eines Fluoreszenzbildes eines unbeschichteten Partikels. Es weist am Partikelrand eine Lichtintensität von ca. 1450 a.u. auf (a.u. = arbitrary unit). Dagegen ist die Intensitätsbestimmung des beschichteten Partikels in Bild  $t = 5,6 \text{ s}$  nur im Fluoreszenzmodus

aufgenommen worden. Obwohl nur das Fluoreszenzsignal detektiert wurde, ist die ermittelte Intensität mit ca. 1650 a.u. signifikant höher als beim unbeschichteten Partikel.

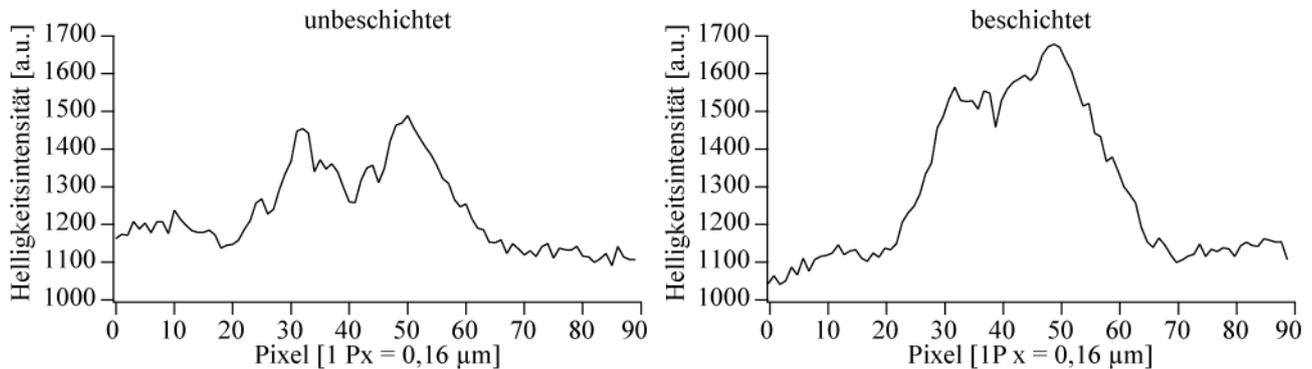


Abbildung 2.19: Die Graphen zeigen die Intensitätsprofile vor und nach der Beschichtung eines Silicapartikels ( $\varnothing = 5\mu\text{m}$ ). Das Intensitätsprofil des unbeschichteten Partikels ist eine Überlagerung der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahmen, das des unbeschichteten Partikels zeigt das Intensitätsprofil nur im Fluoreszenzmodus.

Adhäsion und Aufplatzen der Ghostzelle erfolgten nach Bild 2,6 s. Die zeitliche Auflösung der eingesetzten Mikroskopkamera ist mit 117 ms limitiert. Die Adhäsion und das Aufplatzen waren zwischen den aufeinanderfolgenden Bildern nicht zu unterscheiden. Aus der Bilderfolge ging zudem hervor, daß der Beschichtungsprozeß von Silicapartikeln in einem einzigen Schritt erfolgte, was bedeutet, daß die Adhäsion der Ghostzelle zum spontanen Beschichten des Silicapartikels führt. Dies weicht von den Beobachtungen von Kalish et al. (Kalish, Cohen et al. 1978) ab, die die Beschichtung der Partikel osmotisch oder mit einer kurzen Ultraschallbehandlung induzieren mußten.

### 2.3.9 Einfluß der Partikelgröße auf die Beschichtungskinetik

Um eine vollständige Partikelbeschichtung zu garantieren, wurde das Oberflächenverhältnis der Ghostzellmembranen (Houchin, Munn et al. 1958) zur Partikeloberfläche mit 10:1 eingestellt.

Da die Erythrozyten kernlose, ausdifferenzierte Zellen sind, kann davon ausgegangen werden, daß sie alle die gleiche Protein- und Lipidzusammensetzung haben und annähernd die gleiche Größe besitzen (Virtanen, Cheng et al. 1998; Alberts 2003). Aus der Größe der Ghostzellen und der variierenden Partikeldurchmesser ergibt sich ein variierender Kontaktwinkel zwischen Ghostzelle und Partikel (siehe Kapitel 2.2.6). Der Einfluß der Partikeloberfläche wurde durch die Bestimmung der charakteristischen Abstände der Oberflächenstrukturen analysiert. Abbildung 2.20 zeigt die Autokorrelation der Oberflächenstrukturen im Fourierraum an.

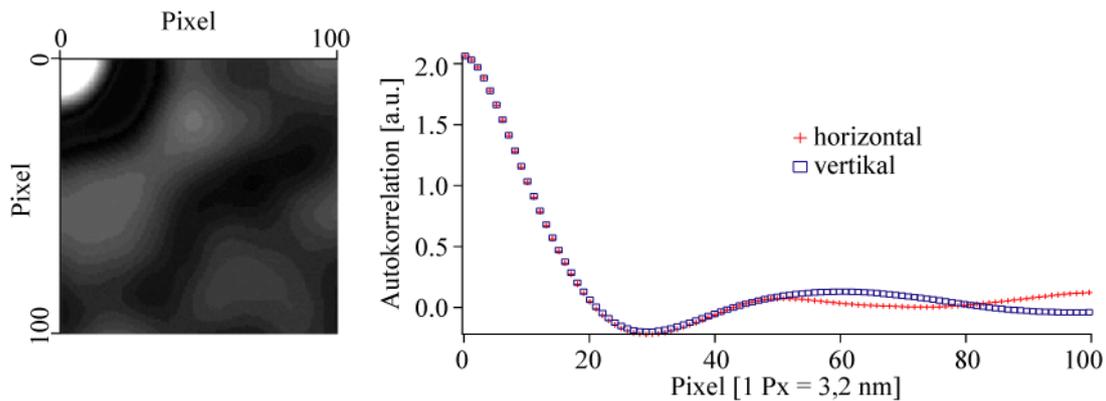


Abbildung 2.20: Links ist die Autokorrelation des REM Bildes dargestellt. Die vertikale wie horizontale Autokorrelation ist rechts dargestellt. Aus der Position des 1. Maximums beider Intensitätskurven wurde anschließend der charakteristische Abstand der Oberflächenstrukturen ermittelt, aus denen wiederum der Mittelwert gebildet wurde.

In Abbildung 2.20 wurde die Autokorrelation des REM Bildes (Abbildung 2.20 links) eines 10  $\mu\text{m}$  großen, porösen Partikels und die Auswertung der Maxima (Abbildung 2.20 rechts) gezeigt. Die Autokorrelation zeigt ein horizontales Maximum bei Pixel 51 und ein vertikales Maximum bei Pixel 60, beide Maxima repräsentieren jeweils einen charakteristischen horizontalen Abstand von 163,2 nm und charakteristischen vertikalen Abstand von 192 nm. Die Analyse aller Partikelgrößen ergab charakteristische Abstände von 113 nm für 5  $\mu\text{m}$  große Partikel, 176 nm für 10  $\mu\text{m}$  große Partikel und 157 nm für 30  $\mu\text{m}$  große Partikel (Tabelle 2.5), die in Bezug auf die Herstellerangaben von 1000  $\text{\AA}$  Porengröße alle in einer vergleichbaren Größenordnung lagen.

Partikelgröße	charakteristischer Abstand
5 $\mu\text{m}$	113 nm
10 $\mu\text{m}$	176 nm
30 $\mu\text{m}$	157 nm

Tabelle 2.5: Charakteristische Abstände von Oberflächenstrukturen in Abhängigkeit der Partikelgrößen. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben von 1000  $\text{\AA}$  Porendurchmesser lagen die ermittelten Werte in einer vergleichbaren Größenordnung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Oberflächenkrümmung der unterschiedlichen Partikelgrößen keinen wesentlichen Einfluß auf den charakteristischen Abstand der Oberflächenstrukturen darstellte. Daher bleibt der variierende Kontaktwinkel (Abbildung 2.3) als einziger sich ändernder Faktor übrig, der die Beschichtungskinetiken beeinflussen kann.

### 2.3.10 Beschichtungsrate der Partikeloberflächen

Die Homogenität der Partikelbeschichtung wurde mit Fluoreszenzmikroskopie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Anschließend wurde die Quantität der Partikelbeschichtung durch Phosphatanalyse exakt bestimmt. Abbildung 2.21 zeigt die normierten Oberflächen der Silicapartikel (linker Balken) und die dazu ermittelten Membranoberflächen auf den Silicapartikeln (rechter Balken).

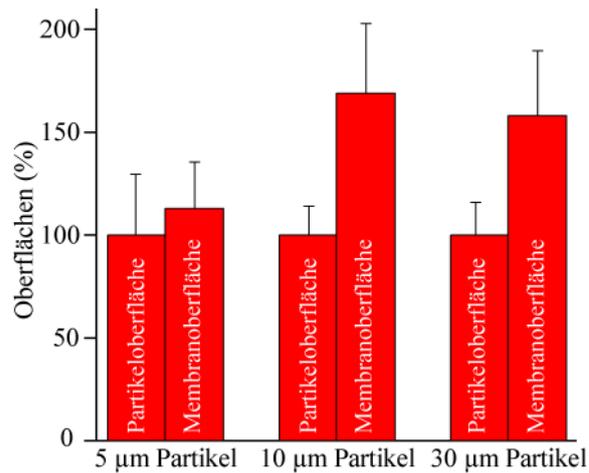


Abbildung 2.21: Die Beschichtungsquote der Partikel unterschiedlicher Durchmesser ( $\varnothing = 5, 10$  and  $30 \mu\text{m}$ ). Der linke Balken repräsentiert die jeweilige Partikeloberfläche (normiert auf 100%), der rechte Balken repräsentiert die immobilisierte Membranoberfläche auf der jeweiligen Partikelgröße (mit Fehlerbalken). Aus den Beschichtungsquoten kann ermittelt werden, daß die Partikeloberflächen mit einer Lage Ghostzellmembran beschichtet wurden.

Die Oberflächengröße der Silicapartikel wurde für alle Partikelgrößen konstant gehalten. Dabei zeigten Silicapartikel mit einem Durchmesser von  $5 \mu\text{m}$  Größe eine Oberflächenbeschichtung von 113%, Silicapartikel von  $10 \mu\text{m}$  eine Oberflächenbeschichtung von 169% und Silicapartikel von  $30 \mu\text{m}$  Größe eine Oberflächenbeschichtung von 158%. Aus den Meßergebnissen ist ersichtlich, daß die Partikeloberflächen vollständig mit einer Lage Ghostzellen beschichtet wurden. Der ermittelte Oberflächenüberschuß kann auf adhärente Ghostzellen zurückgeführt werden, die in der Phosphatanalyse nicht unterschieden wurden.

Eine mehrlagige Oberflächenbeschichtung oder eine Beschichtung der Porenoberfläche kann ausgeschlossen werden, da man in beiden Fälle ein Vielfaches der Membranoberfläche ermittelt hätte. Im Falle der gesamten Porenbeschichtung (Porenoberfläche für  $2 \text{ mg}$  Partikel =  $5 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$ ) hätte die gesamte, eingesetzte Membranoberfläche mit  $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$  in der Phosphatanalyse ermittelt werden müssen, da die eingesetzte Ghostzelloberfläche 10 mal geringer ist als die Porenoberfläche. Im Falle einer mehrlagigen Beschichtung der Partikeloberfläche hätte dies die Ergebnisse erhöhen

müssen, in der Phosphatanalyse wurden aber nur 1.13 bis 1.69 mal mehr Oberflächenbeschichtung ermittelt.

Unter den eingesetzten Pufferkonditionen zeigen die Silicapartikel und die Ghostzellen eine negative Oberflächenladung, was zu einer elektrostatischen Abstoßung führt. Dies wurde bereits von Tanaka et al. (Tanaka, Kaufmann et al. 2001) berichtet, wobei keine Adhäsion oder Beschichtung von planaren Glasoberflächen beobachtet wurde.

Glasoberflächen und Silicapartikel besitzen eine gleiche Oberflächenladung (negative Ladung). Diese elektrostatische Abstoßung stellt eine entgegengesetzte Kraft während der Immobilisierung von Ghostzellen dar. Mit den hier dargestellten Ergebnissen wurde die Beschichtung gekrümmter Oberflächen nachgewiesen, wohingegen die Beschichtung planarer Oberflächen nicht gezeigt werden konnte. Daher muß geschlossen werden, daß der Kontaktwinkel eine treibende Kraft der Beschichtung ist.

Erste Experimente zur Immobilisierung von Erythrozyten wurde auf Polylysin beschichteten Latexpartikeln ( $\varnothing = 30 \mu\text{m}$ ) durchgeführt (Jacobson and Branton 1976). Jacobson nutzte in seinen Experimenten zur Partikelbeschichtung die elektrostatische Anziehung der negativ geladenen Erythrozyten (Nevo, De Vries et al. 1955) und der positiv geladenen Polylysin-beschichteten Partikel. Er beobachtete, daß Erythrozyten auf den Partikeln adhärten, aber nicht aufplatzten. Das Aufplatzen wurde durch osmotische Lyse oder eine kurze Ultraschallbehandlung induziert.

Unter der Annahme, daß eine Zelle in Kontakt mit einer Oberfläche als eine „partielle Benetzung“ eines Flüssigkeitstropfens angesehen werden kann, kann die Adhäsionsenergie  $W$  durch die Young-Dupre Gleichung wiedergegeben werden:

$$W = \sigma(1 - \Theta_c)$$

$\Theta_c$  ist der Kontaktwinkel der adhärten Ghostzelle auf der Partikeloberfläche und  $\sigma$  der laterale Druck. Die Adhäsionsenergie  $W$ , die die gleiche Einheit wie die Oberflächenspannung [N/m] hat, kann auch als Aufsprei druck interpretiert werden. Wenn Ghostzellen ( $\varnothing = 4 \mu\text{m}$ ) in Kontakt zu Partikeln mit vergleichbaren Krümmungen treten (oder kleinere Krümmung am Beispiel der  $30 \mu\text{m}$  großen Partikel), wird der tatsächliche Kontaktwinkel  $\Theta_c$  größer als bei planaren Oberflächen (Abbildung 2.3). Dies könnte eine Steigerung der Adhäsionsenergie im Falle von gekrümmten Silicapartikeloberflächen verursachen (Kaufmann and Tanaka 2003).

### 2.3.11 Analyse der Beschichtungskinetik

Die Beschichtungskinetik der Silicapartikel wird in Abbildung 2.22 gezeigt. Um die Meßwerte aller Partikelgrößen vergleichen zu können, wurde für die graphische Darstellung die Oberflächenbeschichtung auf 100% normiert. Abbildung 2.22 links hebt die Beschichtungskinetik der 5  $\mu\text{m}$  und der 10  $\mu\text{m}$  großen Partikel hervor, wohingegen Abbildung 2.22 rechts die Beschichtungskinetik der 30  $\mu\text{m}$  großen Partikel betont. Die Beschichtungskinetik folgt einer exponentiellen Kurve (Langmuir-Adsorption, durchgezogene Linie), in der alle Partikelbeschichtungen nach einer charakteristischen Zeitspanne die Sättigung erreichen.

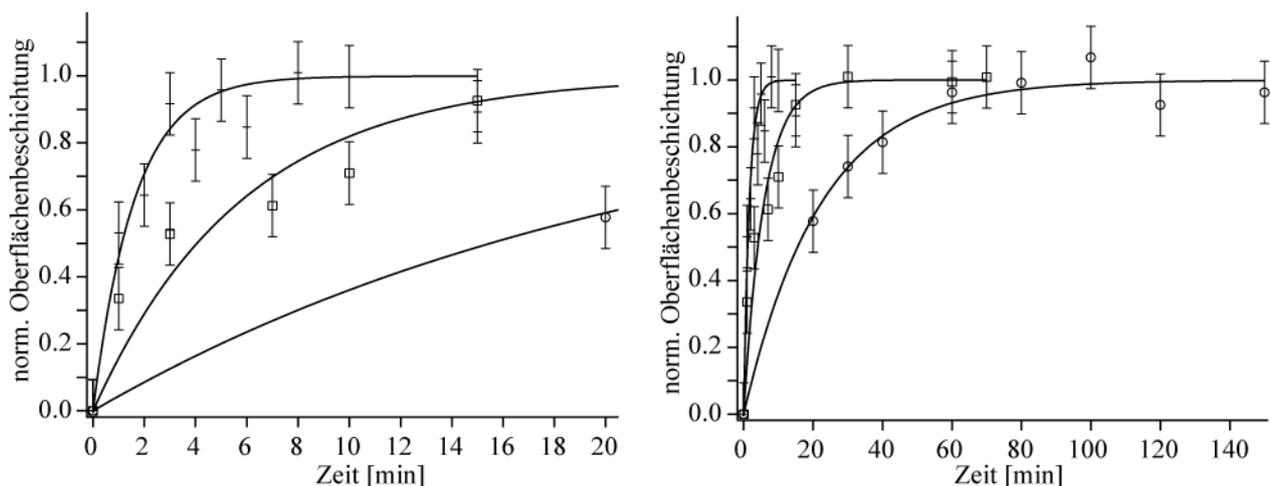


Abbildung 2.22: Kinetik der Membranbeschichtung von Partikeln unterschiedlicher Durchmesser ( $\Delta = 5\mu\text{m}$ ,  $\square = 10\mu\text{m}$ ,  $\circ = 30\mu\text{m}$ ). Die Oberflächen aller Partikelgrößen wurden vollständig mit einer einlagigen Ghostzellmembran beschichtet. Die linke Graphik hebt die Beschichtungskinetik bis  $t = 20\text{ min}$  hervor, wohingegen die rechte Graphik eine Gesamtübersicht aller Partikelgrößen darstellt. Die Meßdaten können sehr gut mit einer exponentiellen Steigung (Langmuir-Adsorption, durchgezogene Linie) analysiert werden und zeigen eine klare Abhängigkeit entsprechend der Partikelgröße.

Das Modell der Langmuir-Adsorption ist eine allgemeine Methode zur Quantifizierung eines Adsorbates an einer Oberfläche. Es basiert auf der Annahme, daß die Adsorption eine Funktion der Konzentration ist und daß die Adsorption auf einer Oberfläche nur eine Monolage bildet. Dieses Verhalten wird graphisch mit einer Sättigungskurve wiedergegeben. Aus dem Verlauf der Adsorptionskinetik aller Partikelgrößen wurde eindeutig eine Langmuir Adsorption ermittelt. Mit zunehmender Partikelgröße verlangsamt sich die Beschichtung, wobei  $\tau$  zunimmt.  $\tau$  beschreibt den Zeitpunkt der halbmaximalen Beschichtung. Eine Verlängerung der Beschichtungszeiten führte zu keiner Zunahme der Oberflächenbeschichtung, sondern führte zu einer Fluktuation um die Sättigungswerte herum.

Partikelgröße [ $\mu\text{m}$ ]	charakteristische Zeit $\tau$ [min]
5	1.6
10	5.8
30	22.3

Tabelle 2.6: Charakteristische Zeitkonstanten der Oberflächenbeschichtung bestimmt durch Phosphatanalyse

Eine mögliche mehrlagige Partikelbeschichtung kann einerseits durch die ermittelten Beschichtungsmengen ausgeschlossen werden, andererseits würde die Beschichtungskinetik einer mehrlagigen Partikelbeschichtung nach der BET Regel (Brunauer, Emmett et al. 1938) erfolgen, die durch eine s-förmige Beschichtungskinetik charakterisiert ist. Die BET Regel ist eine Erweiterung der Langmuir-Adsorption zur mehrlagigen Beschichtung von Oberflächen, die davon ausgeht, daß zwischen den adsorbierten Lagen keine Interaktion stattfindet und daher jede Lage als Langmuir Monolage angenommen werden kann. Dies widerspräche den ermittelten Ergebnissen.

### 2.3.12 Aufplatzmechanismen und Aufplatzkinetiken

Ghostzellen haben die Orientierung nach der Präparation beibehalten, die Membranorientierung aber nach der Beschichtung der Silicapartikel invertiert. Im Gegensatz dazu wurde bei der Beschichtung mit  $F_0F_1$  ATP-Synthase enthaltenden Proteoliposomen ( $\varnothing = 60$  nm) gezeigt, daß die Orientierung bei der Oberflächenbeschichtung beibehalten wurde.

Die Oberflächenbeschichtung mit sphärischen Membranen unterschiedlicher Durchmesser unterliegt zwei physikalischen Parametern:

1. Kontaktfläche
2. Kontaktwinkel

zwischen der Membran und der Festkörperoberfläche.

Lipide in wäßrigen Medien bilden Bilayer aus, die sich zu Liposomen mit kleinstem Durchmesser von 30 nm ausbilden. Dieser Durchmesser stellt eine untere Grenze dar und besitzt die höchste Biegespannung (Cevc and Marsh 1987; Gennis 1989). Im Falle des Aufspreitens von Proteoliposomen ( $\varnothing = 30 - 300$  nm) muß hervorgehoben werden, daß die Lipidmembran eine hohe Biegespannung besitzt. Deswegen adhären Proteoliposomen nicht stabil auf eine Festkörperoberfläche, sondern platzen beim Kontakt mit der Festkörperoberfläche auf, beschichten diese, wobei sie aufgrund des Aufplatzmechanismus ihre native Orientierung beibehalten (Contino, Hasselbacher et al. 1994; Salafsky, Groves et al. 1996; Tutus, Rossetti et al. 2008).

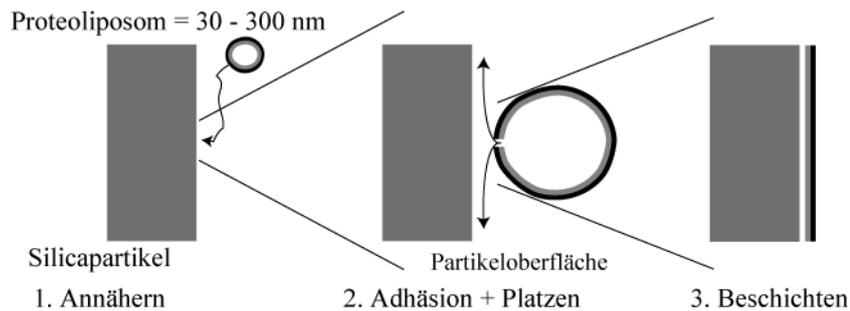


Abbildung.2.23: Schematische Darstellung des Aufspreitmechanismus eines Proteoliposoms ( $\varnothing \approx 30 - 300 \text{ nm}$ ) auf einer Festkörperoberfläche. Proteoliposomen besitzen eine hohe Biegespannung, weshalb sie keine stabile Kontaktfläche bei der Adhäsion aufbauen können. Sie platzen beim Kontakt mit der Partikeloberfläche auf und beschichteten diese so, daß auf dem Partikel ihre äußere Seite zum Puffer hin exponiert wurde.

Ghostzellen sind jedoch einige Zehnerpotenzen größer als Proteoliposomen. Zudem besteht ihre Lipidmembran aus einem Gemisch verschiedener Lipide mit unterschiedlichen Packungsparametern und unterschiedlich langen Alkylketten. Solche Membranen weisen im Vergleich zu Proteoliposomen eine geringere Biegespannung auf. In mikroskopischen Aufnahmen von membranmarkierten Ghostzellen wurde beobachtet, daß sie eine „zeitlich“ stabile Kontaktfläche auf Partikeloberflächen von  $30 \mu\text{m}$  Größe aufbauen. Zudem wurde gezeigt, daß auf der Partikeloberfläche adhärente Ghostzellen zu schwingen begannen und der Festkörperoberfläche gegenüber liegende Bereich aufriß wodurch die Partikeloberfläche beschichtete wurde (Abbildung 2.24). Bei diesem Aufplatzmechanismus wird die Innenseite die Ghostzellenmembran zum Puffer hin exponiert.

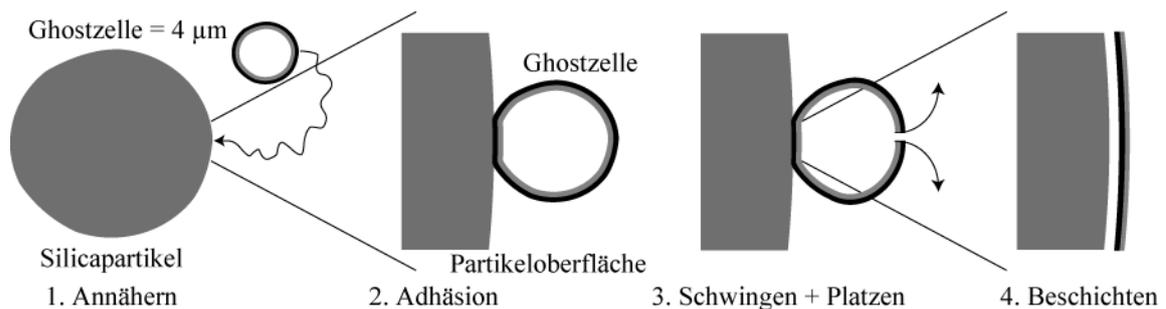


Abbildung 2.24: Schematische Darstellung des Aufplatzmechanismus von Ghostzellen ( $\varnothing \approx 4 \mu\text{m}$ ). Die Ghostzelle adhärte auf die Partikeloberfläche und bildete dadurch eine zeitlich stabile Kontaktfläche aus. Das Aufplatzen der Ghostzelle erfolgte an der gegenüberliegenden Seite des Partikels und führte zu dessen Beschichtung, bei der die Innenseite der Ghostzellenmembran zum Puffer hin exponiert wurde.

Interessant am System der Ghostzellen auf Silicapartikeln ist, daß alle Partikel eine in ihrer Topographie und chemischen Zusammensetzung vergleichbare Oberfläche aufweisen und daß die Partikeldurchmesser präzise variiert werden können. Mit diesem System wurde eine variable

Beschichtungskinetik ermittelt, aus dem geschlossen werden kann, daß die Biegespannung der Ghostzellen keinen Einfluß auf den Aufplatzmechanismus hat, jedoch der Kontaktwinkel die Kinetik der Beschichtung beeinflusst.

Aus dieser vergleichenden Beobachtung ist zu schließen, daß der Aufplatzmechanismus von Proteoliposomen nur von deren Größe (Durchmesser) abhängig ist. Man ist somit im Stande durch die Änderung der Durchmesser der Proteoliposomen den Aufplatzmechanismus gezielt zu steuern (Jacobson and Branton 1976; Tanaka, Kaufmann et al. 2001; Kaufmann and Tanaka 2003).

Das kontrollierte Aufspreiten von Zellmembranen ist eine hochinteressante Methode für biochemische Arbeiten. Die Analyse, wie z.B. die strukturelle Untersuchung des Proteoms der inneren Zellmembran, kann mit Standardanalysemethoden nicht durchgeführt werden (Daley, Rapp et al. 2005). Wie gezeigt wurde, wird durch das Aufspreiten von Zellmembranen auf Festkörperoberflächen die Innenseite zum Puffer hin exponiert und ist somit für Untersuchungen zugänglich.

## 2.4 Resumée

Für die Bestimmung des Beschichtungsverhaltens der Ghostzellen wurden membranmarkierte Ghostzellen angefertigt, die mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der konfokalen Mikroskopie charakterisiert wurden. Es wurde gezeigt, daß die Oberfläche der Ghostzellen homogen markiert war. Die Antikörpermarkierung der Ghostzellen zeigte, daß sie alle eine „right side out“ Orientierung besaßen. Mit Hilfe der Membranmarkierung wurde ebenfalls gezeigt, daß Ghostzellen sphärisch sind und einen Durchmesser von ca. 4  $\mu\text{m}$  haben. Die Membranfläche einer 4  $\mu\text{m}$  großen Ghostzelle ist in guter Übereinstimmung mit der Membranfläche von bikonkaven Erythrozyten und zeigt, daß während der Präparation die gesamte Membranfläche intakt blieb.

Die Analyse der Partikelbeschichtung zeigte, daß unmodifizierte Partikeloberflächen homogen mit Ghostzellen beschichtet wurden. Eine Analyse der Membranorientierung auf den Partikeln ergab, daß die Ghostzellen in einem invertierenden Schritt die Partikeloberflächen beschichteten und dabei die Membraninnenseite zum Puffer hin präsentierten. Da die Partikel vollständig porös sind, besitzen sie eine Partikeloberfläche und eine Porenoberfläche. Mit einer Aufnahme innerhalb des Partikelvolumens, der die Porenoberfläche darstellt, konnten eine Porenbeschichtung ausgeschlossen werden. Wohingegen eine 3 dimensionale Darstellung der konfokalen Daten eine gleichmäßige Partikelbeschichtung anzeigte. Ebenfalls konnte mit ESEM eine homogene Partikelbeschichtung nachgewiesen werden, die ein Überspannen der Poren von Ghostzellenmembran anzeigte. In der SDS PAGE wurde ermittelt, daß die Membranzusammensetzung auf den Partikeln wie ungebunden die gleiche war, woraus ebenfalls hervorgeht, daß die Ghostzellen im ganzen immobilisiert wurden.

Anschließend wurde der Beschichtungsprozeß mit einem Mikromanipulator, an dessen Spitze eine Kapillare mit einem 5  $\mu\text{m}$  großen Partikel fixiert war, untersucht. Es wurde ermittelt, daß der Beschichtungsprozeß schneller als 117 ms war.

Für die Beschichtung wurden Partikel mit unterschiedlichen Durchmessern aber gleichen Porengrößen eingesetzt. Durch die variierende Partikelgröße ergibt sich eine variierende Krümmung. Mit Hilfe der Fast Fourier Transformation der Partikeloberflächen, aufgenommen mit REM, wurde gezeigt, daß durch die Partikelkrümmung keine Änderung der Oberflächenrauigkeiten erfolgte.

Die Partikelbeschichtung wurde mit 10 fachem Überschuß an Membranfläche durchgeführt, um ein vollständiges Beschichtung zu garantieren. Die ermittelten Membranflächen auf den Partikeln ergaben für alle Größen eine einfache Partikelbeschichtung, wobei Partikel mit koinzidierender Größe näher bei 100% liegen. Mit Hilfe der Phosphatanalyse wurde ermittelt, daß die Beschichtungskinetik von der Größe der Partikel abhängig ist und mit steigender Partikelgröße abnimmt.



### 3. Proteinaktivität der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in SR Membranen auf unmodifizierten, porösen Partikeloberflächen<sup>3</sup>

#### **Zusammenfassung**

Die Proteinaktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in SR Membranen wurde quantitativ nach Immobilisierung auf unmodifizierten porösen Silicapartikeln ( $\text{Ø} = 10 \mu\text{m}$ ) bestimmt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist eine aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Pumpe, die Calcium unter Hydrolyse von ATP aus dem Zytosol ins Lumen des SR pumpt. Die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wird dabei quantitativ über die Konzentrationsbestimmung des freigesetzten Phosphats bestimmt. Poröse Silicapartikel werden in einem 1-Schritt-Mechanismus mit einer Lage SR Membranen beschichtet und sedimentieren aufgrund ihres hohen Dichteunterschiedes, wodurch die Trennung von beschichteten Partikeln von freischwimmenden, ungebundenen SR Membranen erfolgt. Auf Silicapartikeln immobilisierte SR Membranen wurden in eine Chromatographiesäule gefüllt. Dieses System erlaubt die einfache Trennung und den einfachen Nachweis von Substrat und Produkten, sowie eine simple Änderung der Puffer- und Reaktionsbedingungen innerhalb der Chromatographiesäule.

---

<sup>3</sup> Murat Tutus, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka

„Highly Concentrated Sarcoplasmic Reticulum Membranes on Particle Supports as Biochemical Micro-Reactors“, in preparation

## Einleitung

Nachdem in Kapitel 1 und 2 gezeigt wurde, welche Faktoren für die Immobilisierung von Proteoliposomenmembranen auf planaren Festkörperoberflächen ausschlaggebend sind und welche Faktoren die Beschichtungskinetik von natürlichen Membranen auf sphärischen Partikeln determinieren, wird in diesem Kapitel die Bestimmung der Proteinaktivität der transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase immobilisiert auf einer unmodifizierten Festkörperoberfläche beschrieben.

Als Membranmodell wurden Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulums aus Kaninchenhinterläufen verwendet. Sie zeigen eine einfache Proteinzusammensetzung mit dem transmembranen Proteinkomplex  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase als Hauptkomplex. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase katalysiert den aktiven Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Zytosol in das Lumen der SR unter Hydrolyse von ATP, wobei ADP und Phosphat freigesetzt werden. Über die Konzentrationsänderung des katalytisch freigesetzten Phosphats nach der Methode von Kallner wurde die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bestimmt.

Zwischen einer immobilisierten Lipidmembran und der Festkörperoberfläche befindet sich ein Wasserfilm von ca. 3 nm Höhe, der zu niedrig ist, um den Kontakt von Proteinen zur Festkörperoberfläche zu verhindern. Um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden wurden poröse Partikel eingesetzt. Poröse Partikel werden von der Lipidmembran überspannt, so daß die Membran nur an den Rändern der Poren mit dem Festkörper in Kontakt kommt. Proteine, die sich in membran-überspannenden Bereichen befinden, wurden somit von der Oberfläche entkoppelt. Zudem besitzen poröse Partikel gegenüber massiven Partikeln den Vorteil, daß das Porenvolumen als Depot genutzt werden kann.

Mit SR Membranen beschichtete Partikel wurden in eine Chromatographiesäule gefüllt, in der die Partikel zurückgehalten wurden. Der Einsatz der Chromatographiesäule ermöglicht es durch einfachen Puffertausch die Reaktionsbedingungen innerhalb der Säule präzise zu regulieren und das katalytisch hergestellte Phosphat mit dem Eluat abzutrennen. Zudem können bekannte scale-up Prozesse sowie Betriebsmodi eingesetzt werden, um Chromatographiesäulen mit immobilisierten SR Membranen verschiedenen technischen Anforderungen anzupassen.

## 3.1 Materialien

### 3.1.1 Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden wie in Teil 1 und 2 beschrieben von Sigma Aldrich und Carl Roth bezogen. Reinstwasser (Millipore, Molsheim, Frankreich) mit einem spezifischen Widerstand  $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$  wurde in allen Experimenten benutzt.

Das Lipidanalogen 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, Triethylammonium Salz (Texas-Red DHPE, Avanti Polarlipids, Alabaster, USA) wurde eingesetzt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des SR wurden spezifisch mit einem ersten monoklonalen Maus-Antikörper (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) und einem zweiten TRITC (Abbildung 3.1.a) konjugierten, polyklonalen Ziege Anti-Maus Antikörper (Sigma Aldrich, München, Deutschland) markiert.

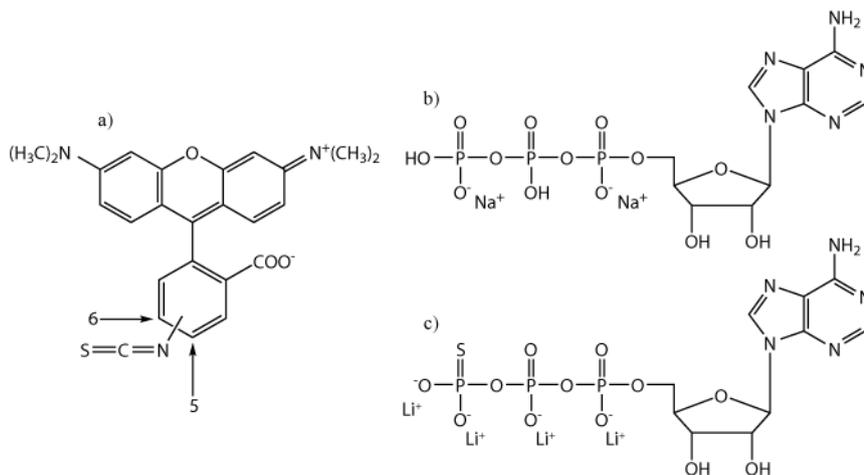


Abbildung 3.1: Antikörper zur Detektion der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurden chemisch über die Isothiocyanatgruppe von TRITC (a) markiert. Bei der enzymatischen Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wird ATP (b) verbraucht und wurde daher der Probe zugegeben. Im Kontrollversuch wurde statt ATP ein unhydrolysierbares Analogon (ATP- $\gamma$ -S) (c) eingesetzt.

Die Aktivitätsbestimmung wurde mit ATP (Abbildung 3.1.b) oder mit einem unhydrolysierbarem ATP-Analogon (Adenosin 5'-(thio) Triphosphat Tetralithiumsalz, Sigma Aldrich, München, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 3.1.c).

Im Phosphatnachweis wurden Polyviol (mittleres molekulares Gewicht = 13 – 23 kDa), Malachitgrün, Ammoniummolybdat und Salzsäure eingesetzt.

### 3.1.2 Silicapartikel

Poröse Silicapartikel (1000 Å) aus hochreinem Silicat (Si-OH) mit einem Durchmesser von 10 µm (Nucleodur, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) (Abbildung 3.2) wurden benutzt.

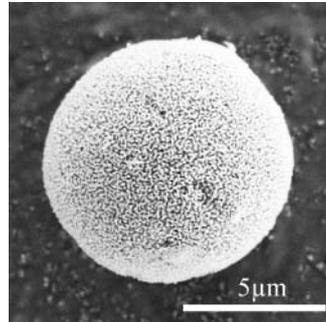


Abbildung 3.2: REM Aufnahme eines porösen Silicapartikels mit einem Durchmesser von 10 µm und Porengrößen von 1000 Å.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolation von Membranfragmenten des Sarkoplasmatischen Retikulum

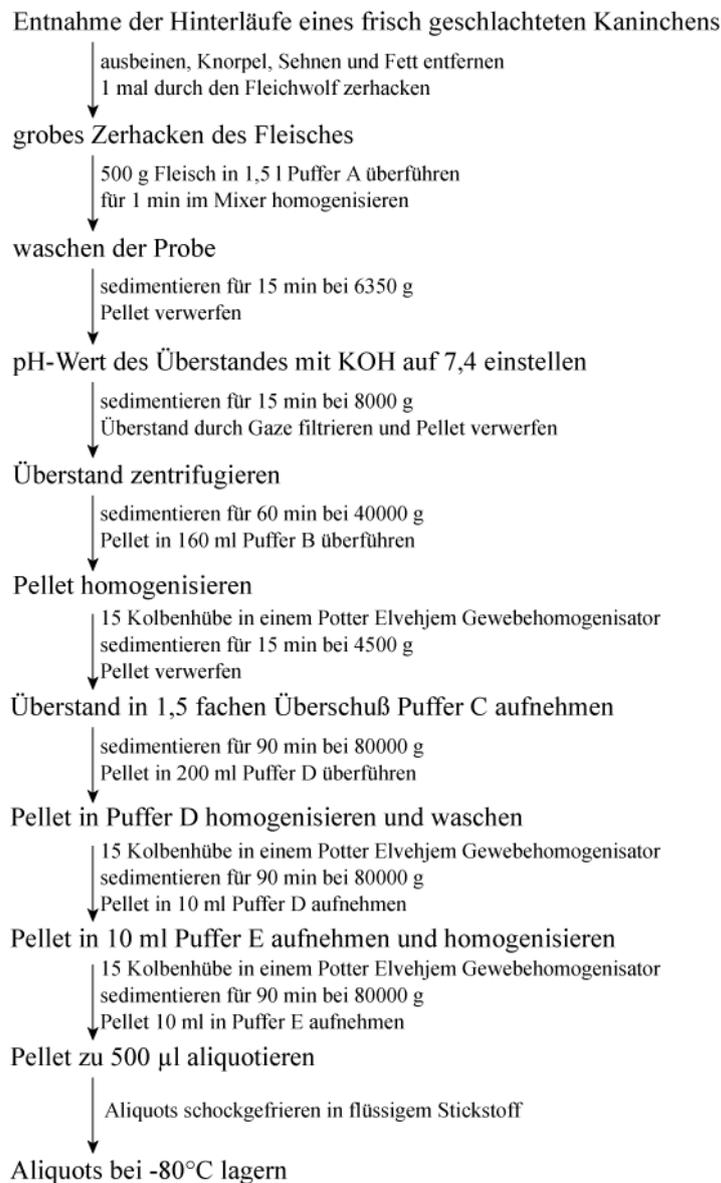
Die Präparation (Präparationsschema 3.1) der Membranfragmente des SR (Abbildung 3.3.a) und der darin enthaltenen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Abbildung 3.3.b) wurde nach der Methode von de Mais (de Mais and Hasselbach 1971) durchgeführt.

Für die Membranpräparation des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) wurden 5 verschiedene Puffer eingesetzt:

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	100 mM KCl, 2 mM EDTA, 2,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM DDT, 10 $\mu\text{M}$ Leupeptin, 0,1 $\mu\text{M}$ PMSF, pH = 7,4
Puffer B	50 mM KCl, 1 mM Triethanolamin, 1 M Saccharose, 1 mM DDT, 10 $\mu\text{M}$ Leupeptin, 0,1 $\mu\text{M}$ PMSF, pH = 7,4
Puffer C	1 M KCl, 1 mM Triethanolamin, 160 mM Saccharose, 3,35 mM ATP, 3,35 mM $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DDT, 10 $\mu\text{M}$ Leupeptin, 0,1 $\mu\text{M}$ PMSF, pH = 7,4
Puffer D	100 mM KCl, 1 mM Triethanolamin, 96 mM Saccharose, 1 mM DDT, pH = 7,4
Puffer E	100 mM KCl, 1 mM Triethanolamin, pH = 7,4

Die Hinterläufe eines frisch geschlachteten Kaninchens wurden ausgebeint, Knorpel, Sehnen und Fett entfernt, anschließend wurden 500 g Fleisch in einem Fleischwolf zerkleinert und in 1,5 l Puffer A aufgenommen. Dieser Ansatz wurde in einem Mixer (Waring Blender, VWR, Bruchsal, Deutschland) für 1 min homogenisiert. Anschließend wurden Myofibrillen für 15 min bei 6.350 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 7N KOH auf pH = 7,4 eingestellt und für 15 min bei 8.000g zentrifugiert, um Mitochondrien abzutrennen. Anschließend wurden die in Lösung befindlichen SR Membranen für 60 min bei 40.000 g sedimentiert und in 160 ml Puffer B überführt. Das Pellet wurde in einem Potter Elvehjem Gewebhomogenisator (VWR, Bruchsal, Deutschland) zermahlen und für 15 min bei 4.500g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 1,5 fachem Überschuß in Puffer C aufgenommen und für 90 min bei 80.000 g sedimentiert. Danach wurde das Pellet 2 mal in 200 ml Puffer D für 90 min bei 80.000 g gewaschen

und anschließend mit einem Potter Elvehjem Gewebehomogenisator zermahlen, wobei Membranfragmente des SR aufgereinigt wurden. Die Probe wurde in 10 ml Puffer E aufgenommen, zu 500 µl aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im -80°C Tiefkühlschrank gelagert. Alle Experimente wurden jeweils mit frisch aufgetauten SR Aliquots durchgeführt.



Präparationsschema 3.1: Isolierung von SR Membranfragmenten aus Kaninchenhinterläufen

Aktivitätsmessungen wurden in Puffer E angefertigt, dem 1 mM Natriumazid zur Konservierung zugegeben wurde. Um die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gezielt zu aktivieren, wurden dem Puffer E  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, und ATP zugegeben.

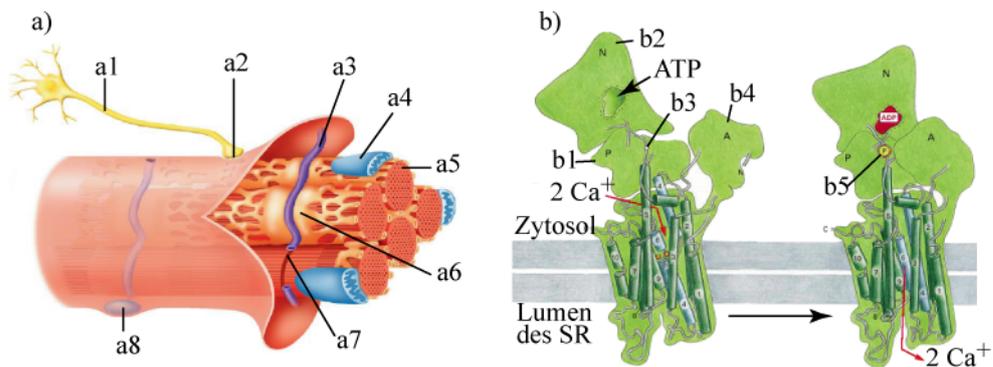


Abbildung 3.3: Das Sarkoplasmatische Retikulum befindet sich innerhalb einer Muskelzelle (Abbildung a), die vereinfacht dargestellt wird: a1 Motorneuron, a2 Neuro-Muskuläre-Endplatte, a3 Transversaltubus, a4 Mitochondrium, a5 Myofibrille, a6 Sarkoplasmatisches Retikulum, a7 Z-Linie, a8 Zellkern. (Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 4. Ausgabe, Wiley-VCH). In Abbildung b) ist ein Modell der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase dargestellt: b1 Phosphorylierungsdomäne, b2 Nukleotidbindestelle, b3 Aspartat (wird phosphoryliert), b4 Aktivator-domäne, b5 Phosphoryliertes Aspartat (Lodish, Molecular Cell biology, 4. Ausgabe, Spektrum Verlag).

### 3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinanalyse erfolgte wie unter Teil 2 (Kapitel 2.2.2) beschrieben mit einem Bio-Rad Proteinassay nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Die Proteinbestimmung wurde nach der Microassay Methode von Bio-Rad durchgeführt.

### 3.2.3 Bestimmung der Lipidkonzentration

Die Lipidkonzentration der SR Membranfragmente wurde nach der Methode von Fiske und Subbarow (Fiske and Subbarow 1925), wie in Teil 1 (Kapitel 1.2.10) beschrieben, durchgeführt.

### 3.2.4 Markieren der Membranfragmente des Sarkoplasmatischen Retikulums

Analog zu der Methode in Kapitel 2.2.4 wurden SR-Fragmente membranmarkiert.

Die Antikörpermarkierung begann mit einem ersten monoklonalen Maus Antikörper gegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland), der zwischen der Aminosäure 590 und dem C-Terminus des Proteins band. Der erste Antikörper wurde von einem zweiten TRITC konjugierten Ziege-Anti-Maus Antikörper (Sigma Aldrich, München, Deutschland) spezifisch gebunden und konnte im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Das Absorptionsmaximum von TRITC (Abbildung 3.1.a) liegt bei 550 nm, das Emissionsmaximum bei 570 nm.

### 3.2.5 Partikelbeschichtung mit Membranfragmenten des Sarkoplasmatischen Retikulums

Die Aktivitätsbestimmung der immobilisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde auf 10  $\mu\text{m}$  großen Silicapartikeln (Abbildung 3.2) mit Porengrößen von 1000 Å durchgeführt. Die Beschichtung der Partikel erfolgte im Verhältnis von 10:1 oder 1:1 der SR-Membranoberfläche zur Partikeloberfläche. Die Partikeloberfläche und die Oberfläche der SR Membran wurden wie unter Kapitel 2.2.8 ermittelt. Die Reinigung und die Beschichtung der Partikel erfolgte ebenfalls analog zu Kapitel 2.2.8.

### 3.2.6 Mikroskopische Methoden und Vergleich der Proteinzusammensetzung der SR Membranen in Puffer und auf Silicapartikeln

Analog zu den Methoden in Teil 1 und 2 wurden Phasenkontrastmikroskopie (Kapitel 2.2.10), Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 1.2.13), Spinning Disk konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 2.2.11) und Environmental Rasterelektronenmikroskopie (Kapitel 2.2.13) durchgeführt. SDS-PAGE erfolgte analog zu Kapitel 2.2.9.

### 3.2.7 Bestimmung des katalytisch freigesetzten Phosphats

Die Konzentrationsbestimmung des katalytisch freigesetzten Phosphats erfolgte nach der Methode von Kallner, (Kallner 1975) in der Phosphat im stark sauren Medium mit Molybdat einen Komplex als Dodekamolybdatphosphorsäure (DMP) eingeht. DMP bildete mit Malachitgrün quantitativ ein Farbsalz, das durch Polyviol in Lösung gehalten wurde und anschließend photometrisch bestimmt wurde (Altmann, Fürstenau et al. 1971).

Für die Phosphatbestimmung nach Kallner wurde eine Arbeitslösung hergestellt aus 2:1:1:2 (v/v/v/v) Malachitgrünlösung, Polyviollösung, Ammoniummolybdatlösung und Reinstwasser.

<b>Malachitgrünlösung</b>	<b>Polyviollösung</b>	<b>Ammoniummolybdatlösung</b>
0,812 g Malachitgrün	11,6 g Polyviol	28,6 g Ammoniummolybdat
1000 ml Reinstwasser	500 ml Reinstwasser	500 ml 6N HCl

Diese Arbeitslösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich seine Farbe von dunkel grün zu gelb änderte. Der Nachweis des katalytisch freigesetzten Phosphats erfolgte durch Reaktion von 500  $\mu\text{l}$  Probe mit 2000  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung exakt für 30 min. Die Adsorption des

Farbsalzes wurde anschließend bei  $\lambda = 630$  nm gemessen und mit Hilfe einer Eichgeraden die molaren Konzentrationen bestimmt.

### 3.2.8 Aktivitätsmessung der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist ein aktiver Transporter, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die SR Membran vom Zytosol in das ER Lumen unter Verbrauch von ATP transportiert. Dabei wird ADP und Phosphat hydrolytisch freigesetzt. Die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase kann somit durch die Konzentrations-zunahme des freigesetzten Phosphats quantitativ verfolgt werden.

Die Aktivitätsbestimmung von 100  $\mu\text{g}$  (Gesamtproteinkonzentration) der SR Membranen erfolgte mit 120  $\mu\text{mol}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und 15  $\mu\text{mol}$  ATP. In Zeitintervallen von 1, 2, 5, 10 und 20 Minuten wurden Proben entnommen und die Konzentration des katalytisch freigesetzten Phosphats bestimmt.

Die Aktivität immobilisierter  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auf Silicapartikeln wurde ebenfalls bestimmt. Die beschichteten Partikel wurden in einem Überkopfrührer (5,5 RPM) in Suspension gehalten. Die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde durch die Zugabe von 120  $\mu\text{mol}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und 15  $\mu\text{mol}$  ATP gestartet. In einer Abwandlung der Aktivitätsbestimmung wurde die Reaktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durch die Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt. EDTA ist ein Komplexbilder, der stabile Chelatkomplexe mit divalenten Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aufbaut und dadurch die Reaktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase stoppt. Nach Bestimmung einer stabilen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität wurde dem Reaktionsansatz 10 mM EDTA im Überschuß zugegeben. In Zeitintervallen von 2, 5 und 10 Minuten wurden Proben entnommen und die Silicapartikel durch Sedimentation abgetrennt (30 s, 1000 g), um die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase vom ATP zu trennen. Dadurch wurde die enzymatische Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase beendet. Aus dem Überstand wurde dann der Wert des katalytisch freigesetzten Phosphats ermittelt.

Fortsetzend wurden beschichtete Silicapartikel in eine Standard-Chromatographiesäule ( $\text{Ø} = 10\text{mm}$ , GE Healthcare, Uppsala, Schweden) (Abbildung 3.4) mit einem Bettvolumen von 1,8 ml gepackt und mittels einer Präzisionspumpe (Syringe Pump 22, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) mit einer Rate von 0,05 ml/min gespült. Das Eluat wurde in Zeitintervallen von 10 Minuten fraktioniert und das darin enthaltene, katalytisch freigesetzte Phosphat nach der Methode von Kallner bestimmt.

In der gepackten Chromatographiesäule konnten Puffer vereinfacht ausgetauscht und dadurch die Pufferkonditionen variiert werden.

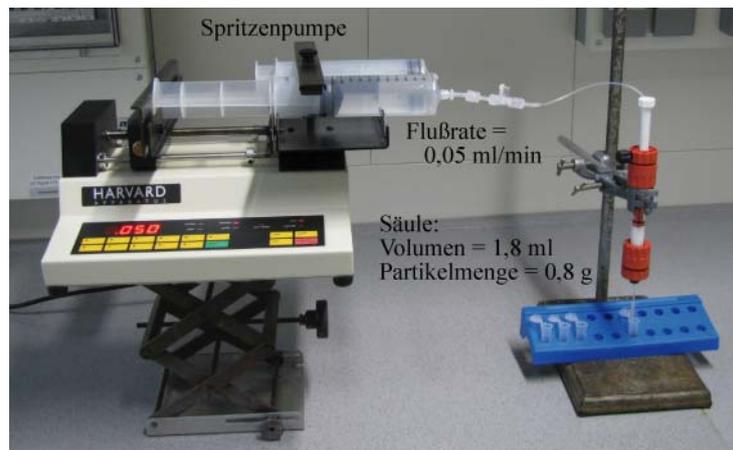


Abbildung 3.4: Versuchsaufbau zur Aktivitätsbestimmung immobilisierter  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auf Silicapartikeln in einer Chromatographiesäule. Über eine Präzisionspumpe wurde Puffer in die Säule zugeführt, das Eluat mit einem Fraktionierer gesammelt und über die Phosphatanalyse die Konzentrationszunahme des katalytisch freigesetzten Phosphats ermittelt.

### 3.3 Ergebnisse und Diskussionen

#### 3.3.1 Charakterisierung der SR Membranen

Für die Präparation der SR Membranfragmente wurde das Muskelgewebe von Kaninchenhinterläufen in einem ersten Arbeitsschritt grob zerstört. Anschließend wurden die SR Membranen durch intensive Homogenisierung in einem Gewebehomogenisator und in mehreren Reinigungsschritten aufgereinigt. Die Homogenisierung erfolgte durch große Scherkräfte in einem 0,1 - 0,15 mm breiten Spalt zwischen einer rotierenden Teflonpistille und einem Glasmörser. Alle Zell- und Organellstrukturen wurden in diesem Prozeß zerstört, wodurch verschieden große, uneinheitliche SR Membranfragmente (Abbildung 3.5) gewonnen wurden.

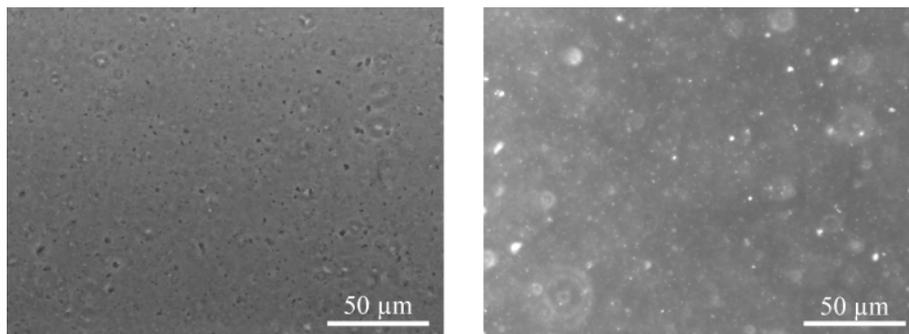


Abbildung 3.5: Mikroskopische Aufnahmen von membranmarkierten SR Fragmenten. Bild a) zeigt Membranfragmente im Phasenkontrastmodus, Bild b) die korrespondierende Aufnahme im Fluoreszenzmodus. Die Aufnahmen zeigen SR Membranfragmente, die variierende Größen und Formen besitzen.

Für die Aktivitätsbestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurden diese SR Membranfragmente eingesetzt. Aufgrund ihres hohen Proteinanteils von ca. 70% der Trockenmasse und ihrer einfachen Proteinzusammensetzung mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase als Hauptkomponente eignen sich SR Membranen besonders gut für die Enzymaktivitätsbestimmung. Der Proteinanteil der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase macht ca. 65% bis 80% aus (Inesi 1972; de Meis and Vianna 1979). In Folge des hohen Anteils der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase kann ein hohes Aktivitätssignal der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit geringen Mengen an SR Membranfragmenten hergestellt werden (Franzini-Armstrong and Ferguson 1985).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist ein aktiver transmembraner Transporter, der unter Energieverbrauch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entgegen eines Konzentrationsgefälles in das Lumen des Sarkoplasmatischen Retikulums

pumpt (Walz and Caplan 1988). Dabei wird ATP zu ADP und Phosphat katalytisch hydrolysiert, daher kann durch Konzentrationsbestimmung des freigesetzten Phosphats die enzymatische Proteinaktivität ermittelt werden. Die Phosphatbestimmung kann nicht nach der Methode von Fiske und Subbarow (Fiske and Subbarow 1925) durchgeführt werden, da es sich dabei um eine Gesamtphosphatbestimmung handelt. Sie basiert auf der Veraschung der Probe, wobei katalytisch freigesetztes Phosphat sowie in Phospholipiden gebundenes Phosphat nachgewiesen wird. Aus diesem Grund wurde die Methode von Kallner (Kallner 1975) gewählt, die eine Abwandlung der Methode von Fiske und Subbarow ist. Die Methode von Kallner benötigt keinen Veraschungsschritt. Es werden nur freie Phosphate detektiert, die beim aktiven Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen hydrolytisch aus ATP freigesetzt wurden. Zudem ist die Phosphatbestimmung nach der Methode von Kallner in ihrer Durchführung sehr einfach, sie erfolgt in einem einzigen Arbeitsschritt und ist daher für die unmittelbare Aktivitätsbestimmung gut geeignet. Ein weiterer Vorteil der Methode von Kallner besteht in der Verwendung einer stark sauren Arbeitslösung (pH=1), die Protein denaturiert und dadurch ihre enzymatische Aktivität stoppt (Chan, Delfert et al. 1986).

### **3.3.2 Protein und Lipidkonzentration**

Die Proteinkonzentration der Stammlösung wurde mit Hilfe des Bio-Rad Proteinassay mit einer Konzentration von 19,2 mg/ml ermittelt. Dies gibt die Gesamtproteinkonzentration der SR Membranfragmente an. Wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben ist eine direkte Bestimmung der Proteinkonzentration auf der Partikeloberfläche nicht möglich. Die Lipidkonzentration der Stammlösung wurde mit 11.7 mg/ml nach der Methode von Fiske und Subbarow (Fiske and Subbarow 1925) ermittelt.

### **3.3.3 Bestimmung der immobilisierten SR Membranfläche auf Silicapartikeln**

Die Partikelbeschichtung ( $\emptyset = 10 \mu\text{m}$ , Porengröße = 1000 Å) wurde mit einem Oberflächenverhältnis von 10:1 sowie 1:1 Membranfläche zu Partikeloberfläche durchgeführt. Im Beschichtungsansatz mit 10-fachem SR Membranüberschuß wurde eine Partikelbeschichtung von 190% und im Beschichtungsansatz im Verhältnis von 1:1 Membranfläche zu Partikeloberfläche eine Partikelbeschichtung von 110% (Tabelle 3.1) bestimmt. Wegen der undefinierten Oberflächenbeschichtung bei 190% wurden für alle Experimente Partikel eingesetzt, die eine

Oberflächenbeschichtung von 110% aufzeigten. Dieses Flächenverhältnis von SR Membran zu Partikeloberfläche ergibt innerhalb der Fehlergrenzen eine vollständige Partikeloberflächenbeschichtung.

Alle natürlichen Zell- und Organellstrukturen wurden in der Aufreinigungsmethode der SR Membranen zerstört. Ein Verkleinern der Fragmente auf die Partikelporengrößen (1000 Å) ist mit dem Zellhomogenisator nicht möglich, da einerseits die dafür benötigte Arbeit nicht aufgebracht wird und sich andererseits Membranfragmente stets zu größeren Aggregaten zusammenlagern. Daher besitzen SR Membranfragmente im Gegensatz zu Ghostzellen (Kapitel 2) keine definierte Größenverteilung und keine definierte Form.

Oberfläche SR Fragmente : Partikeloberfläche	Partikelbeschichtung
10 : 1	190 %
1 : 1	110 %

Tabelle 3.1: Partikelbeschichtung in Abhängigkeit von verschiedenen Oberflächenverhältnissen. Die Beschichtung im 10-fachen Membranflächenüberschuß ergibt eine 190%ige Partikelbeschichtung, eine Beschichtung im Flächenverhältnis von 1:1 ergibt eine 110%ige Beschichtung.

### 3.3.4 Beschichtungsanalyse der Partikeloberflächen

Die Homogenität der Partikelbeschichtung wurde mit Hilfe von Texas-Red DHPE membranmarkierten SR Membranen nachgewiesen. Der Einbau der Farbstoffliposomen in die SR Membranen erfolgte spontan (Pagano, Longmuir et al. 1983; Haverstick and Glaser 1987).

In korrespondierenden Aufnahmen von beschichteten Partikeln wurden Silicapartikel in Phasenkontrastaufnahmen und membranmarkierte SR Membranen in Fluoreszenzbildern nachgewiesen. Der Vergleich der Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 3.6) gibt einen Hinweis darauf, daß Silicapartikel von SR Membranen homogen beschichtet wurden, was durch einen fluoreszierenden Partikelrand angezeigt wurde. Da mikroskopische Aufnahmen eine 2 dimensionale Darstellung sind, kann keine eindeutige Aussage bezüglich der Homogenität der Oberflächenbeschichtung oder bezüglich der Porenbeschichtung getroffen werden (zur Beschreibung der Partikel- und Porenoberfläche siehe Kapitel 2.3.5). Hervorzuheben ist aber, daß die ermittelte Oberflächenbeschichtung anhand der SR Membranfläche eine einlagige Partikeloberflächenbeschichtung ergab (Kapitel 3.3.3).

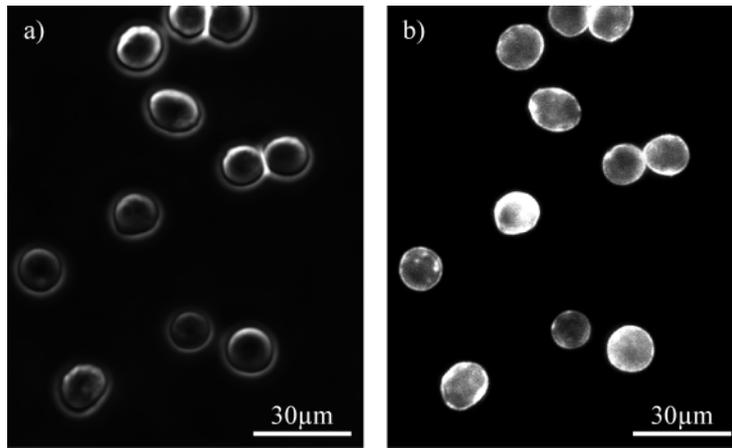


Abbildung 3.6: Mikroskopische Aufnahmen poröser, 10 µm großer Partikel, die mit membranmarkierten SR Fragmenten beschichtet wurden. Bild a) zeigt eine Phasenkontrastaufnahme, die Silicapartikel anzeigt, Bild b) stellt die korrespondierende Probe in einer Fluoreszenzaufnahme dar, die die SR Membranen nachweist. Ein Vergleich der Aufnahmen zeigt, daß SR Membranfragmente auf den Partikeloberflächen homogen immobilisiert wurden.

Eine präzisere Beschichtungsanalyse wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Sie ermöglicht es, die Partikeloberfläche von der Porenoberfläche zu unterscheiden. Von beschichteten 10 µm großen Silicapartikeln wurden auf 60 Fokusebenen (Abstand 220 nm) Bilder angefertigt (Abbildung 3.7). Abbildung 3.7.a stellt eine Fokusebene durch die Mitte eines Partikels dar. In der Aufnahme ist ein fluoreszierender Partikelrand, aber keine fluoreszierende Partikelfläche zu erkennen. Der fluoreszierende Partikelrand ist ein Nachweis für die Oberflächenbeschichtung poröser Silicapartikel. SR Membranfragmente dringen demnach nicht in die Poren ein, sondern bleiben auf der Partikeloberfläche und beschichten diese, andernfalls würde auch das Partikelvolumen ein Fluoreszenzsignal zeigen.

Die Analyse der Oberflächenbeschichtung erfolgte anschließend durch die vergrößerte, 3 dimensionale Darstellung des Bilderstapels (Abbildung 3.7.b), in der eindeutig gezeigt wurde, daß die Partikeloberfläche homogen beschichtet worden ist. Unter Berücksichtigung einer 110%igen Oberflächenbeschichtung (Tabelle 3.1) kann zusammengefaßt werden, daß die homogene Partikelbeschichtung mit einer Lage SR Membranen erfolgte.

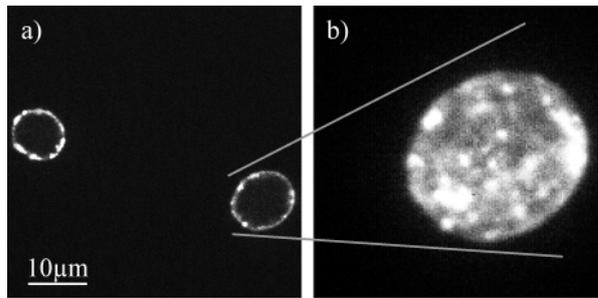


Abbildung 3.7: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von porösen Silicapartikeln ( $\varnothing = 10 \mu\text{m}$ ), beschichtet mit fluoreszenz-membranmarkierten SR Fragmenten. Bild a) zeigt eine Ebene innerhalb des Bilderstapels, das eine Oberflächenbeschichtung beweist. Bild b) zeigt eine vergrößerte, 3 dimensionale Rekonstruktion, die eine homogene Partikelbeschichtung anzeigt.

Anwesenheit und Verteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde auf beschichteten Partikeloberflächen spezifisch mit einem monoklonalen Antikörper untersucht. Der erste Antikörper wurde von einem zweiten polyklonalen, FITC konjugierten Antikörper gebunden und mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Im Abstand von 220 nm wurden in z-Richtung 92 Bilder angefertigt. Abbildung 3.8.a zeigt die mittlere Ebene innerhalb des Partikelvolumens. Der fluoreszierende Partikelrand und die nicht fluoreszierende Partikelfläche bestätigen, wie auch schon Abbildung 3.6 und 3.7, die Oberflächenbeschichtung. Abbildung 3.8.b zeigt eine 3 dimensionale Darstellung, die die homogene Verteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auf der Partikeloberfläche nachweist.

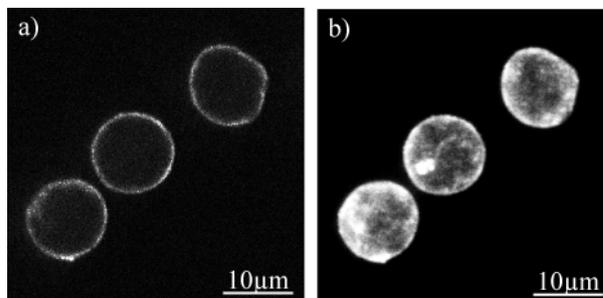


Abbildung 3.8: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von porösen Silicapartikeln ( $\varnothing = 10 \mu\text{m}$ ) beschichtet mit SR Membranen, die anschließend mit einem monoklonalen Antikörper gegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase markiert wurden. Der 1. Antikörper wurde mit einem 2. FITC konjugierten, polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Bild a) zeigt, daß die Porenoberfläche nicht beschichtet wurde. In Bild b) wurde aus 92 Bildern (Abstand 220 nm) eine 3 dimensionale Darstellung zusammengesetzt, aus der eine homogene Oberflächenbeschichtung der Partikel mit  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in SR Membranen hervorgeht.

Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse der Membran- und Antikörpermarkierung (Abbildung 3.7.b und 3.8.b), daß die SR Membranen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der SR Membranen die Partikeloberfläche homogen beschichtet haben. Durch die homogene Oberflächenbeschichtung wurde das

Partikelvolumen von der Umgebung getrennt, wodurch es zu einer Kompartimentierung des Partikelinnenvolumens kam.

### 3.3.5 Proteinzusammensetzung ungebundener und auf Silicapartikel immobilisierter SR Membranfragmente

Die Proteinzusammensetzung in SR Membranen wurde mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Coomassie Färbung (Abbildung 3.9) bestimmt. Dafür wurden ungebundene sowie auf Silicapartikeln immobilisierte SR Membranfragmente in einer SDS-PAGE getrennt. Spur Nr. 1 zeigt den Molekulargewichtsmarker, Spur Nr. 2 die ungebundenen SR Membranfragmente und Spur Nr. 3 die auf Silicapartikeln immobilisierten SR Membranfragmente.

Das Molekulargewicht der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase beträgt 105 kDa (Meissner, Conner et al. 1973). Mit dieser Information konnte die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in beiden Fraktionen mit der Coomassie Färbung in der SDS-PAGE als Hauptbande nachgewiesen werden, was in Übereinstimmung mit Inesi et al. und de Mais et al. ist (Inesi 1972; de Meis and Vianna 1979). Da das Proteinmuster der ungebundenen freien SR Membranen (Spur 2) identisch mit den immobilisierten SR Membranen (Spur 3) ist, kann davon ausgegangen werden, daß sich die gesamte SR Membran auf den Silicapartikeln immobilisieren läßt. Damit wurde gezeigt, daß die Proteinzusammensetzung die gleiche ist und somit, daß die Proteinzusammensetzung der SR Membran während des Aufspreitens nicht gestört wurde.

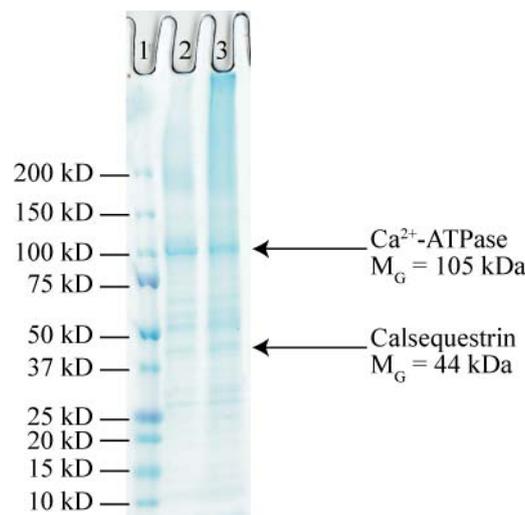


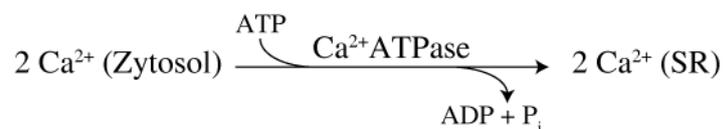
Abbildung 3.9: Proteinzusammensetzung von SR Membranen, dargestellt in SDS-PAGE mit Coomassie Färbung. Spur 1 zeigt den Molekulargewichtsmarker, Spur 2 ungebundene SR Membranen und Spur 3 SR Membranen immobilisiert auf Partikeln. Die Hauptprotein Komponente der SR Membran, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit einem Molekulargewicht von 105kDa, wurde als Hauptbande nachgewiesen.

Bei einem Molekulargewicht von 44 kDa konnte eine Bande nachgewiesen werden, wobei es sich um Calsequestrin handeln könnte. Calsequestrin ist ein membranassoziertes Protein, daß ca. 43 Mol  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pro Mol Protein schwach bindet. Diese hohe Bindekapazität für Calcium führt dazu, daß Calcium innerhalb des SR Lumen aus dem Gleichgewicht entfernt wird, was den Calciumtransport der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erleichtert. Durch die schwache Bindung des Calciums kann dieser bei Mangel leicht abgegeben werden (MacLennan and Wong 1971).

Eine Proteinkonzentrationsbestimmung ist grundsätzlich über die ermittelte Fläche der Banden im SDS PAGE Gel möglich. Da die Bandenintensität der Proteine von der Interaktion des Coomassie mit den aromatischen Aminosäuren der Proteinketten entsteht, werden Proteine entsprechend ihrer Zusammensetzung angefärbt, weshalb eine exakte Proteinkonzentrationsbestimmung nur im Vergleich mit einer Bande des gleichen Proteins mit bekannter Konzentration möglich ist.

### 3.3.6 Aktivitätsbestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in freischwimmenden SR Membranen

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist ein aktiver Transporter (Pumpe), der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entgegen des Konzentrationsgefälles in das Lumen des Sarkoplasmatischen Retikulums pumpt. Dabei werden von 1 mol  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2 Mol  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unter Verbrauch von 1 mol ATP in das Sarkoplasmatische Retikulum transportiert. Bei der Hydrolyse von ATP entstehen jeweils 1 mol ADP und 1 mol Phosphat (MacLennan and Holland 1975; Toyoshima and Inesi 2004). Durch die Bestimmung der Konzentrationszunahme von Phosphat konnte die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in freischwimmenden SR Membranen ermittelt werden.



Eine direkte Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität ist nicht möglich, da die ermittelte Proteinkonzentration in Kapitel 3.3.2 eine Gesamtproteinkonzentration ist (Inesi 1972). Der Anteil der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase innerhalb dieser Gesamtproteinmenge wurde zwischen 50% und 70% beschrieben (Inesi 1972; MacLennan and Holland 1975). Deshalb sind die sich daraus ergebenden  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Konzentrationen zu ungenau, um eine quantitative Aktivität ermitteln zu können. Franzini-Armstrong et al. (Franzini-Armstrong and Ferguson 1985) haben versucht die Konzentrationsbestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zu vereinfachen, in dem sie Proteine innerhalb der SR Membranen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgezählt haben. Sie mußten feststellen, daß diese

Methode ebenfalls stark fehlerbehaftet ist, weil  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Moleküle innerhalb der SR Membran unterschiedlich große Cluster bilden und die Anzahl der ATPasen in den Clustern nur geschätzt werden kann. Je nach Autor wurden zwischen 2000 und 8000  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Moleküle pro  $\mu\text{m}^2$  SR Membranfläche gezählt. Eine Aufreinigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit anschließender Rekonstitution in eine künstlich hergestellte Lipidmembran ist ebenfalls fehlerbehaftet, da in einem solchen System denaturierende Effekte durch die Aufreinigung entstehen sowie die Proteinorientierung innerhalb der SR Membran hergestellt werden muß. Darüber hinaus kann die künstliche Lipidmembran nicht den regulativen Einfluß wie die natürliche Lipidmembran übernehmen.

Ein grundlegendes Problem der Immobilisierung von Membranen auf Festkörperoberflächen besteht in der möglichen Denaturierung transmembraner Proteine durch den Kontakt mit der Festkörperoberfläche (Sackmann 1996; Leckband and Israelachvili 2001; Tanaka and Sackmann 2005). Um die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zu bestimmen, wurde von 100  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein in der Anwesenheit von 120  $\mu\text{mol}$  Calcium die Hydrolyse von 15  $\mu\text{mol}$  ATP nachgewiesen (Abbildung 3.10). 100  $\mu\text{g}$  SR Proteinmengen entsprechen einer SR Membranfläche von  $3,4 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ .

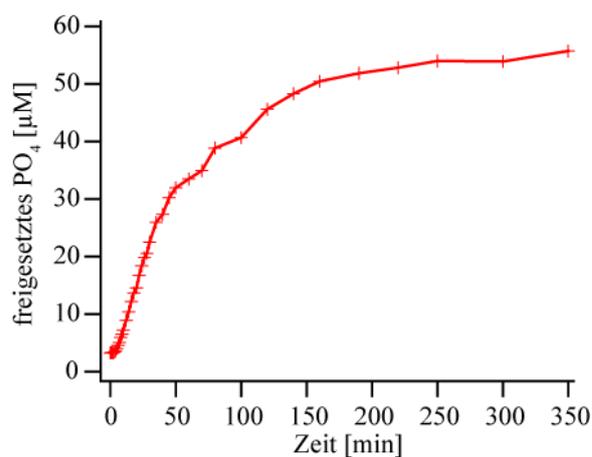


Abbildung 3.10: Die Aktivität von 100  $\mu\text{g}$  ungebundener  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (entspricht  $3,4 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$  SR Membranfläche) wurde bestimmt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase katalysiert den aktiven Stofftransport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Lumen des SR, wobei ATP hydrolytisch zu ADP und Phosphat umgesetzt wird. Über die Konzentrationszunahme des freigesetzten Phosphats wird die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bestimmt.

Vor der Zugabe von ATP bis zum Zeitpunkt  $t = 3$  Minuten wurden im Reaktionsansatz 3  $\mu\text{mol}$  freies Phosphat nachgewiesen. Bei diesem Phosphat muß es sich um eine Verunreinigung handeln, zum einen da im Reaktionsansatz kein ATP vorkommt, das hydrolysiert wurde, zum anderen da die Konzentration des ermittelten Phosphats im zeitlichen Verlauf der ersten 3 Minuten auf einem konstanten Niveau blieb.

Nach  $t = 3$  Minuten wurde dem Ansatz  $15 \mu\text{mol ATP}$  zugegeben. Die Meßkurve stieg langsam an und erreichte bei  $t = 5$  Minuten einen linearen Bereich mit einer Umsatzrate von ca.  $0,7 \mu\text{mol freigesetztem Phosphat pro Minute und } 100 \mu\text{g Gesamtprotein}$ . In dieser linearen Aktivitätsphase lagen die Edukte im Überschuß vor, weshalb die  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  mit gleicher, maximaler Umsatzrate arbeiten konnte.

Ab  $t = 40$  Minuten verlangsamte sich die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  stetig. Eine Abnahme der Enzymaktivität ab  $t = 40$  Minuten deutete auf eine verminderte Konzentration der Edukte hin. Durch die verminderten Konzentrationen kam es zu einer Diffusionslimitierung der Edukte. Hierfür sprach die stetig verminderte, aber noch vorhandene Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ . Zum Zeitpunkt  $t = 250$  Minuten war die Aktivität Null mit einer konstanten Phosphatkonzentration von ca.  $54 \mu\text{mol freigesetztem Phosphat pro Minute und } 100 \mu\text{g Gesamtprotein}$ . Das Ende der  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  Aktivität kann verschiedene Ursachen haben: So kann z.B. jegliches ATP aufgebraucht sein oder die  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  Aktivität durch Produkthemmung unterbunden worden sein. Eine weitere Möglichkeit bestand in der Veränderung des pH-Wertes durch das freigesetzte Phosphat. Phosphat ist ein mehrfach negativ geladenes Ion, das den pH-Wert zu niedrigen Werten verschiebt. Da der pH-Wert nicht auf den optimalen Wert von 7,4 nachreguliert wurde, bestand die Möglichkeit, daß der Reaktionsansatz durch das freigesetzte Phosphat so stark angesäuert wurde, daß die  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  inhibiert wurde.

### **3.3.7 Aktivitätsbestimmung der $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ auf Silicapartikeln**

Die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ , immobilisiert auf Silicapartikeln, wurde anschließend in Puffer ermittelt, wobei die Partikel durch Mischen in einem Überkopfrührer in Dispersion gehalten wurden. Dafür wurden Silicapartikel analog zu Kapitel 3.2.5 beschichtet. Die Partikelbeschichtung, siehe Kapitel 3.3.3, zeigte, daß die eingesetzten SR Fragmente die Partikeloberfläche mit einer Lage SR Membranen beschichteten.

Es wurden  $120 \text{ mg}$  Partikel mit  $1,4 \mu\text{l SR Membranfragmenten}$  (Lipidkonzentration  $11,7 \text{ mg/ml}$ ) beschichtet. Mit dieser beschichteten Partikelmenge wurde die enzymatische Aktivität ( $\circ$ ) in Gegenwart von Calcium und ATP bestimmt (Abbildung 3.11). In einem weiteren Versuch wurde durch Entfernen des Calciums durch  $10 \text{ mM EDTA}$  die Calcium-Abhängigkeit der Enzymaktivität ( $\Delta$ ) während der linearen Phase gezeigt.

Nach Bestimmung der Hintergrundaktivität von ca.  $0 \mu\text{mol freigesetztem Phosphat}$  zum Zeitpunkt  $t = 5$  Minuten wurden ATP und Calcium zu den Partikeln zugegeben und in 5 Minuten Abständen jeweils  $2 \text{ mg}$  Partikel für die Aktivitätsbestimmung entnommen. Die entnommenen Proben wurden

zu dem stark sauren Nachweisreagenz ( $\text{pH} = 1$ ) nach Kallner zugegeben. Dadurch wurde die Proteinaktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase umgehend beendet.

Aus der Aktivitätskurve der immobilisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase folgt, daß keine Hintergrundaktivität beziehungsweise Verunreinigung ( $\sim 0 \mu\text{mol}$  freigesetztes Phosphat) bestand. Zum Zeitpunkt  $t = 5$  Minuten wurden dem Ansatz  $120 \mu\text{mol}$  Calcium und  $15 \mu\text{mol}$  ATP zugegeben. Verzögerungsfrei setzte die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität mit einer Umsatzrate von  $1,3 \mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat pro Minute ein und behielt diese Aktivität bis  $t = 35$  Minuten (lineare Phase) bei. Danach verlangsamte sich die Umsatzrate stetig, bis sie zum Zeitpunkt  $t = 160$  Minuten fast zum Erliegen kam.

Die konstante Umsatzrate in der linearen Phase kann durch den Überschuß an Calcium und ATP erklärt werden. Nach ca. 35 Minuten verlangsamte sich die Umsatzrate. Dies kann einerseits damit erklärt werden, daß ATP verbraucht wurde, andererseits damit, daß durch die Hydrolyse von ATP ADP und Phosphat freigesetzt wurden und deren gestiegene Konzentrationen zu einer Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase führen können. Darüber hinaus geht mit der Konzentrationszunahme von neu gebildetem Phosphat eine Verschiebung des pH-Wertes einher, wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nicht mehr in ihrem pH-Optimum vorlag und somit inhibiert wurde.

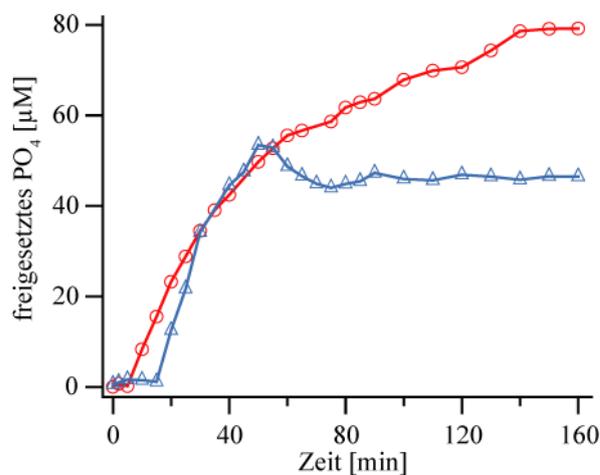


Abbildung 3.11: Die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auf Silicapartikeln. Dargestellt ist die Proteinaktivität von  $29 \mu\text{g}$  SR Lipidmembran pro Ansatz. Die Aktivität wurde mit der Zugabe von ATP gestartet. Für die Bestimmung der Aktivitätskurve (○) wurde ATP zum Zeitpunkt  $t = 5$  min zugegeben und nach 120 Minuten festgestellt, daß sich die Phosphatkonzentration nicht mehr ändert. Zur Darstellung der Calcium-Abhängigkeit der Enzymaktivität wurde in einer zweiten Meßreihe nach 14 Minuten durch Zugabe von EDTA Calcium gebunden (△), wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität und somit die Neubildung von Phosphat beendet wurde.

Ein zweites Experiment wurde zum Zeitpunkt  $t = 14$  Minuten gestartet. Das Ziel dieses Experimentes war es, die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der linearen Phase durch die Zugabe von EDTA zu inhibieren und dadurch die Spezifität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase für Calcium nachzuweisen. Zum Zeitpunkt  $t = 15$  Minuten wurden dem Ansatz  $120 \mu\text{mol}$  Calcium und  $15 \mu\text{mol}$  ATP zugegeben.

Auch in diesem Experiment setzte die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität sofort ein. In der linearen Phase wurde eine Umsatzrate von 1,5  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat pro Minute erreicht, was gut mit dem ersten Teilexperiment übereinstimmt. Zum Zeitpunkt  $t = 50$  Minuten wurde dem Ansatz 10 mmole EDTA zugegeben, um alle freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abzufangen. Dadurch wurde die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase beendet, was dadurch gezeigt wurde, daß keine Zunahme neugebildeten Phosphats nachgewiesen wurde und das System auf einem konstanten Phosphat-Konzentrationsniveau blieb. Nach der Inhibierung der Aktivität  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde also ausschließlich das vorhandene Phosphat aus der linearen Phase (ca. 25  $\mu\text{mol}$  Phosphat) über eine weitere Zeitspanne von 100 Minuten bestimmt.

### **3.3.8 Proteinaktivität immobilisierter $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen auf Silicapartikeln in einer Chromatographiesäule**

Im vorherigen Versuch wurde gezeigt, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase immobilisiert auf Silicapartikeln ihre Aktivität beibehalten hat. Zudem wurde durch die Kontrolle der Partikelbeschichtung mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop ermittelt, daß SR Membranen die Partikeloberfläche homogen beschichtet hatten und diese Beschichtung für mindestens eine Woche stabil war. Diese Ergebnisse ermöglichten es, die beschichteten Partikel in eine kommerzielle Chromatographiesäule (Abbildung 3.12) zu füllen, so daß die verschiedenen Betriebsweisen einer Chromatographiesäule genutzt werden konnten:

1. Membranen werden auf der Partikeloberfläche stabilisiert
2. Partikel werden in der Säulen zurückgehalten
3. Säulen können dicht gepackt werden
4. einfacher Puffertausch und damit einfache Änderung der Reaktionsbedingungen
5. einfache Abtrennung des Eluats und damit der Produkte
6. Reaktionsbedingungen bleiben konstant, keine Produkthemmung ( $\text{H}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ )
7. hoher Stoffumsatz durch verbessertes Oberflächen-Volumen Verhältnis

Durch das „Zurückhalten“ der Partikel in der Chromatographiesäule können die Reaktionsbedingungen einfach und schnell verändert werden und somit das eluierte Phosphat außerhalb der Säule in „Echtzeit“ bestimmt werden. Für die Säulenchromatographie wurden 1,8 ml Partikel mit SR Membranen beschichtet. Die Flußrate des Puffers wurde auf 0,05 ml/min eingestellt und alle 10 Minuten wurden Fraktionen von je 500  $\mu\text{l}$  gesammelt.

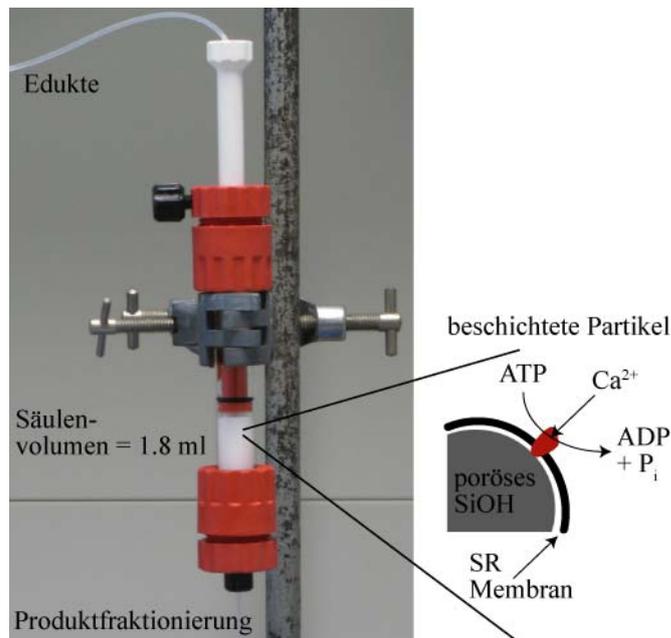


Abbildung 3.12: Photo einer Chromatographiesäule gefüllt mit SR Membranen beschichteten Silicapartikeln ( $\text{\O} = 10\mu\text{m}$ ). Das Säulenvolumen beträgt 1,8 ml. Die beschichteten Partikel wurden mit einer Flußrate von 0,05 ml / min für 10 min mit variierenden Puffern gespült und Fraktionen von je 500  $\mu\text{l}$  gesammelt. Puffer wurde über eine Präzisionspumpe durch die Säule gepumpt. Die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase kann gezielt durch den Tausch der Pufferkonditionen gesteuert werden. Die Enzymaktivität wurde durch das freigesetzte Phosphat bestimmt.

### 3.3.9 Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität in einer gepackten Säule

Zu Beginn wurden folgende Aspekte in einem Telexperiment geprüft: Erstens, ob die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in einer gepackten Säule eine Hintergrundaktivität (graue Flächen) aufweist. Und zweitens, ob durch Zugabe von Calcium und ATP die Aktivität (helle Flächen) der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gesteuert werden konnte (Abbildung 3.13).

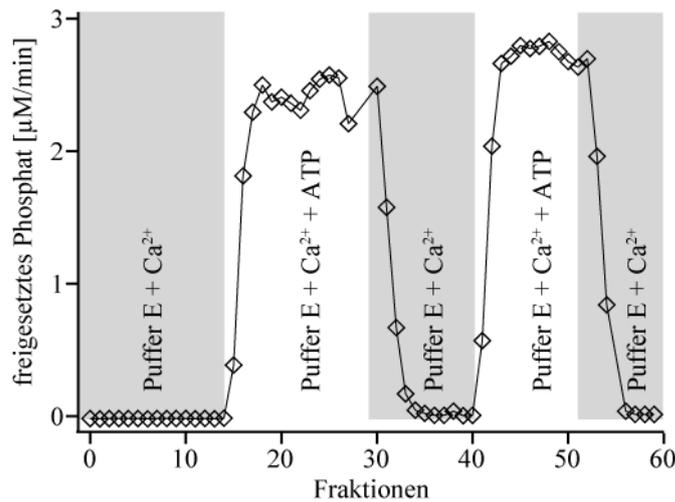


Abbildung 3.13: Reversibles „Ein- und Ausschalten“ der Ca<sup>2+</sup>-ATPase Aktivität durch Puffertausch. Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase liegt immobilisiert auf porösen Silicapartikeln in ihrer natürlichen Umgebung der SR Membranen vor. Alle 10 min wurden Fraktionen gesammelt und das katalytisch freigesetzte Phosphat nach der Methode von Kallner ermittelt.

Alle Graphen repräsentieren die Konzentration an freiem Phosphat. Für jeden Meßpunkt wurde das „void volume“ berücksichtigt, bei dem es sich um das Gesamtvolumen der Säule minus des Partikelvolumens handelt.

Aus den Kurvenverläufen geht hervor, daß Ca<sup>2+</sup>-ATPase immobilisiert auf Silicapartikeln ohne Calcium und ohne ATP keine Aktivität (0 µmol freigesetztes Phosphat) aufwies. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß keine Phosphatverunreinigung vorlag. Durch Zugabe von Calcium und ATP erreichte die Ca<sup>2+</sup>-ATPase nach ca. 3 Fraktionen (Volumen = 1,5 ml) eine stabile Aktivität von ca. 2,5 µmol freigesetztem Phosphat pro Minute. Durch anschließendes Entfernen von Calcium und von ATP aus dem Puffer wurde nach der gleichen Zeit von 3 Fraktionen die Aktivität der Ca<sup>2+</sup>-ATPase auf Null Aktivität reguliert, was sich darin zeigte, daß im Eluat 0 µmol freigesetztes Phosphat nachgewiesen wurde. Die reversible Steuerung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase Aktivität wurde mehrmals wiederholt, wobei immer entweder keine Aktivität, also kein freigesetztes Phosphat, oder ein Aktivitätsniveau von jeweils ca. 2,5 bis 2,7 µmol freigesetztem Phosphat pro Minute ermittelt wurde.

Im nächsten Telexperiment wurde die Aktivität der Ca<sup>2+</sup>-ATPase in Gegenwart von ATP, aber in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen bestimmt (Abbildung 3.14). Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase zeigte ohne Calcium und ohne ATP keine Aktivität beziehungsweise Phosphatverunreinigung. Enthielt der Puffer ATP, aber kein Calcium, wurde eine Aktivität von 1,0 µmol beziehungsweise 1,3 µmol Phosphat pro Minute katalytisch freigesetzt. In Gegenwart von Calcium und ATP erreichte die Ca<sup>2+</sup>-ATPase Aktivität den in den vorherigen Telexperimenten ermittelten Wert von ca. 2,5 µmol freigesetztem Phosphat pro Minute.

Eine mögliche Erklärung für die Hydrolyse von ATP in Abwesenheit von Calcium kann mit der Anwesenheit von Calsequestrin (Molekulargewicht 44 kDa) erklärt werden, da Calsequestrin in der SDS PAGE der SR Membran (Abbildung 3.9) bei 44 kDa eine deutliche Bande zeigte. Die Funktion des Calsequestrins besteht darin, Calcium innerhalb des Lumen des SR zu binden und somit Calcium aus dem Gleichgewicht zwischen der Calciumkonzentration innerhalb und außerhalb des SR zu entfernen. Folglich muß die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gegen einen geringeren Konzentrationsgradienten arbeiten. Da 1 Mol Calsequestrin bis zu 43 Mol Calcium mit geringerer Affinität binden kann, kann Calsequestrin auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den Reaktionsansatz abgeben. Dies kann dazu führen, daß in Anwesenheit von ATP die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auch ohne Zugabe von Calcium aktiviert werden kann (MacLennan and Wong 1971).

Zudem haben Inesi et al. sowie Yasuoka et al. in ihren Untersuchungen gezeigt, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auch in Gegenwart anderer divalenter Ionen wie  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen eine ATP Hydrolyse Aktivität aufweisen kann. Dies ist eine weitere Erklärung für die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Abwesenheit von Calcium (Inesi 1972; Yasuoka, Kawakita et al. 1982; Toyoshima and Inesi 2004).

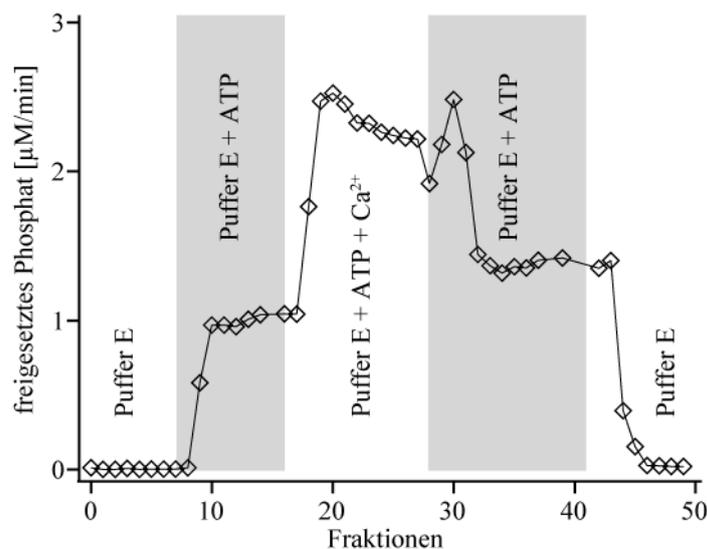


Abbildung 3.14: Aktivitätsmessung in der Chromatographiesäule. Die beschichteten Partikel wurden zuerst in Puffer ohne Calcium und ATP gespült, wobei keine Aktivität oder etwaige Phosphatverunreinigung ermittelt wurde. Anschließend wurden die beschichteten Partikel mit Puffer und ATP gespült, wobei eine Aktivität von ca. 1,2  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat pro Minute ermittelt wurde. Die Zugabe von ATP und Calcium führte zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität mit dem in vorherigen Experimenten ermittelten Wert von ca. 2,5  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat pro Minute.

### 3.3.10 Zusammenfassung der Aktivitätsbestimmungen

Um die in den Säulenexperimenten ermittelten Aktivitäten der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte der Plateaus und deren Abweichungen bestimmt (Abbildung 3.15).

Die Zusammenfassung der Aktivitäten zeigte, daß ohne Calcium und ohne ATP die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase keine Aktivität aufwies. Es wurde vernachlässigbar eine minimale Aktivität von 0,01  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat ermittelt. Da sich dieser Wert jedoch im Bereich der Meßgenauigkeit befindet, kann er vernachlässigt werden.

In Anwesenheit von Calcium, aber ohne ATP, wurde eine geringfügige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität von 0,17  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat ermittelt. Nach Zugabe von Calcium und ATP stieg die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität signifikant an auf einen Wert von 2,5  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat mit einer Abweichung von ca. 0,2  $\mu\text{mol}$ . Diese Aktivität beweist, daß Aufreinigung und Immobilisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase auf porösen Festkörperoberflächen das Protein nicht inhibiert oder gar denaturiert haben.

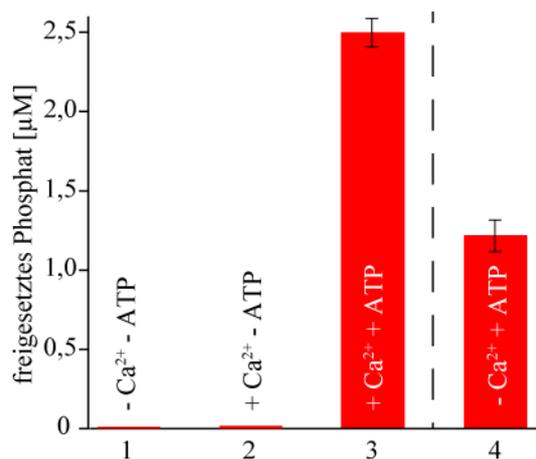


Abbildung 3.15: Konzentrationen von katalytisch freigesetztem Phosphat in verschiedenen Puffern: 1) Puffer E, 2) Puffer E mit Calcium ohne ATP, 3) Puffer E mit Calcium und ATP, 4) Puffer E mit ATP ohne Calcium. Die Datensätze 1 - 3 zeigen, daß ATP essentiell für die enzymatische Reaktion ist. Das Kontrollexperiment 4 ist eine Negativkontrolle, die die Spezifität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase für Calcium und ATP beweist.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität wurde in einem weiteren Kontrollexperiment in Gegenwart von ATP, aber ohne Calcium, durchgeführt. Dabei wurde eine Aktivität von 1,2  $\mu\text{mol}$  mit einer Abweichung von 0,2  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat ermittelt. Diese signifikante Enzymaktivität von 50% der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität kann sich in Gegenwart von divalenten Ionen ergeben, die als Verunreinigung im Puffer vorlagen. In der präparierten SR Membran befand sich zudem Calsequestrin, das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den Puffer abgeben kann und somit eine Calciumquelle darstellt (MacLennan and Wong 1971). Eine Autohydrolyse von ATP kann ausgeschlossen werden, da die

Autohydrolyse von 15  $\mu\text{mol}$  ATP über 2 Stunden mit Null  $\mu\text{mol}$  freigesetztem Phosphat bestimmt wurde.

### 3.4 Resumée

SR Membranen wurden aufgereinigt, wobei das Muskelgewebe in einem Homgenisator vollständig zerstört wurde. Dabei entstanden SR Membranfragmente, die keine einheitliche Größe und Form besaßen. Über eine Phosphatanalyse wurde anschließend die Membranfläche der SR Membranfragmente ermittelt. Somit konnten die Oberflächenverhältnisse von Partikeln und SR Membranen gleich gehalten werden, um eine einlagige Partikelbeschichtung zu erzielen.

Eine homogene Beschichtung poröser Partikel wurde mit membranmarkierten sowie antikörpermarkierten SR Membranen nachgewiesen. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnte gezeigt werden, daß keine Porenbeschichtung stattfand. Die SDS Analyse betätigte, daß während der Immobilisierung keine Veränderungen der Proteinzusammensetzung der SR Membran erfolgten. Zudem konnte gezeigt werden, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase als Hauptkomponente vorhanden war.

Die Aktivitätsbestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in SR Membranfragmenten erfolgte in einem ersten Schritt in Puffer dispergiert. Es wurde ermittelt, daß ohne Calcium und ohne ATP keine Aktivität vorlag. Durch Zugabe von Calcium und ATP konnte die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gestartet werden und endete nach dem Verbrauch von ATP, Calcium oder durch Produkthemmung.

Anschließend wurde die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase immobilisiert auf porösen Partikeln untersucht. Auch auf den Partikeln wurde keine Hintergrundaktivität ermittelt. Bei vorhandenem Calcium und ATP in der Reaktionslösung wurde eine Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ermittelt. In einem weiterführenden Experiment konnte die Calcium-Spezifität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nachgewiesen werden, indem durch die Zugabe von EDTA alle  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abgefangen wurden.

Da die SR-Membran auf Partikeloberflächen stabilisiert wurde und die immobilisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ihre Aktivität beibehielt, wurden die beschichteten Partikel in eine Standard-Chromatographiesäule gefüllt, um eine einfache Abtrennung der Produkte zu erzielen und eine schnelle Änderung der Reaktionsbedingungen durch Pufferwechsel herstellen zu können. Durch Wechsel des Puffers zu einem Calcium- und ATP-haltigen konnte die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität gestartet werden, die beim Wechsel des Puffers zu einem ohne Calcium und ATP wieder gestoppt wurde. Durch mehrmaligen Pufferwechsel konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ein- und ausgeschaltet werden kann. Weiterführend konnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität in Abwesenheit von Calcium, aber Anwesenheit von ATP, ermittelt werden. Diese Aktivität kann durch den Transport anderer

divalenter Ionen oder durch Calsequestrin verursacht werden. Wie in der SDS PAGE gezeigt, kommt Calsequestrin ebenfalls in der SR Membran vor und bindet mit schwacher Affinität Calcium, das anschließend wieder abgegeben werden kann.

## 4. Thesen zur Arbeit

Die technische Ausnutzung von Proteinfunktionen erfordert die homogene, native und gerichtete Immobilisierung von Proteinen auf Festkörperoberflächen.

Eine homogene Oberflächenbeschichtung auf planaren Oberflächen erfolgt durch die Entkopplung der Membran von der Festkörperoberfläche durch Einbringen von hydrophilen, ultradünnen biokompatiblen Filmen. Die biokompatiblen Zwischenschichten verhindern einen möglichen Kontakt zwischen Membranprotein und der Festkörperoberfläche, wodurch eine native Immobilisierung ermöglicht wird.

Die gerichtete Immobilisierung wurde anhand der Aufspreitmeechanismen von künstlichen, asymmetrischen Proteoliposomenmembranen und von natürlichen, asymmetrischen Ghostzellmembranen untersucht. Das Ergebnis zeigte eine Abhängigkeit der Aufspreitorientierung vom Membrandurchmesser. Immobilisierte Proteoliposomen ( $\varnothing = 60 \text{ nm}$ ) präsentieren ihre Membranaußenseite zum Puffer hin, wohingegen immobilisierte Ghostzellen ( $\varnothing = 4 \text{ }\mu\text{m}$ ) ihre Membraninnenseite präsentieren.

Die unterschiedlichen Aufspreitmeechanismen erfolgen eindeutig, was den gezielten Einsatz der Proteindomänen der Membraninnenseite wie Membranaußenseite ermöglicht.

Die native und streßfreie Immobilisierung von Membranen auf einer Festkörperoberfläche erhöht einerseits deren mechanische Stabilität, andererseits auch deren Handhabung.

Durch den Einsatz von beschichteten, porösen Partikeln kann die immobilisierte Membranfläche erhöht werden, wodurch eine Vermehrung der Proteinfunktionen erzielt wird.

Die Partikelbeschichtung von Silicapartikeln mit Ghostzellen besitzt eine Kinetik, die von der Partikelgröße abhängig ist. Mit zunehmender Partikelgröße nimmt die Beschichtungskinetik ab.

Die Partikelbeschichtung resultiert in einer homogenen Beschichtung und vereinfacht die Separation der Partikel von den ungebundenen Membranen, da die Partikel eine höhere Dichte aufweisen und sich somit im Gegensatz zu ungebundenen Membranen absetzen.

Zudem benötigen poröse Partikel für eine homogene und native Beschichtung keine Zwischenlagen aus biokompatiblen, hydrophilen Filmen, was deren Herstellung vereinfacht und es ermöglicht, sie aus dem Entwicklungsmaßstab in den Labormaßstab einfacher zu überführen.

Weiterhin bieten poröse Partikeloberflächen im Gegensatz zu planaren dichten Festkörperoberflächen den Vorteil, daß die Partikel die Membran stabilisieren und daß das Porenvolumen als Reservoir dienen kann, so daß der Stofftransport von beiden Membranseiten aufrechterhalten werden kann.

Auch auf den Partikeloberflächen behalten die Ghostzellen ihren Aufspreitmeehanismus bei, indem sie ihre Membraninnenseite auf der Partikeloberfläche präsentieren.

SR Membranfragmente wurden aus Kaninchenhinterläufen aufgereinigt. Sie zeigen eine enzymatische Aktivität in Puffer sowie immobilisiert auf porösen Silicapartikeln. Die porösen Silicapartikel wirken stabilisierend auf die Membran und ermöglichen deren Einsatz in einer Standard-Chromatographiesäule, die eine vereinfachte Produkttrennung sowie eine vereinfachte Änderung der Reaktionsbedingungen innerhalb der Säule zuläßt.

## Abkürzungen

Abkürzung	Name
ADP	Adenosindiphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BET	Brunauer Emmett Teller
BLM	Black Lipid Membran
C	Carrier
CCD	charge-coupled device
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CMC	critical micelle concentration
(k)Da	(kilo) Dalton
D <sub>2</sub> O	schweres Wasser
DDT	1, 1'-(2, 2, 2-trichloro-ethyUdene)bis(4-chlorobenzene)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMP	Dodekamolybdatphosphorsäure
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EREM	Environmental Rasterelektronenmikroskopie
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FWHM	Halbwertsbreite, Full Width at Half Maximum
GPC	Gelpermeationschromatographie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
ILL	Institut Laue Langevin
ISO	in side out
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LB-Transfer	Langmuir-Blodgett Transfers
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MW	molecular weight
NBD-PC	1-Oleoyl-2-[12-[7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl] amino] dodecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniaklösung
ODTMS	Octadecyltrimethylsilan
PDB	Protein Data Bank
P <sub>i</sub>	Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulphonyl Fluorid
RCA	Radio Corporation of America
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RKM	Rasterkraftmikroskopie
RKM	Rasterkraftmikroskopie
RMS	root mean square
RPM	Rotationen pro Minute
RSA	Rinderserum Albumin
RSO	right side out
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese
Si	Silizium
SiO <sub>x</sub>	Siliziumoxid
SLD-Profil	Streulängendichte-Profil
SOPC	1-Stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAMRA-SE	5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin Succinimidyl Ester
TDOC	Taurodexychlät oder 2-([3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-24-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-yl] amino) ethanesulfonsäure
Texas-Red DHPE	1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphoethanolamin Triethylammonium Salz
TMSZ	Trimethylsilylzellulose

TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
Triton RX-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)cyclohexyl-polyethylene glycol
Triton X-100	alpha-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl]-omega- hydroxypoly (oxy-1,2-ethanediyl)
unhydro. ATP	unhydrolysierbares ATP, Adenosin 5'-(thio) Triphosphat Tetralithiumsalz

## Literaturverzeichnis

- Abelès, F. (1950). "La Théorie Générale des Couches Minces." Journal de Physique et le Radium **11**(7): 307-309.
- Alberts, B. (2003). "Molekularbiologie der Zelle." Wiley-VCH(3).
- Albrecht, O., H. Gruler, et al. (1978). "Polymorphism of Phospholipid Monolayers." Journal de Physique **39**(3): 301-313.
- Altmann, H., E. Fürstenau, et al. (1971). "Photometrische Bestimmung kleiner Phosphatmengen mit Malachitgrün." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **256**(4): 274-276.
- Baksh, M. M., M. Jaros, et al. (2004). "Detection of Molecular Interactions at Membrane Surfaces Through Colloid Phase Transitions." Nature **427**(6970): 139-141.
- Bayerl, T. M. and M. Bloom (1990). "Physical Properties of Single Phospholipid Bilayers Adsorbed to micro Glass Beads. A New Vesicular Model System Studied by Magnetic Resonance." Biophysical Journal **58**: 357-362.
- Binnig, G., C. F. Quate, et al. (1986). "Atomic Force Microscope." Physical Review Letters **56**(9): 930.
- Bougis, P., H. Rochat, et al. (1981). "Penetration of Phospholipid Monolayers by Cardiotoxins." Biochemistry **20**(17): 4915-4920.
- Boyer, P. D. (1997). "The ATP Synthase - A Splendid Molecular Machine." Annual Review of Biochemistry **66**(1): 717-749.
- Bradford, M. M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.
- Brian, A. A. and H. M. McConnell (1984). "Allogeneic Stimulation of Cytotoxic T Cells by Supported Planar Membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences **81**(19): 6159-6163.
- Brunauer, S., P. H. Emmett, et al. (1938). "Adsorption of Gases in Multimolecular Layers." Journal of the American Chemical Society **60**(2): 309-319.
- Cevc, G. and D. Marsh (1987). "Phospholipid Bilayers." Wiley - Interscience Publication.
- Chan, K.-M., D. Delfert, et al. (1986). "A Direct Colorimetric Assay for Ca<sup>2+</sup>-Stimulated ATPase Activity." Analytical Biochemistry **157**(2): 375-380.
- Chapman, D. (1984). "Biological Membranes." Academic Press.
- Chiruvolu, S., S. Walker, et al. (1994). "Higher Order Self-Assembly of Vesicles by Site-Specific Binding." Science **264**(5166): 1753-1756.
- Chung, Y. S. and M. R. J. Salton (1988). "Purification and Properties of the Latent F<sub>0</sub>f<sub>1</sub>-ATPase from *Micrococcus-Lysodeikticus*." Microbios **54**(220-21): 187-205.
- Comper, W. D. (1996). "Extracellular Matrix." Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Contino, P. B., C. A. Hasselbacher, et al. (1994). "Use of an Oriented Transmembrane Protein to Probe the Assembly of a Supported Phospholipid Bilayer." Biophysical Journal **67**: 1113-1116.
- Cubitt, R. and G. Fragneto (2002). "D17: The New Reflectometer at the ILL." Applied Physics A: Materials Science & Processing **74**(0): s329-s331.
- Daley, D. O., M. Rapp, et al. (2005). "Global Topology Analysis of the Escherichia coli Inner Membrane Proteome." Science **308**(5726): 1321-1323.
- Danilatos, G. D. (1993). "Introduction to the ESEM instrument." Microscopy Research and Technique **25**(5-6): 354-361.

- de Meis, L. and W. Hasselbach (1971). "Acetyl Phosphate as Substrate for Ca<sup>2+</sup> Uptake in Skeletal Muscle Microsomes." Journal of Biological Chemistry **246**(15): 4759-4763.
- de Meis, L. and A. L. Vianna (1979). "Energy Interconversion by the Ca<sup>2+</sup>-Dependent ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum." Annual Review of Biochemistry **48**(1): 275-292.
- Deisinger, B., T. Nawroth, et al. (1993). "Purification of ATP Synthase from Beef-Heart Mitochondria (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) and Coreconstitution with Monomeric Bacteriorhodopsin into Liposomes Capable of Light-Driven ATP Synthesis." European Journal of Biochemistry **218**(2): 377-383.
- Elender, G. and E. Sackmann (1994). "Wetting and Dewetting of Si/SiO<sub>2</sub>-Wafers by Free and Lipidmonolayer Covered Aqueous Solutions Under Controlled Humidity." Journal de Physique II **4**: 455-479.
- Engel, A., C. A. Schoenenberger, et al. (1997). "High Resolution Imaging of Native Biological Sample Surfaces Using Scanning Probe Microscopy." Current Opinion in Structural Biology **7**(2): 279-284.
- Fiske, C. H. and Y. Subbarow (1925). "The Colorimetric Determination of Phosphorus." Journal of Biological Chemistry **66**(2): 375-400.
- Franzini-Armstrong, C. and D. G. Ferguson (1985). "Density and Disposition of Calcium ATPase in Sarcoplasmic Reticulum Membrane as Determined by Shadowing Techniques." Biophysical Journal **48**(4): 607-616.
- Freisleben, H.-J., K. Zwicker, et al. (1995). "Reconstitution of Bacteriorhodopsin and ATP Synthase from *Micrococcus luteus* into Liposomes of the Purified Main Tetraether Lipid from *Thermoplasma acidophilum*: Proton Conductance and Light-Driven ATP Synthesis." Chemistry and Physics of Lipids **78**(2): 137-147.
- Gennis, R. B. (1989). "Biomembranes, Molecular Structure and Function." Springer-Verlag.
- Goennenwein, S., M. Tanaka, et al. (2003). "Functional Incorporation of Integrins into Solid Supported Membranes on Ultrathin Films of Cellulose: Impact on Adhesion." Biophysical Journal **85**: 846-855.
- Gorter, E. and F. Grendel (1925). "On Bimolecular Layers Of Lipoids On The Chromocytes Of The Blood." Journal of Experimental Medicine **41**(4): 439-443.
- Groves, J. T. and M. L. Dustin (2003). "Supported Planar Bilayers in Studies on Immune Cell Adhesion and Communication." Journal of Immunological Methods **278**(1-2): 19-32.
- Gruber, G. (2000). "Structural and Functional Features of the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **32**(4): 341-346.
- Gruber, G., J. Godovaczimmermann, et al. (1994). "ATP Synthesis and Hydrolysis of the ATP-Synthase from *Micrococcus luteus* Regulated by an Inhibitor Subunit and Membrane Energization." Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1186**(1-2): 43-51.
- Guidotti, G. (1972). "Membrane Proteins." Annual Review of Biochemistry **41**(1): 731-752.
- Harris, J. M. (1992). "Poly (ethyleneglycol) Chemistry." Plenum Press New York.
- Haverstick, D. M. and M. Glaser (1987). "Visualization of Ca<sup>2+</sup>-Induced Phospholipid Domains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**(13): 4475-4479.
- Hillebrandt, H., M. Tanaka, et al. (2002). "A Novel Membrane Charge Sensor: Sensitive Detection of Surface Charge at Polymer / Lipid Composite Films on Indium-Tin-Oxide Electrodes." Journal of Physical Chemistry B **106**: 477-488.
- Hillebrandt, H., G. Wiegand, et al. (1999). "High Electric Resistance Polymer / Lipid Composite Films on Indium-Tin-Oxide Electrodes." Langmuir **15**(24): 8451-8459.
- Hope, M. J., M. B. Bally, et al. (1985). "Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure." Biochimica et Biophysica Acta **812**: 55-65.
- Hoppe, J. and W. Sebald (1984). "The Proton Conducting F<sub>0</sub>-Part of Bacterial ATP Synthases." Biochimica Et Biophysica Acta **768**(1): 1-27.
- Horigome, T. and H. Sugano (1983). "A Rapid Method for Removal of Detergents from Protein Solution." Analytical Biochemistry **130**(2): 393-396.

- Houchin, D. N., J. I. Munn, et al. (1958). "A Method for the Measurement of Red Cell Dimensions and Calculation of Mean Corpuscular Volume and Surface Area." Blood **13**(12): 1185-1191.
- Hu, B., D. Finsinger, et al. (2000). "Intervesicle Cross-Linking with Integrin  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3) and Cyclic-RGD-Lipopeptide. A Model of Cell-Adhesion Processes." Biochemistry **39**(40): 12284-12294.
- Inesi, G. (1972). "Active Transport of Calcium ION in Sarcoplasmic Membranes." Annual Review of Biophysics and Bioengineering **1**(1): 191-210.
- Inesi, G. (2003). "Active Transport of Calcium ION in Sarcoplasmic Membranes." Annual Review of Biophysics and Bioengineering **1**(1): 191-210.
- Jacobson, B. S. and D. Branton (1976). "Plasma Membrane: Rapid Isolation and Exposure of the Cytoplasmic Surface by Use of Positively Charged Beads." Science **195**: 302-304.
- Jacobson, K. (1983). "Lateral Diffusion in Membranes." Cell Motility and the Cytoskeleton **3**(5): 367-373.
- Johnson, S. J., T. M. Bayerl, et al. (1991). "Structure of an Adsorbed Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayer Measured with Specular Reflection of Neutrons." Biophysical Journal **59**(2): 289-294.
- Kalb, E., S. Frey, et al. (1992). "Formation of Supported Planar Bilayers by Fusion of Vesicles to Supported Phospholipid Monolayers." Biochimica Et Biophysica Acta **1103**(2): 307-316.
- Kalish, D. I., C. M. Cohen, et al. (1978). "Membrane Isolation on Polylysine-Coated Glass Beads. Asymmetry of Bound Membrane." Biochimica et Biophysica Acta **506**: 97-110.
- Kallner, A. (1975). "Determination of Phosphate in Serum and Urine by a Single Step Malachite-Green Method." Clinica Chimica Acta **59**(1): 35-39.
- Kansy, M., F. Senner, et al. (1998). "Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes." Journal of Medicinal Chemistry **41**(7): 1007-1010.
- Kaufmann, S. and M. Tanaka (2003). "Cell Adhesion onto Highly Curved Surfaces: One-Step Immobilization of Human Erythrocyte Membranes on Silica Beads." ChemPhysChem **4**: 699-704.
- Kaufmann, S., I. M. Weiss, et al. (2007). "Quantitative in vitro Biopolymerization to Chitin in Native Chitosomal Membranes Supported by Silica Microparticles." Journal of the American Chemical Society **129**(35): 10807-10813.
- Kawai, T., K. Saito, et al. (2003). "Protein Binding to Polymer Brush, Based on Ion-Exchange, Hydrophobic, and Affinity Interactions." Journal of Chromatography B **790**(1-2): 131-142.
- Keller, C. A. and B. Kasemo (1998). "Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance." Biophysical Journal **75**(3): 1397-1402.
- Keller, M., J. Schilling, et al. (2001). "Oscillatory Magnetic Bead Rheometer for Complex Fluid Microrheometry." Review of Scientific Instruments **72**(9): 3626-3634.
- Kern, W. and D. A. Puotinen (1970). "Cleaning Solutions Based on Hydrogen Peroxide for Use in Silicon Semiconductor Technology." RCA Reviews **31**: 187-206.
- Korgel, B. A., J. H. van Zanten, et al. (1998). "Vesicle Size Distributions Measured by Flow Field-Flow Fractionation Coupled with Multiangle Light Scattering." Biophysical Journal **74**(6): 3264-3272.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lambacher, A. and P. Fromherz (2002). "Luminescence of Dye Molecules on Oxidized Silicon and Fluorescence Interference Contrast Microscopy of Biomembranes." Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics **19**(6): 1435-1453.
- Lasic, D. D., P. M. Frederik, et al. (1992). "Gelation of Liposome Interior: A Novel Method for Drug Encapsulation." FEBS Letters **312**(2-3): 255-258.
- Latorre, R., G. Ehrenstein, et al. (1972). "Ion Transport Through Excitability-Inducing Material (EIM) Channels in Lipid Bilayer Membranes." Journal of General Physiology **60**(1): 72-85.

- Leckband, D. and J. Israelachvili (2001). "Intermolecular Forces in Biology." Quarterly Reviews of Biophysics **34**(2): 105-267.
- Lipowsky, R. (1991). "The Conformation of Membranes." Nature **349**(6309): 475-481.
- Loidl-Stahlhofen, A., S. Kaufmann, et al. (1996). "The Thermodynamic Control of Protein Binding to Lipid Bilayers for Protein Chromatography." Nature Biotechnol. **14**: 999-1002.
- MacLennan, D. H. and P. C. Holland (1975). "Calcium Transport in Sarcoplasmic Reticulum." Annual Review of Biophysics and Bioengineering **4**(1): 377-404.
- MacLennan, D. H. and P. T. S. Wong (1971). "Isolation of a Calcium-Sequestering Protein from Sarcoplasmic Reticulum." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **68**(6): 1231-1235.
- Maget-Dana, R. (1999). "The Monolayer Technique: A Potent Tool for Studying the Interfacial Properties of Antimicrobial and Membrane-Lytic Peptides and their Interactions with Lipid Membranes." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **1462**(1-2): 109-140.
- Mazer, N. A., G. B. Benedek, et al. (1980). "Quasielastic Light-Scattering Studies of Aqueous Biliary Lipid Systems. Mixed Micelle Formation in Bile Salt-Lecithin Solutions." Biochemistry **19**(4): 601-615.
- McConnell, H. M. (1991). "Structures and Transitions in Lipid Monolayers at the Air-Water Interface." Annual Review of Physical Chemistry **42**(1): 171-195.
- Meissner, G., G. E. Conner, et al. (1973). "Isolation of Sarcoplasmic Reticulum by Zonal Centrifugation and Purification of Ca<sup>2+</sup>-Pump and Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes **298**(2): 246-269.
- Melin (2007). "Membranverfahren." Springer Lehrbücher(3).
- Menger, F. M., M. E. Chlebowski, et al. (2005). "A Tribute to the Phospholipid." Langmuir **21**(23): 10336-10341.
- Möhwald, H. (1990). "Phospholipid and Phospholipid-Protein Monolayers at the Air/Water Interface." Annual Review of Physical Chemistry **41**(1): 441-476.
- Mooney, J. F., A. J. Hunt, et al. (1996). "Patterning of Functional Antibodies and other Proteins by Photolithography of Silane Monolayers." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(22): 12287-12291.
- Moya, S., E. Donath, et al. (2000). "Lipid Coating on Polyelectrolyte Surface Modified Colloidal Particles and Polyelectrolyte Capsules." Macromolecules **33**(12): 4538-4544.
- Müller, P. and D. O. Rudin (1968). "Action Potentials Induced in Biomolecular Lipid Membranes." Nature **217**(5130): 713-719.
- Müller, P., D. O. Rudin, et al. (1962). "Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System." Nature **194**(4832): 979-980.
- Nagle, J. F. and S. Tristram-Nagle (2000). "Structure of Lipid Bilayers." Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes **1469**(3): 159-195.
- Naumann, C., T. Brumm, et al. (1992). "Phase Transition Behavior of Single Phosphatidylcholine Bilayers on a Solid Spherical Support Studied by DSC, NMR and FT-IR." Biophysical Journal **63**(5): 1314-1319.
- Nawroth, T., H. Conrad, et al. (1989). "Neutron Small Angle Scattering of Liposomes in the Presence of Detergents." Physica B: Condensed Matter **156-157**: 477-480.
- Nelson, A. (2006). "Co-Refinement of Multiple-Contrast Neutron/X-Ray Reflectivity Data using MOTOFIT." Journal of Applied Crystallography **39**(2): 273-276.
- Nevo, A., A. De Vries, et al. (1955). "Interaction of Basic Polyamino Acids with the Red Blood Cell I. Combination of Polylysine with Single Cells." Biochimica et Biophysica Acta **17**: 536-547.
- Nénot, L. and P. Croce (1980). "Caractérisation des Surfaces par Réflexion Rasante de Rayons X. Application à l'étude du Polissage de quelques Verres Silicates." Revue de Physique Appliquée **15**(3): 761-779.
- New, R. R. C., M. L. Chance, et al. (1978). "Antileishmanial Activity of Antimonials Entrapped in Liposomes." Nature **272**(5648): 55-56.

- Nissen, J., S. Gritsch, et al. (1999). "Wetting of Phospholipid Membranes on Hydrophilic Surfaces - Concepts Towards Self-Healing Membranes." European Physical Journal B **10**: 335-344.
- Noble, R. D., C. A. Koval, et al. (1989). "Facilitated Transport Membrane Systems." Chemical Engineering Progress **85**(3): 58-70.
- Noble, R. D. and S. A. Stern (1994). "Membrane Separation Processes, Separations Technology - Principles and Applications." Elsevier Amsterdam.
- Nomura, F., M. Nagata, et al. (2001). "Capabilities of Liposomes for Topological Transformation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(5): 2340-2345.
- Pagano, R. E., K. J. Longmuir, et al. (1983). "Intracellular Translocation and Metabolism of a Fluorescent Phosphatidic Acid Analogue in Cultured Fibroblasts." Journal of Biological Chemistry **258**(3): 2034-2040.
- Parratt, L. G. (1954). "Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays." Physical Review **95**(2): 359.
- Pilkington, P. H., A. Margaritis, et al. (1998). "Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes." Critical Reviews in Biotechnology **18**(2&3): 237-255.
- Plant, A. L. (1993). "Self-Assembled Phospholipid / Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold." Langmuir **9**: 2764-2767.
- Provencher, S. W. (1982). "A Constrained Regularization Method for Inverting Data Represented by Linear Algebraic or Integral Equations." Computer Physics Communications **27**(3): 213-227.
- Purrucker, O., A. Förtig, et al. (2004). "Supported Membranes with Well-Defined Polymer Tethers - Incorporation of Cell Receptors." ChemPhysChem **5**(3): 327-335.
- Purrucker, O., S. Gonnenwein, et al. (2007). "Polymer-Tethered Membranes as Quantitative Models for the Study of Integrin-Mediated Cell Adhesion." Soft Matter **3**(3): 333-336.
- Rädler, J. and E. Sackmann (1997). "Functionalization of Solids by Ultrathin Soft Polymer Films and Polymer/Lipid Film Composites: Modeling of Cell Surfaces and Cell Recognition Processes." Current Opinion in Solid State & Materials Science **2**(3): 330-336.
- Rädler, J., H. Strey, et al. (1995). "Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces." Langmuir **11**: 4539-4548.
- Rehfeldt, F. and M. Tanaka (2003). "Hydration Forces in Ultrathin Films of Cellulose." Langmuir **19**: 1467-1473.
- Reichstein, E. and R. Blostein (1975). "Arrangement of Human Erythrocyte Membrane Proteins." Journal of Biological Chemistry **250**(16): 6256-6263.
- Sackmann, E. (1996). "Supported Membranes: Scientific and Practical Applications." Science **271**(5245): 43-48.
- Sackmann, E. and R. F. Bruinsma (2002). "Cell Adhesion as Wetting Transition?" ChemPhysChem **3**(3): 262-269.
- Sackmann, E. and R. Lipowsky (1995). "Handbook of Biological Physics - Structure and Dynamics of Membranes." Elsevier Amsterdam **1B**.
- Sackmann, E. and M. Tanaka (2000). "Supported Membranes on Soft Polymer Cushions: Fabrication, Characterization and Applications." Trends in Biotechnology **18**(2): 58-64.
- Saffman, P. G. and M. Delbrück (1975). "Brownian Motion in Biological Membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(8): 3111-3113.
- Salafsky, J., J. T. Groves, et al. (1996). "Architecture and Function of Membrane Proteins in Planar Supported Bilayers: A Study with Photosynthetic Reaction Centers." Biochemistry **35**: 14773-14781.
- Schaub, M., G. Wenz, et al. (1993). "Ultrathin Films of Cellulose on Silicon-Wafers." Advanced Materials **5**(12): 919-922.
- Schekman, R. and L. Orci (1996). "Coat Proteins and Vesicle Budding." Science **271**(5255): 1526-1533.

- Schindler, H. (1980). "Formation of Planar Bilayers from Artificial or Native Membrane Vesicles." FEBS Letters **122**(1): 77-79.
- Schünemann, V. (2005). "Biophysik." Springer Lehrbücher.
- Schwoch, G. and H. Passow (1973). "Preparation and Properties of Human Erythrocyte Ghosts." Molecular and Cellular Biochemistry **2**: 197-217.
- Shamoo, A. E. and D. H. MacLennan (1974). "A Ca<sup>2+</sup>-Dependent and -Selective Ionophore as Part of the Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>-Dependent Adenosinetriphosphatase of Sarcoplasmic Reticulum." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **71**(9): 3522-3526.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes." Science **175**(4023): 720-731.
- Storm, G., F. H. Roerdink, et al. (1987). "Influence of Lipid Composition on the Antitumor Activity Exerted by Doxorubicin-Containing Liposomes in a Rat Solid Tumor Model." Cancer Research **47**(13): 3366-3372.
- Swain, P. S. and D. Andelman (1999). "The Influence of Substrate Structure on Membrane Adhesion." Langmuir **15**(26): 8902-8914.
- Tamm, L. K. and H. M. McConnell (1985). "Supported Phospholipid Bilayers." Biophysical Journal **47**: 105-113.
- Tanaka, M., S. Kaufmann, et al. (2001). "Orientation Selective Immobilization of Human Erythrocyte Membranes on Ultrathin Cellulose Films." Physical Chemistry Chemical Physics **3**: 4091-4095.
- Tanaka, M. and E. Sackmann (2005). "Polymer-Supported Membranes as Models of the Cell Surface." Nature **437**(7059): 656-663.
- Tanaka, M., A. P. Wong, et al. (2004). "Selective Deposition of Native Cell Membranes on Biocompatible Micropatterns." Journal of the American Chemical Society **126**(10): 3257-3260.
- Tempel, M., W. H. Goldman, et al. (1994). "Insertion of Filamin into Lipid Membranes Examined by Calorimetry, the Film Balance Technique, and Lipid Photolabeling." Biochemistry **33**(42): 12565-12572.
- Thompson, T. E. (1967). "Experimental Bilayer Membrane Models." Protoplasma **63**(1): 194-196.
- Toyoshima, C. and G. Inesi (2004). "Structural Basis of Ion Pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum." Annual Review of Biochemistry **73**: 269-292.
- Tutus, M., F. F. Rossetti, et al. (2008). "Orientation-Selective Incorporation of Transmembrane FO F1 ATP Synthase Complex from *Micrococcus luteus* in Polymer-Supported Membranes." Macromolecular Bioscience **8**(11): 1034-1043.
- van den Berg, A. and M. Wessling (2007). "Nanofluidics - Silicon for the Perfect Membrane." Nature **445**(7129): 726-726.
- Vaz, W. L. C., F. Goodsaid-Zalduondo, et al. (1984). "Lateral Diffusion of Lipids and Proteins in Bilayer Membranes." FEBS Letters **174**(2): 199-207.
- Virtanen, J. A., K. H. Cheng, et al. (1998). "Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(9): 4964-4969.
- Walker, S. A., M. T. Kennedy, et al. (1997). "Encapsulation of Bilayer Vesicles by Self-Assembly." Nature **387**(6628): 61-64.
- Walz, D. and S. Caplan (1988). "Energy Coupling and Thermokinetic Balancing in Enzyme Kinetics." Cell Biochemistry and Biophysics **12**(1): 13-28.
- Wardak, A., R. Brodowski, et al. (2000). "Effect of Light-Harvesting Complex II on Ion Transport Across Model Lipid Membranes." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **56**(1): 12-18.
- Yasuoka, K., M. Kawakita, et al. (1982). "Interaction of Adenosine-5'-O-(3-Thiotriphosphate) with Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-Adenosine Triphosphatase of Sarcoplasmic Reticulum." Journal of Biochemistry **91**(5): 1629-1637.

- Zachowski, A. and P. F. Devaux (1990). "Transmembrane Movements of Lipids." Cellular and Molecular Life Sciences **46**(6): 644-656.
- Zwicker, K. (1992). "Isolation der ATP-Synthase aus *Micrococcus luteus* und funktionelle Rekonstitution in Modellmembranen." Johannes Gutenberg Universität Mainz PhD Thesis.

## Publikationsliste

- 1 Motomu Tanaka, Amy P. Wong, Florian Rehfeldt, Murat Tutus and Stefan Kaufmann  
„Selective Deposition of Native Cell Membranes on Biocompatible Micropatterns”  
Journal of American Chemical Society, 2004, **126**, 3257
- 2 Murat Tutus, Oliver Purruicker, Klaus Adlkofer, Martin Eickhoff and Motomu Tanaka  
„Electrochemical Stabilization of Crystalline Silicon with Aromatic Self-Assembled  
Monolayers in Aqueous Electrolytes”  
Physica Status Solid B, 2005, **242**, 2838
- 3 Murat Tutus, Fernanda F. Rossetti, Emanuel Schneck, Giovanna Fragneto, Friedrich Förster,  
Ralf Richter, Thomas Nawroth and Motomu Tanaka  
„Orientation- Selective Incorporation of Transmembrane F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP Synthase Complex from  
*Micrococcus luteus* in Polymer-Supported Membranes”  
Macromolecular Bioscience, 2008, **8**, 1034
- 4 Motomu Tanaka, Murat Tutus, Stefan Kaufmann, Fernanda F. Rossetti, Emanuel Schneck and  
Ingrid M. Weiss  
„Native Supported Membranes on Polymer Supports and Micro-Particle Supports“  
Journal of Structural Biology, 2009, **168**, 137
- 5 Murat Tutus, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka  
„Highly Concentrated Sarcoplasmic Reticulum Membranes on Particle Supports as  
Biochemical Micro-Reactors”  
in preparation
- 6 Murat Tutus, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka,  
„Spreading Kinetics of Human Erythrocyte Membranes on Particle Supports: Influence of  
Contact Curvatures “  
in preparation

## Posterpräsentationen

Murat Tutus, Thomas Dittrich, Oliver Purruicker, Martin Eickhoff, Jörg Rappich, and Motomu Tanaka. DPG Tagung 2003. Low Temperature Passivation of Crystalline Silicon with Organic Self-Assembled Monolayers

Murat Tutus, Thomas Nawroth and Motomu Tanaka. DPG Tagung 2004. Deposition of Plasma Membrane Models with  $F_1F_0$  ATP-Synthase on Biocompatible Thin Films.

Murat Tutus, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka. DPG Tagung 2004. Cell Adhesion onto Highly Curved Surfaces - One-Step Immobilization of Cell Membranes on Beads.

Murat Tutus, Alexander Tschukes, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka. Heraeus Workshop on Biofunctional Interfaces 2004. Fabrication of inside-out cell membranes on highly curved particle surfaces – One step immobilization of different cell membranes.

Murat Tutus, Alexander Tschukes, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka. DPG Tagung 2005. Fabrication of Inside-Out Cell Membranes on Silica Microparticles.

Joachim Herrmann, Murat Tutus, Thomas Schubert, Amy P. Wong, Florian Rehfeldt, Oliver Purruicker, Stefan Kaufmann and Motomu Tanaka. 2006 Meeting des SFB 563, Bioorganische Funktionssysteme auf Festkörpern. Lateral Confinement of Functional Proteins in Membrane Micropatterns.

# Lebenslauf

## Persönliches

---

Geboren am 10.07.1973 in Pinarbasi, Türkei

Familienstand: ledig

Nationalität: Deutsch mit türkischem Ursprung

## Schul- und Berufsausbildung

---

seit 11.2009 wissenschaftlicher Angestellter an der RWTH Aachen, Aachener Verfahrenstechnik und Deutsches Wollforschungsinstitut bei Prof. Matthias Wessling, Thema: Technischer Einsatz von biomimetischen Filtern für Trennprozessen

---

02/2004~01/2010 Doktorarbeit am Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie II, Univ. Heidelberg in Kooperation mit der TU Berlin), Thema: „Künstliche und native Biomembransysteme auf planaren Substraten sowie auf Partikeloberflächen“, Betreuer: Prof. M. Tanaka, Abgabedatum (Dr.-Ing. an der TU Berlin): 12.2009

02/2003~02/2004 Dipl.-Ing., Biotechnologie TU Berlin, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biophysik, TU München, Thema: „Functional Immobilization of Transmembrane Proteins on Soft Polymer Cushions“, Betreuer: Dr. M. Tanaka (Direktor: Prof. Erich Sackmann), Note: Sehr gut (1,3)

06/2002~12/2002 Forschungspraktikum am Lehrstuhl für Biophysik, TU München, Thema: „Beschichtung und Charakterisierung kristalliner Silizium (111) Oberflächen mit organischen Monolagen“, Betreuer: Dr. M. Tanaka, Note: Sehr gut (1,3)

10/1994~02/2004 Studium der Biotechnologie an der TU-Berlin

08/1991~06/1994 Ratsgymnasium Stadthagen, Abitur

## Praktika und Mitarbeiten

---

- 07/1999~09/1999 Dongseo University, Busan, Süd Korea,  
Aufbau und Einführung des Praktikums für Bioverfahrenstechnik 1 der  
TU-Berlin an der Dongseo University
- 06/1998~06/2000 Ressourcenzentrum am Deutschen Human Genomprojekt, Berlin,  
Aufbau und Erhaltung von genetischen Datenbanken
- 03/1998~06/1998 Deutsches Institut für Gewebeersatz, Berlin,  
Anzucht von Epidermisimplantaten
- 07/1996~10/1996 Wesergarten Getränke GmbH, Rinteln,  
Qualitätskontrolle in der mikrobiologischen Abteilung und  
Inbetriebnahme eines volumetrischen Kontaminationszählers

## Kollaborationen

---

Prof. Martin Eickhoff, Physikdepartment, Gießen  
Prof. W. Baumeister, MPI für Biochemie, München  
PD Dr. T. Nawroth, Institut für Pharmazie, Mainz  
Dr. M. Bärmann, MPI für Metallforschung, Stuttgart  
Dr. R. Richter, CIC biomaGUNE, Spanien  
Dr. S. Funari, HASYLAB am DESY, Hamburg  
PD Dr. I. Weiss, INM Saarbrücken

## Drittmittel

Sonder Forschungsbereich 563

Deutsche Forschungsgesellschaft

Sa 246/27

Sa 246/30

Ta 259/3

Ta 259/5

Leonhard Lorenz-Stiftung der TU München

Fonds der Chemischen Industrie

German French Network

Hausstelle an der Universität Heidelberg

## Eidesstattliche Erklärung

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Physikdepartment der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Biophysik (E22) und am Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg, Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie II Prof. Motomu Tanaka, angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Motomu Tanaka für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten. Zudem Danke ich ihm sehr für die Betreuung der Arbeit und seine wertvollen Ratschläge, die immer zum Erfolg führten.

Prof. Neubauer (Fachgebiet für Bioverfahrenstechnologie am Institut für Biotechnologie an der TU Berlin) danke ich besonders für die Betreuung und das Interesse an dieser Arbeit.

Prof. Lauster (Fachgebiet für Medizinische Biotechnologie am Institut für Biotechnologie an der TU Berlin) danke ich besonders für seine Unterstützung.

PD Dr. Weiss und Dr. Kaufmann danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung, die fachlichen Diskussionen und ihre überaus große Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern der Tanaka Gruppe, vor allem den ehemaligen Mitgliedern Dr. Rehfeld und Dr. Purrucker, danke ich für die wundervolle Arbeitsatmosphäre und die überaus große Hilfsbereitschaft.

Heinz Gunther danke ich insbesondere für die Einsicht zur Spende seiner SR Membranen.

Frau Michaela-Valerie Dorsch danke ich sehr für ihre stetige und große Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Rabia und Ismail Tutus, die mir ermöglicht haben zu studieren und mich immer unterstützt haben. Auch möchte ich Martina und Hans-Wedig von der Osten danken, die mich in meiner schulischen Laufbahn stets fördernd begleitet haben.