

**Strukturuntersuchungen an Proteinen und Protein-Lipid  
Systemen mittels Infrarot-Spektroskopie und  
Röntgenbeugung**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

von dem  
Fachbereich Chemie  
der Universität Dortmund  
genehmigt

**Julia Kraineva**  
aus Tallinn

Dortmund 2006

Vom Fachbereich Chemie der Universität Dortmund genehmigte Dissertation.

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Geiger

Tag der mündlichen Prüfung: 9.2.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Polymorphie von Lipid/Wasser-Systemen</b>	<b>3</b>
2.1.1	<i>Phasen-Eigenschaften</i>	3
2.1.2	<i>Phasen-Verhalten</i>	7
2.1.3	<i>Lipid-Polymorphie in biologischen Systemen</i>	9
2.1.4	<i>Phasen-Identifikation: Röntgen-Kleinwinkelbeugung</i>	12
2.1.5	<i>Untersuchung der molekularen Eigenschaften von Lipiden: FT-IR Spektroskopie</i>	15
<b>2.2</b>	<b>Proteine: Struktur und Stabilität</b>	<b>17</b>
2.2.1	<i>Protein-Struktur</i>	18
2.2.2	<i>Protein-Stabilität</i>	20
2.2.3	<i>Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen: IR-Spektroskopie</i>	22
<b>3</b>	<b>Experimentelle Durchführung</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Präparation</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>FT-IR Messungen</b>	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>SAXS Experimente an Synchrotron-Anlagen</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Amyloidogene Proteine</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Prion-Protein: Mechanismus der Aggregation</b>	<b>35</b>
4.1.1	<i>Strukturelle und biologische Eigenschaften von Prion-Protein</i>	35
4.1.2	<i>Native Sekundärstruktur von wild-type PrP und seinen Mutanten</i>	38
4.1.3	<i>Temperaturinduzierte Aggregation von PrP und PrP-Mutanten</i>	41
4.1.4	<i>Prion-Protein und seine Mutanten unter Druck</i>	43
4.1.5	<i>Prion-DNA Komplexe</i>	49
4.1.6	<i>Zusammenfassung</i>	52
<b>4.2</b>	<b>Transthyretin: Mechanismus der Amyloid-Bildung</b>	<b>53</b>
4.2.1	<i>Strukturelle und biologische Eigenschaften von TTR</i>	53
4.2.2	<i>Sekundärstruktur von nativem wild-type TTR</i>	54
4.2.3	<i>Temperatur-induzierte Aggregation von TTR</i>	55
4.2.4	<i>Entfaltung und Missfaltung von TTR unter Druck</i>	57
4.2.5	<i>Vergleich der Aggregatstruktur</i>	61
4.2.6	<i>Zusammenfassung</i>	63
<b>4.3</b>	<b>Insulin-Aggregation</b>	<b>64</b>
4.3.1	<i>Strukturelle und biologische Eigenschaften von Insulin</i>	64
4.3.2	<i>Sekundärstruktur von Insulin</i>	65

4.3.3	<i>Temperatur-induzierte Aggregation von Insulin</i>	67
4.3.4	<i>Insulin-Aggregation unter Druck</i>	69
4.3.5	<i>Zusammenfassung</i>	70
<b>5</b>	<b>Kubische Lipid-Phasen</b>	<b>71</b>
<b>5.1</b>	<b>Das System Monoolein-Wasser</b>	<b>71</b>
5.1.1	<i>Das Lipid Monoolein</i>	71
5.1.2	<i>Phasenverhalten von MO/Wasser - SAXS Untersuchungen</i>	72
5.1.3	<i>Kinetik der Phasenübergänge</i>	74
5.1.4	<i>Lipidkonformation in MO/Wasser - FT-IR Untersuchungen</i>	76
<b>6</b>	<b>Protein-Einbau in kubische Phasen</b>	<b>84</b>
<b>6.1</b>	<b>Einbau von Insulin</b>	<b>84</b>
6.1.1	<i>Phasenverhalten von MO/Insulin Systemen - SAXS Untersuchungen</i>	84
6.1.2	<i>Sekundärstruktur von Insulin in MO/Wasser</i>	90
6.1.3	<i>Lipidkonformation in MO/Insulin Systemen - FT-IR Untersuchungen</i>	92
6.1.4	<i>Zusammenfassung</i>	94
<b>6.2</b>	<b>Einbau von Cytochrom c</b>	<b>96</b>
6.2.1	<i>Das Membranprotein Cytochrom c</i>	96
6.2.2	<i>Sekundärstruktur von Cytochrom c in Lösung und in MO</i>	97
6.2.3	<i>Phasenverhalten von MO/cyt c Systemen - SAXS Untersuchungen</i>	99
6.2.4	<i>Lipidkonformation in MO/cyt c Systemen - FT-IR Untersuchungen</i>	103
6.2.5	<i>Kinetik der Phasenübergänge - SAXS Drucksprunguntersuchungen</i>	107
6.2.6	<i>Zusammenfassung</i>	116
<b>6.3</b>	<b>Einbau von <math>\alpha</math>-Chymotrypsin</b>	<b>119</b>
6.3.1	<i>Das Protein <math>\alpha</math>-Chymotrypsin</i>	119
6.3.2	<i>Sekundärstruktur von <math>\alpha</math>-Chymotrypsin in Lösung und in MO/Wasser</i>	120
6.3.3	<i>Phasenverhalten von MO/Chymotrypsin Systemen - SAXS Untersuchungen</i>	122
6.3.4	<i>Lipidkonformation in MO/<math>\alpha</math>-Chymotrypsin Systemen - FT-IR Untersuchungen</i>	125
6.3.5	<i>Zusammenfassung</i>	127
<b>7</b>	<b>Das MO/DOPA/Wasser System</b>	<b>128</b>
7.1.1	<i>Phasenverhalten von MO/DOPA - SAXS Untersuchungen</i>	128
7.1.2	<i>Lipidkonformation in MO/DOPA - FT-IR Untersuchungen</i>	130
7.1.3	<i>Zusammenfassung</i>	133
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit</b>	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>139</b>

## 1 Einleitung

Zellfunktionen werden durch molekulare Elementarschritte gesteuert, die auf die Wechselwirkungen von Proteinen mit Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten beruhen. Das zelluläre Netzwerk mit seiner enormen funktionellen Vielfalt wird durch eine Vielzahl von schwachen und reversiblen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Reaktionspartnern ermöglicht. Diese Forschungsarbeit soll zum verbesserten Verständnis solcher Interaktionen beitragen.

Der erste Themenbereich befasst sich mit Protein-Protein Wechselwirkungen, insbesondere mit der Aufklärung des Aggregationsmechanismus von amyloidogenen Proteinen am Beispiel von Prion-Protein, Transthyretin und Insulin. Im Fall der Amyloidosen liegt der pathologische Effekt darin, dass eine fehlerhaft gefaltete Isoform des Proteins gebildet wird. Weisen Zellen Störungen von Proteinverarbeitung und -abbau auf, kommt es zu einer Aggregation und Ablagerung der fehlgefalteten Proteinpartikel in den Zellen. Prion- und Transthyretin-Ablagerungen führen dann zu neurodegenerativen Erkrankungen, die einen langsam fortschreitenden Verlauf und komplexe klinische und morphologische Phänotypen zeigen, bedingt durch Funktionsverlust und Ausfall spezifischer sensibler Neuronenpopulationen im Zentralnervensystem. Bei Insulin bilden sich Aggregationsablagerungen in den Muskeln und führen dann zu deren Degeneration. Die Aufklärung des Auslösemechanismus der Amyloidosis, der Struktur und der Stabilität der fehlgefalteten Protein-Aggregate sind nicht nur vom großen akademischen Interesse, sondern auch entscheidend für die Entwicklung von therapeutischen Maßnahmen gegen diese, bis jetzt unheilbare, Erkrankungen. Molekulare Aggregationsmechanismen werden hier *in vitro* bei unterschiedlichen physikalischen Bedingungen wie Temperatur, Druck und pH-Wert untersucht. Besonderes Interesse gilt dabei der Aufklärung der Sekundärstruktur der Intermediate und der Protein-Aggregate. Die Beteiligung von anderen molekularen Komponenten, wie DNA, an der Amyloidose wird ebenfalls berücksichtigt und analysiert.

Lipid-Polymorphismus ist das Thema des zweiten Projekts. Schichten und Grenzflächen sind allgegenwärtig in biologischen Systemen. Hierzu zählen Zellmembranen, die viele strukturelle Aufgaben besitzen und eine Vielzahl an biologischen Funktionen ausführen. Besonderes Interesse gilt hier der Membran-Fusion, die ein äußerst wichtiger Prozess aller Zellen ist. Die Fusion ist ein wichtiger Schritt bei Transport-Prozessen in und zwischen den Zellen, bei dem verschiedene Stoffe durch Membranen eingeschlossen und übertragen werden. Der molekulare Mechanismus der Fusion wurde im Detail noch nicht aufgeklärt.

Künstliche Lipidmembranen sind geeignete Modellsysteme, mit denen bestimmte Reaktionen *in vitro* untersucht werden können. Wässrige Monoolein-Dispersionen stellen einfache Modellsysteme dar, in denen Übergänge zwischen lamellaren und kubischen Phasen beobachtet werden können. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Struktur einer Fusions-Pore und inversen kubischen Phasen. Der Mechanismus und die Kinetik der Phasen-Umwandlungen wird mittels zeitaufgelöster Röntgenbeugung am Beispiel von Monoolein/Wasser-Lipidmembranen studiert.

Ein dritter Themenbereich befasst sich mit der Wechselwirkung von Proteinen mit nanostrukturierten Lipidsystemen. Dabei steht der Einbau von Proteinen (Cytochrom c,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Insulin) in die kubischen Phasen von Monoolein im Mittelpunkt des Interesses. Bikontinuierliche kubische Phasen sind „weiche“ Analoga von Zeolithen, die hydrophile, hydrophobe und amphiphile Substanzen lösen können und als Transportmittel für Wirkstoffe oder als Matrix für die Protein-Kristallisation verwendet werden können. Hier wird der Einfluss der Proteine auf die strukturellen Eigenschaften der Lipid-Umgebung sowie die damit verbundenen Konformationsänderungen der Komponenten mittels FT-IR-Spektroskopie und Röntgenbeugung genauer untersucht. Die Stabilität der in die engen Geometrien eingeschlossenen Proteine wird bezüglich Entfaltung und Aggregation analysiert. Der Einfluss der Proteine auf die Kinetik und das Szenario der Phasen-Umwandlungen wird vertiefend untersucht.

Im letzten Projekt wird eine Lipid-Lipid Wechselwirkung exemplarisch an MO/DOPA-Systemen studiert. Ziel der Untersuchung ist die Charakterisierung der Struktur der Lipid-Systeme sowie die Detektion von Wechselwirkungen zwischen den beiden Lipid-Komponenten.

## 2 Theorie

### 2.1 Polymorphie von Lipid/Wasser-Systemen

Lipide sind neben Proteinen, Kohlenhydraten und Nucleotiden eine der vier wichtigsten Klassen von Biomolekülen und stellen essenzielle Komponenten aller lebenden Organismen dar. Im Unterschied zu anderen Typen von Biomolekülen, haben Lipide eine reiche Vielfalt an Strukturen. In der systematischen Einteilung der Lipide unterscheidet man zwischen den einfachen (Fettsäuren, Sterole) und zusammengesetzten Lipiden (Glycerophospholipide, Sphingolipide, Neutralfette, Wachse). Unter der Bezeichnung „Lipid“ werden also Substanzen zusammengefasst, die zwar chemisch nur wenig gemeinsam haben, physikalisch-chemisch sich aber insofern gleichen, dass sie mehr oder weniger hydrophob sind und sich in Wasser schlecht oder gar nicht lösen. Als Folge des hydrophoben Effekts bilden sich in Wasser spontan mikroskopisch kleine Lipid-Aggregate aus. Je nach der Art der Lipide und der physikalischen Bedingungen, können verschiedene Typen von Lipid-Aggregaten entstehen: Mizellen, Lipid-Doppelschichten und Liposomen. Im Folgenden wird auf die Lipid-Doppelschichten eingegangen - die auch für die Struktur und Funktion der Biomembranen am meisten relevant sind - und beschrieben, welche vielfältigen Lipid-Strukturen (Phasen) aus der Optimierung der intra- und intermolekulären Wechselwirkungen und geometrischen Parametern resultieren.

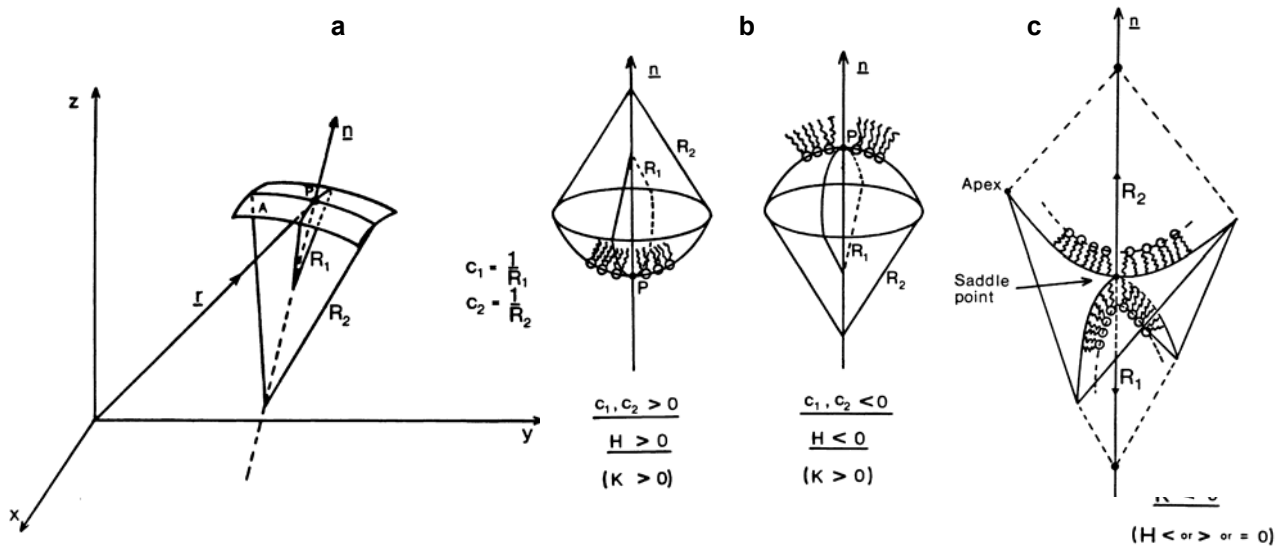
#### 2.1.1 Phasen-Eigenschaften

*Oberflächen-Krümmung und Packungs-Parameter.* Die Oberflächen-Krümmung ist eine fundamentale Eigenschaft, die zur Beschreibung und Charakterisierung von Lipid-Strukturen herangezogen wird. Unter dem Begriff „Oberfläche“ versteht man hier die Fläche, die polare (Wasser und polare Kopfgruppen) und apolare Regionen (Kohlenwasserstoff-Ketten) einer Lipid-Phase trennt, und dem entsprechend in der Mitte der Kopfgruppen-Region verläuft. Die lokale Krümmung einer Fläche wird mit Hilfe der mittleren Krümmung  $H$  und der Gauss'schen Krümmung  $K$  definiert. Die sind verknüpft mit den Hauptkrümmungen  $c_1$  und  $c_2$  mit Radien  $R_1$  und  $R_2$  an einem gegebenen Punkt  $P$  der Oberfläche (Abb. 1):

$$H = \frac{c_1 + c_2}{2} \quad (1)$$

$$K = c_1 \cdot c_2 \quad (2)$$

$$\text{mit } c_{1(2)} = \frac{1}{R_{1(2)}} \quad (3)$$



**Abbildung 1:** (a), (b) Definition der mittleren Krümmung  $H$  und der Gauss'schen Krümmung  $K$  für eine Lipid-Monoschicht.  $c_1$  und  $c_2$  sind die Hauptkrümmungen mit Krümmungsradien  $R_1$  und  $R_2$ .  $n$  ist der Normal-Vektor des Oberflächen-Elements  $A$  am Punkt  $P$ , gerichtet in die positive  $z$ -Richtung. (c) Die „saddle surface“ (aus Seddon 1990).

Definitionsgemäß ist die mittlere Krümmung  $H$  positiv, wenn die Oberfläche sich in Richtung der Lipidketten krümmt, und negativ, wenn die Krümmung in Richtung des Wassers erfolgt.

An dieser Stelle ist es sinnvoll, den Packungs-Parameter  $\eta$  einzuführen, der die molekulare Form und die Morphologie der Lipide in den Lipid-Aggregaten beschreibt, und das Verhältnis zwischen dem Lipid-Volumen  $V_l$ , der Grenzfläche  $A_l$  und der Lipid-Länge  $l$  darstellt:

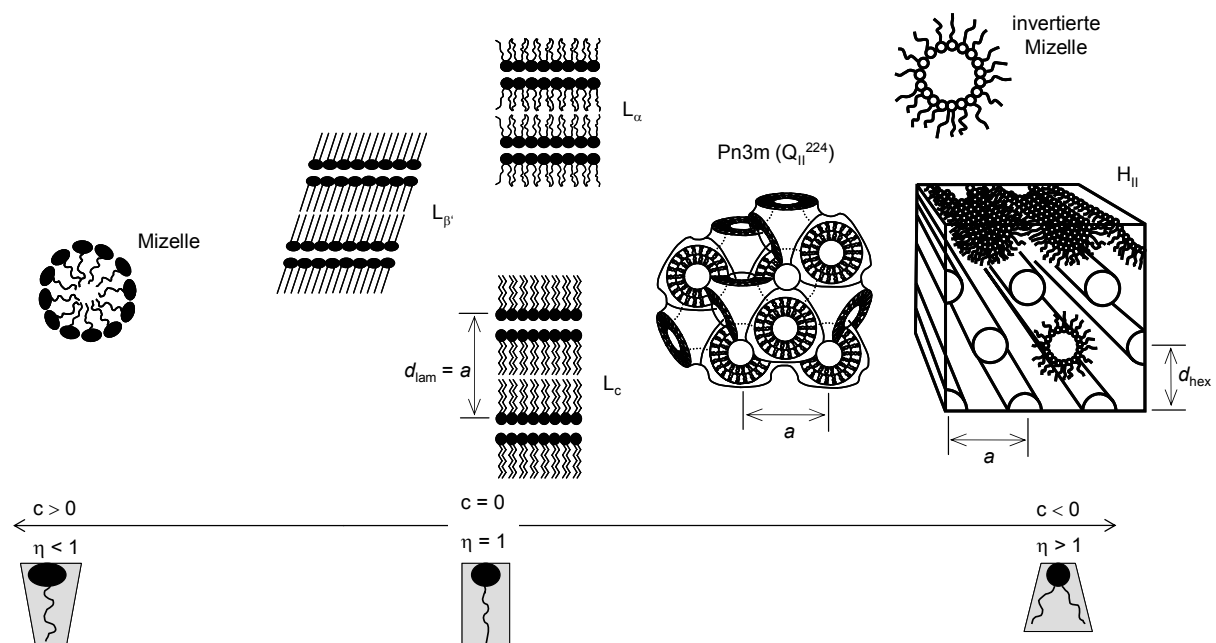
$$\eta = \frac{V_l}{A_l \cdot l} \quad (4)$$

Die molekulare Form und die Krümmung stehen im folgenden Verhältnis zueinander:

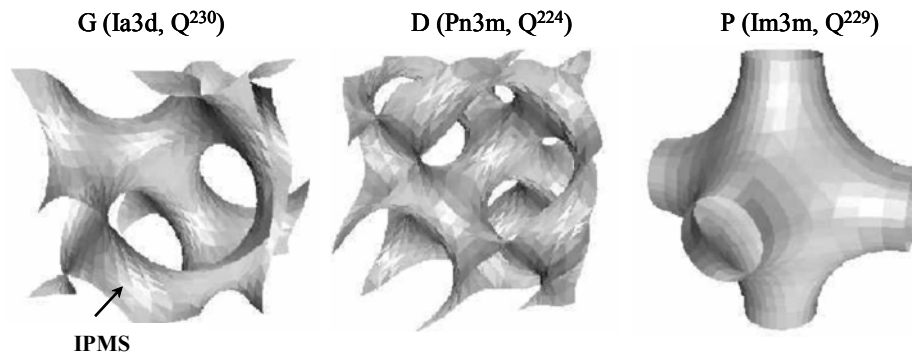
$$\eta = 1 + H \cdot l + \frac{K \cdot l^2}{3} \quad (5)$$

In den Abbildungen 1 und 2 ist der Zusammenhang zwischen der Krümmung und dem Packungs-Parameter veranschaulicht. Wird die Lipid-Schicht gebogen, so verändert sich die Hauptkrümmung  $H$ . Eine Streckung (oder Stauchung) beeinflusst die Gauss'sche Krümmung  $K$ . Oberflächen mit positivem  $K$  sind elliptisch und sphärisch gebogen, wie eine Mizelle. Bei  $K$  gleich null (wenn  $c_1$  oder  $c_2 = 0$ ) ist die Oberfläche parabolisch. Ein Beispiel dafür ist die hexagonale Phase. In der lamellaren Phase sind beide Hauptkrümmungen gleich null und die

Oberfläche ist planar. Haben  $c_1$  und  $c_2$  entgegengesetzte Vorzeichen, wird  $K$  negativ und die Oberfläche hyperbolisch, eine sogenannte *saddle surface*. Die Gauss'sche Krümmung ist am negativsten in den „Sattel-Punkten“, und erreicht null an den „Eck-Punkten“ (Abb. 1c). Wenn die Hauptkrümmungen an jedem Punkt gleich sind und sich nur in deren Richtungen unterscheiden (negativ und positiv), dann ist die mittlere Krümmung  $H$  gleich null an jedem Punkt. Diese Art von Oberflächen wird als Minimalfläche bezeichnet. Solche Flächen können sich in alle Raumrichtungen ausdehnen und eine unendliche periodische Minimalfläche - *infinite periodic minimal surface* (IPMS), oder als *triple periodic minimal surface* (TPMS) bezeichnet - bilden (Abb. 3). Die Fläche verläuft dabei in der Mitte der Lipid-Doppelschicht und ist zur Wasserschicht hin gekrümmt (invertierte Struktur). Repräsentanten dieser Struktur sind kubische Phasen, auf die im Folgenden hauptsächlich eingegangen wird. Die Struktur und Energie dieser Phasen können z. T. numerisch modelliert werden. Hierfür wird die Ginzburg-Landau-Theorie verwendet (Gompper 1992). Mathematisch kann eine periodische Fläche, eingeschlossen in einen drei-dimensionalen Raum, über zwei Funktionale charakterisiert werden: Oberfläche pro Einheitszelle  $A$  und Euler Charakteristik  $\chi$ . Durch diese Parameter kann man kubische Phasen geometrisch beschreiben und diese Modelle auf experimentell zugängliche Daten anwenden (s. unten).

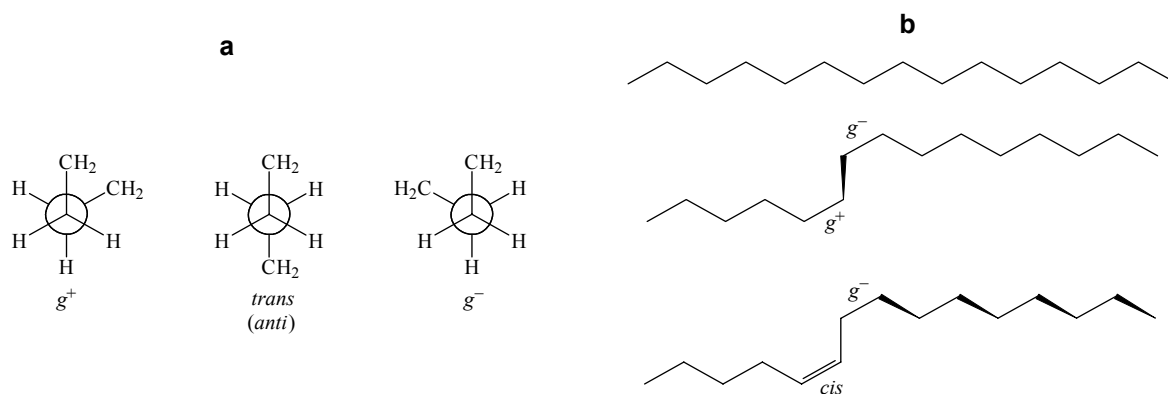


**Abbildung 2:** Lipid-Doppelschichten mit verschiedenen Krümmungen: Lamellare, kubische und hexagonale Phasen. Wird die Lipid-Oberfläche zu den Ketten hin gekrümmt, spricht man über normale Strukturen (Index I); wird die Lipid-Oberfläche zur Wasserschicht hin gekrümmt, entsteht eine invertierte Struktur (Index II). Für hexagonale, kubische und lamellare Gittertypen sind zusätzlich die entsprechenden Gitterkonstanten ( $a$ ) und laterale Netzebenen-Abstände ( $d$ ) gezeigt.



**Abbildung 3:** Unendliche periodische Minimalflächen (IPMS): Gyroid G, Diamond D und Schwarz (Primitiv) P. Die Minimalfläche verläuft in der Mitte der Lipid-Doppelschicht (Schwarz 2001).

*Nomenklatur.* Bei Lipid-Aggregaten differenziert man zwischen mizellaren und nicht-mizellaren Phasen sowie zwischen geordneten und ungeordneten Phasen. Mizellare Phasen bestehen aus sphärischen oder zylindrischen Aggregaten (Abb. 2). Alle anderen Phasen werden unter dem Begriff „lyotrope Phasen“ zusammengefasst. Das sind lamellare Phasen L und P, kubische Phasen Q und hexagonale Phasen H. Die Bezeichnungen der kubischen Phasen basieren auf kristallographischen Gitter-Typen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht aller bekannten experimentell in Lipid-Systemen beobachteten kubischen Strukturen. Index I oder II bezeichnet normale (zu Ketten hin gekrümmte) bzw. inverse (zur Wasser hin gekrümmte) Phasen. Die griechischen Symbole werden zur Beschreibung der Ketten-Konformation benutzt:  $\alpha$  für flüssig-kristalline,  $\beta$  für geordnete gel-artige, c für kristalline Ketten-Konformationen. Die Unterscheidung zwischen den geordneten und ungeordneten Phasen erfolgt über die Konformation der Ketten: Die ungeordnete Phase ist durch eine hohe Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten gekennzeichnet, die auf die Bildung von *gauche*-Isomeren zurückzuführen ist (Abb. 4), und wird aus diesem Grund auch als fluide oder flüssig-kristalline Phase genannt. Dazu zählen alle kubische, kubisch-mizellare, hexagonale und  $L_\alpha$  Phasen. Die geordneten Phasen werden als Gel- und kristalline Phasen bezeichnet.



**Abbildung 4:** (a) Newman-Projektion dreier Konformationen eines Polymethylenkettensegments: zwei *gauche*- ( $g^+$  und  $g^-$ ) und ein *trans*-Isomeres. (b) Beispiele für Kohlenwasserstoffkonformationen: die *all-trans*-Konformation, die  $g^+g^-$ -Konformation, die zu einem Knick in der Kette führt, und eine *cis-t-g^-*-Konformation (aus Winter 1998).

**Tabelle 1:** Kubische Phasen: Raumgruppen und entsprechende Minimalflächen ( $\varphi$  Volumenfraktion eines der zwei Labyrinth,  $\chi$  Euler-Charakteristik,  $A_0$  skalierte Oberfläche (Schwarz 1999, Chung 1994)).

Bezeichnung (Raumgruppe)	Struktur	IPMS	$\varphi$	$\chi$	$A_0$
Ia3d (Q <sup>230</sup> )	kubisch	G	0.50	-8	3.09144
Pn3m (Q <sup>224</sup> )	kubisch	D	0.50	-16	3.83755
Im3m (Q <sup>229</sup> )	kubisch	P	0.50	-4	2.34516
Fd3m (Q <sup>227</sup> )	kubisch-mizellar	C(D)	0.50	-144	8.25578
Fm3m (Q <sup>225</sup> )	kubisch				
Pm3m (Q <sup>223</sup> )	kubisch-mizellar				
P4 <sub>3</sub> 2 (Q <sup>212</sup> )	kubisch	C(P)	0.5	-16	3.80938
	kubisch-mizellar				

### 2.1.2 Phasen-Verhalten

Viele Faktoren bestimmen das Phasen-Verhalten der Lipid/Wasser-Mischungen. Die chemische Struktur der Lipide, Zusammensetzung, Wasser-Gehalt, Ionenstärke, Temperatur und Druck sind dabei die wichtigsten Variablen. Darüberhinaus haben auch Zusätze wie z. B. Proteine oder Kohlenhydrate einen zusätzlichen Einfluss. Auf der physikalischen Ebene kann man die Faktoren, die für das Phasen-Verhalten und -Stabilität verantwortlich sind, in unterschiedliche Gruppen unterteilen. Eine erste umfasst Wechselwirkungen zwischen den Lipid-Schichten: Van-der-Waals Kräfte, elektrostatische Kräfte, Hydratation und Fluktuationen. Einer zweiten Gruppe gehören laterale Wechselwirkungen innerhalb der Lipid-Schicht. Hierzu zählen attraktive Wechselwirkungen in der Kopfgruppen-Region, wie z. B.

Wasserstoffbrücken-Bindungen, und repulsive Wechselwirkungen zwischen den Ketten, die in Konkurrenz zum hydrophoben Effekt stehen.

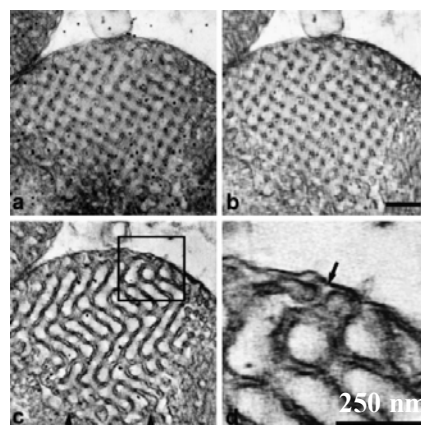
Es gibt drei Typen von Lipid-Phasenumwandlungen: Erstens, Umwandlungen zwischen den geordneten lamellaren Phasen (kristallin $\leftrightarrow$ gel, kristallin $\leftrightarrow$ kristallin, gel $\leftrightarrow$ gel). Diese finden bei tiefen Temperaturen bzw. hohen Drücken statt, also unter den Bedingungen, die geordnete Strukturen stabilisieren. Zweitens, die „Schmelz“-Umwandlungen zwischen den geordneten und ungeordneten Strukturen. Dabei wird die energetische Rotations-Barriere überwunden - normalerweise durch Erhöhung der Temperatur - und die Bildung mehrerer Rotationsisomere in den Kohlenwasserstoffketten erlaubt, wodurch die Kettenlänge und somit auch die Dicke der Lipid-Doppelschicht in einer fluiden Phase reduziert wird (daher der Begriff „Schmelzen“). Die dritte Art von Umwandlungen erfasst Übergänge wie lamellar-kubisch, kubisch-hexagonal und kubisch-kubisch innerhalb der fluiden Phase. Diese Umwandlungen führen zur Änderung der Symmetrie der Phase. Darüber hinaus können die fluiden Phasen auch einen Übergang zu isotropen Strukturen erleiden (mizellare ungeordnete Strukturen, wie „sponge“ oder L<sub>3</sub> Phasen). Änderung der thermodynamischen Variablen Druck und Temperatur oder auch Änderungen der Hydratation, Ionen-Stärke oder des pH-Werts können derartige Phasenübergänge induzieren.

Die chemische Struktur der Lipide (Kettenlänge, Sättigungsgrad, Art der Kopfgruppe) hat einen großen Einfluss auf das Phasen-Verhalten. Zum Beispiel hat ein hoher Anteil an langen Kohlenwasserstoffketten oder gesättigten Fettsäuren in der Membran eine höhere „Schmelz“-Temperatur zur Folge, wohingegen ungesättigte Fettsäuren die geordnete Anordnung der Acylketten im Gelzustand behindern und somit die Übergangstemperatur zu kleineren Temperaturen verschieben. Die Kopfgruppen haben auch einen drastischen Einfluss auf das Phasen-Verhalten. Ein aussagegebender Faktor ist die effektive Polarität der Kopfgruppe. Aber auch sterische Effekte (Größe der Gruppe) und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Gruppen spielen hier eine weitere Rolle. Die effektive Polarität hängt davon ab, ob die hydrophilen Gruppen für Wasser zugänglich sind und somit über H-Brücken-Bindungen hydratisiert werden können und ob die Kopfgruppen miteinander wechselwirken. Die Hydratisierung der Kopfgruppen führt zu einer Stabilisierung fluiden Phasen, während intermolekulare Kopf-Kopf-Wechselwirkungen eher geordnete Strukturen stabilisieren.

### 2.1.3 Lipid-Polymorphie in biologischen Systemen

Physikalische Eigenschaften von Biomembranen regulieren auch ihre Funktion. Die Anteile der einzelnen Komponenten der Zellmembran sind sehr unterschiedlich. Sie hängen von der Spezialisierung der Zelle ab und sind für jede Organelle charakteristisch. Zum Beispiel variiert der Gehalt an Proteinen zwischen 18 (Myelinmembran der Nerven) und 76 Gew.% (innere Mitochondrienmembran) bezogen auf die Trockenmasse. Der Rest besteht aus Lipiden, und Kohlenhydraten, die meist kovalent an die Proteine und Lipide gebunden sind.

Die Lipidzusammensetzung ist je nach Spezialisierung der Membran ebenfalls sehr unterschiedlich, wobei Phospholipide am häufigsten verbreitet sind. Die Membranzusammensetzung ist nicht fixiert und wird durch den Organismus innerhalb gewisser Grenzen reguliert. Dabei sind physikalische und chemische Änderungen in der Umgebung der Zelle ausschlaggebend. Biomembranen sind hauptsächlich in lamellaren Doppel-Schichten organisiert. Aber auch andere Strukturen sind beobachtet worden (Larsson, 1989, Lindblom 1989, Mariani 1988, Cullis 1985, Cullis 1986, de Kruijff 1985). Nicht-lamellare Strukturen wie hexagonale (Seddon 1990) und kubische Phasen (Luzzati 1997, Hyde 1997) sind detektiert worden. Die kubischen Phasen sind dabei am komplexesten und interessantesten (Yeagle 2005, Epanand 1997). Sie sind bei vielen biologischen Prozessen, wie der Membranfusion (Siegel 1997), Fett-Verdauung (Borgström 1985), Funktionskontrolle der Membranproteine, Regulation des Zellvolumens, des osmotischen Druckes und des pH-Gradienten beteiligt.



**Abbildung 5:** Kubische Membran-Struktur von Amöbe-Mitochondrium (TEM-Aufnahmen, 0.2  $\mu\text{m}$  Ausschnitt) (aus Deng 1999).

Kubische Strukturen wurden in zellularen und interzellularen Membranen beobachtet, wie zum Beispiel in Membranen von Mikrosomen (de Kruijff 1978, Stier 1978), Mitochondrien (Deng 1999, Abb. 5), in zwischenzellulären „Brücken“ (Pinto da Silva 1982) und in zahlreichen Bakterien detektiert (Meyer 1990). Proteine und Peptide können die Tendenz von Lipiden zur Bildung von nicht-lamellaren Phasen stark beeinflussen (Epand 1998 und Ref. darin), aber auch ein erhöhter Anteil von Lipiden mit einem hohen Packungsparameter kann die nicht-lamellaren Strukturen begünstigen.

### *Membran-Fusion*

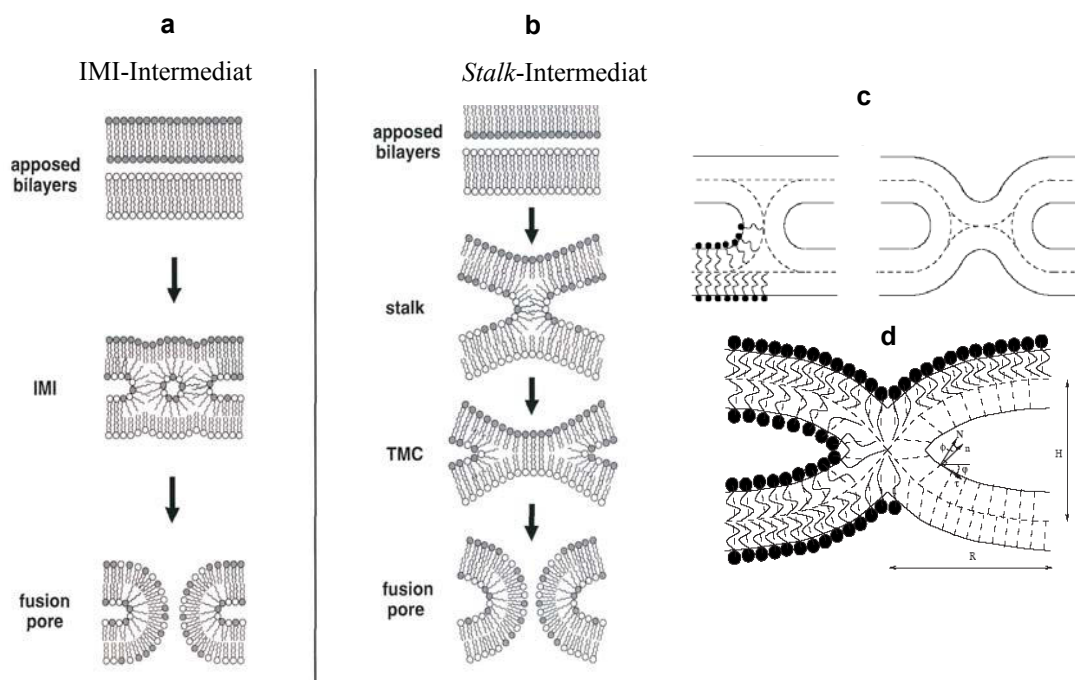
Die Membran-Fusion ist ein wichtiger Prozess in allen Zellen. Sie ist ein wichtiger Schritt bei Transport-Prozessen in und zwischen den Zellen, bei denen verschiedene Stoffe durch Membranen eingeschlossen und übertragen werden (*membrane traffic*). Auch die Spermie-Ei-Fusion, durch die das Leben beginnt, und die Virus-Zelle-Fusion, durch die das Leben enden kann, sind Beispiele von Membran-Fusionen. Der molekulare Mechanismus der Fusion wurde noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Viele verschiedene Modelle und Faktoren wurden diskutiert (Siegel 1987, Chernomordik 2003, Kozlovsky 2002).

Normalerweise sind Membranen mechanisch stabil, wogegen die Fusion drastische Änderungen in der lokalen Membranstruktur erfordert. Fusion-Intermediate stellen folglich eine energetische Barriere dar, die die Membran überwinden muss. Die Konfiguration dieser Zwischenstufe limitiert also die Wahrscheinlichkeit und die Geschwindigkeit dieses Vorganges. Die Modellierung von Fusion-Intermediaten hat eine Geschichte von mehr als zwei Dekaden (Chernomordik 1995). Es wurden mehrere Modelle diskutiert, allerdings nähert sich nur eines davon, das sogenannte *stalk*-Modell, am meisten der Realität (Siegel 1997). Bei diesem Modell mischen sich zwei gegenüber liegende Monoschichten zu einem *stalk*-Intermediat, das dann radial zu einem *trans monolayer contact* (TMC) expandiert. Die Expansion von TMC führt dann zu einem Bruch und Bildung einer Fusions-Pore (s. Abb. 6 für Details). Obwohl das Modell die Fusion qualitativ gut beschreibt, sagen theoretische Analysen eine zu hohe Energie für den *stalk* voraus (Kozlovsky 2002a,b), die die Membranen nicht überwinden können (auf der charakteristischen Skala der biologischen Fusion kann die Membran eine maximale Energie von ca. 40 kT überwinden (Kuzmin 2001)). Die große *stalk*-Energie resultiert aus den hydrophoben Lücken, die eine ungünstige Packung der Kohlenwasserstoffketten erfordern (Abb. 6c). Kozlovsky et al. haben ein modifiziertes Modell vorgestellt (Abb. 6d), das *stalk* und TMC vereinigt. Die hydrophoben „Löcher“ können hier durch Deformation der *stalk*-Struktur gefüllt werden. Dieses erfordert eine gleichzeitige Krümmung der Membran-Oberfläche und Biegung der Ketten. Das Modell

suggestiert eine lokale Zunahme der molekularen Unordnung und leichte Reduktion der Dicke der Lipid-Schicht während des Übergangs.

Die Energie des neuen *stalk/TMC*-Intermediats hängt erwartungsgemäß von der Art des Lipids und der Zusammensetzung der Membran ab. Für eine DOPC-Membran, die eine lamellare Struktur bevorzugt, liegt die Energie bei ca.  $45 \text{ kT}$  und somit ist hier die Fusion eine eher seltene Erscheinung. Für eine DOPE-Membran, die eine Neigung zur Bildung von invertierten Strukturen besitzt, errechnet sich die Energie zu ca.  $-30 \text{ kT}$ , was auf eine starke Fusions-Tendenz hindeutet (Kozlovsky 2002a).

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Struktur der Fusions-Pore und der Struktur von inversen kubischen Phasen (Ellens 1989, Siegel 1997, Yang 2002), deren Struktur als regelmäßige Anordnung von Fusionsporen aufgefasst werden kann. Die Bildung einer Pore erfordert eine Deformation der Doppelschicht mit einer negativen Gauss'schen Krümmung. Der Mechanismus der Membran-Fusion in den Zellen kann an Lipid/Wasser Modellsystemen untersucht werden, die eine Tendenz zur Ausbildung von kubischen Strukturen besitzen.



**Abbildung 6:** Membran-Fusions-Modelle: (a) *IMI-Modell*: Die Fusion verläuft über ein Interlamellares Mizellares Intermediat (IMI). Diese Mizelle führt dann direkt zu Bildung einer Fusions-Pore (manchmal als ILA, *interlamellar attachment*, bezeichnet). Das Modell ist energetisch unvorteilhaft. (b) *Stalk-Modell* (Siegel 1993, 1999): Planare lamellare Doppelschichten nähern sich und bilden einen *stalk* (lokale Verbindung zwischen den Monoschichten der fusionierenden Membranen), der radial expandiert und *trans*-Monoschichten zurücklässt. Diese bilden miteneinander eine Doppelschicht (TMC, Transmembrane Contact), deren hohe Energie durch das Reißen reduziert wird. So entsteht eine Fusions-Pore. (c) *Stalk* und TMC nach Siegel. d) Aktualisiertes Modell für *stalk* und TMC nach Kozlovsky. Die Strukturen sind axial-symmetrisch (Kozlovsky 2002).

### 2.1.4 Phasen-Identifikation: Röntgen-Kleinwinkelbeugung

Die beste experimentelle Technik zu Phasen-Identifikation ist die Röntgen-Kleinwinkelbeugung (SAXS), während andere Methoden wie Neutronstreuung, NMR, Infrarot- und Raman-Spektroskopie, DSC, Elektronmikroskopie, zusätzliche wertvolle Informationen liefern. Hier wird die Methode der Röntgenbeugung beschrieben, die Informationen über die Makrostruktur (Topologie) der Lipid-Membran liefert.

Die Röntgenstreuung liefert Informationen über periodische Nah- und Fernordnung der Lipide. Die Röntgenmessungen können entweder im Kleinwinkelbereich (Beugungswinkel  $2\theta < 2^\circ$ , SAXS) oder im Weitwinkelbereich ( $2\theta = 2-50^\circ$ , WAXS) durchgeführt werden. Die Zuordnung der Lipid-Phasen erfolgt durch die Analyse der Reflexfolgen im Kleinwinkelbereich, deren Positionen in einer Beziehung zu periodischen Abständen innerhalb der Lipid-Phase stehen. Das Auftreten konstruktiver Interferenzen ist an bestimmte geometrische Bedingungen geknüpft. Der Zusammenhang zwischen dem Streuvektorbetrag (reziproker Gitterabstand)  $s$ , dem Bragg-Winkel (halber Beugungswinkel)  $\theta$  und der Wellenlänge der Röntgenstrahlung  $\lambda$  wird durch die Bragg'sche Gleichung wiedergegeben:

$$s = 2 \sin \theta / \lambda \quad (6)$$

Die Struktur in multilamellaren Lipidsystemen kann man als eine quasi-eindimensionale periodische Struktur aus Lipid-Doppelschichten und Wasser ansehen. Ihr Diffraktionsmuster im Kleinwinkelbereich wird durch folgende Gleichung beschrieben, wobei  $n$  die Ordnung der Reflexe ist ( $n = 1, 2, \text{etc.}$ ):

$$s_{lam} = \frac{1}{a_{lam}} n \quad (7)$$

Die Reflexpositionen verhalten sich dabei wie 1:2:3:4....

Bei den Strukturen mit 3-dimensionaler kubischer Symmetrie werden Bragg-Reflexe bei

$$s_{hkl} = \frac{1}{a_{cubic}} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2} \quad (8)$$

beobachtet. Die ganzen Zahlen  $h, k, l$  sind die Millerschen Indizes und  $a_{cubic}$  ist die kubische Gitterkonstante.

Bei Phasen mit 2-dimensionaler hexagonaler Symmetrie gilt für die Position der Reflexe:

$$s_{hk} = (2/\sqrt{3}a_{hex}) \sqrt{h^2 + k^2 + hk} \quad (9)$$

mit Verhältnissen der Reflexpositionen von  $1, \sqrt{3}, 2, \sqrt{7}, 3, \sqrt{12}, \sqrt{13}, \dots$

Lipid-Membranen stellen teilgeordnete Strukturen dar (*soft matter*). Aufgrund der relativ großen thermisch induzierten Gitterstörungen dieser Strukturen beobachtet man - anders als bei „echten“ Kristallen - im Allgemeinen nur wenige Ordnungen der Reflexe.

Durch die Analyse der systematischen Auslöschung der Reflexe im Diffraktionsmuster kann man den Gittertyp bestimmen und durch das Verhältnis der Intensitäten die Raumgruppe ermitteln (kristallographische Tabellen). Für die 2D-Phasen gibt es nur 17 mögliche Gruppen, während für die 3D-Phasen 230 mögliche Raumgruppen existieren. Allerdings wurden nur wenige davon in lyotropen Lipid-Systemen beobachtet. Bislang wurden sieben kubische Phasen identifiziert. In Tabelle 2 sind die erlaubten Reflexe und deren Verhältnisse für diese kubischen Phasen aufgelistet. Wenn die  $h, k, l$  Werte zugeordnet sind, kann die Gitterkonstante der jeweiligen Struktur berechnet werden, und daraus die Strukturparameter der Phase.

**Tabelle 2:** Millersche Indizes ( $hkl$ ) und Verhältnis der Bragg-Reflex-Positionen von lamellaren und kubischen Lipid-Strukturen.

P4 <sub>3</sub> 32 (Q <sup>212</sup> )	Pm3n (Q <sup>223</sup> )	Pn3m (Q <sup>224</sup> )	Fm3m (Q <sup>225</sup> )	Fd3m (Q <sup>227</sup> )	Im3m (Q <sup>229</sup> )	Ia3d (Q <sup>230</sup> )	L	Verhältnis
							001	1
110	110	110			110			$\sqrt{2}$
111		111	111	111				$\sqrt{3}$
	200	200	200		200			2
210	210							$\sqrt{5}$
211	211	211			211	211		$\sqrt{6}$
220	220	220	220	220	220	220		$\sqrt{8}$
221		221						3
310	310	310			310			$\sqrt{10}$
311		311	311	311				$\sqrt{11}$
222	222	222	222	222	222			$\sqrt{12}$
320	320							$\sqrt{13}$
321	321	321			321	321		$\sqrt{14}$
400	400	400	400	400	400	400	011	4 (2)
410	410	410						$\sqrt{17}$
411	411	411			411			$\sqrt{18}$
331		331	331	331				$\sqrt{19}$
420	420	420	420		420	420		$\sqrt{20}$
421	421	421						$\sqrt{21}$
332		332			332	332		$\sqrt{22}$

### Analyse der Strukturparameter

Bei Kenntnis der Molmasse des Lipids  $M_l$ , der Volumenbrüche des Wassers  $\phi_w$  und des Lipids  $\phi_l$  und des spezifischen Volumens der Komponenten  $v_l$  und  $v_w$ , kann man weitergehende molekulare Strukturinformation aus der Gitterkonstante  $a$  erhalten. Hierbei wird als Näherung vorausgesetzt, dass die Phase in einen Lipidbereich und einen Wasserbereich aufgeteilt werden kann, die sich gegenseitig nicht durchdringen.

*Lamellare Phase.* Die lamellare Gitterkonstante  $a_{lam}$  setzt sich aus der Dicke der Wasserschicht  $d_w$  und der Dicke der Lipid-Doppelschicht  $d_{bilayer}$  zusammen; somit kann die Dicke der Wasserschicht  $r_w$  und die Querschnittsfläche der Kopfgruppen  $A_{lam}$  unter Annahme zylindrischer Geometrie der Moleküle berechnet werden ( $V_l$  ist das Lipid-Volumen,  $N_A$  ist die Avogadro-Konstante):

$$r_w = a_{lam} - d_{bilayer} \quad (10)$$

$$A_{lam} = \frac{V_l}{l} = \frac{M \cdot v_l}{N_A \cdot l} \quad (11)$$

Für die Lipidlänge  $l$  gilt folgende Beziehung (Caffrey 1994):

$$l = \frac{a_{lam}}{2[1 + (v_w/v_l)(\phi_w / \phi_l)]} \quad (12)$$

*Hexagonale Phasen.* Ist die hexagonale Gitterkonstante bekannt, so lässt sich der Radius des Wasser-Zylinders  $r_w$  und die von einem Lipid-Molekül beanspruchte Querschnittsfläche  $A(r_w)$  an der Wasser-Lipid Grenzfläche bestimmen:

$$r_w = a_{hex} \sqrt{\frac{2\phi_w}{\pi\sqrt{3}}} \quad (13)$$

$$A(r_w) = \frac{2\phi_w V_l}{r_w(\phi_l)} \quad (14)$$

*Kubische Phasen.* Der Struktur der hier betrachteten kubischen Phasen liegt eine Minimalfläche (IPMS) zu Grunde (Abschnitt 2.1.1), wobei die IPMS in der Mitte der Lipid-Doppelschicht verläuft. Für kubische Phasen wurde gezeigt, dass die Fläche  $A$  pro Einheitszelle im Abstand  $\xi$  von der Minimalfläche in einem Zusammenhang mit der experimentell zugänglichen Gitterkonstante  $a$  steht (Anderson 1988):

$$A(\xi) = A_0 a^2 + 2\pi\chi\xi^2 \quad (15)$$

Hierin ist  $A_0$  die Größe der Minimalfläche pro Einheitszelle und  $\chi$  die Euler-Poincaré Charakteristik. Mit Hilfe dieser Parameter können die kubischen Phasen geometrisch charakterisiert werden (Tabelle 1). Die Querschnittsfläche  $A_{mol}$  eines Lipidmoleküls im

Abstand  $\xi$  von der Minimalfläche bekommt man durch Dividieren von  $A$  durch die Anzahl der Lipidmoleküle in der Einheitszelle,  $(1 - \phi_w)a^3 / 2V_l$ :

$$A_{\text{mol}}(\xi) = \frac{2A(\xi)V_l}{(1 - \phi_w)a^3} \quad (16)$$

Damit kann man die Querschnittsfläche eines Lipidmoleküls in unterschiedlichen Abständen von der Mitte der Lipid-Doppelschicht bestimmen. Da die Kopfgruppen in invertierten kubischen Strukturen in Richtung der Wasser-Phase gekrümmt sind, nimmt die Querschnittsfläche pro Lipid vom Kopf zur Kohlenwasserstoffkette hin zu und erreicht null im Zentrum des Wasserkanals.  $\xi$  stellt dann die Summe aus dem Kanal-Radius  $r_w$  und der Lipidlänge  $l$  dar. Durch die Umformung der Gl. (15) kann folglich der Radius des Wasserkanals abgeschätzt werden:

$$r_w = \left( -\frac{A_0}{2\pi\chi} \right)^{1/2} a - l \quad (17)$$

Folgender Zusammenhang gilt für den Volumenanteil des Lipids in einer homogenen kubischen Phase:

$$\phi_l = 2A_0 \left( \frac{l}{a} \right) + \frac{4\pi\chi}{3} \left( \frac{l}{a} \right)^3 \quad (18)$$

Die Lipidlänge  $l$  kann nach der Lösung der oberen Gleichung berechnet werden:

$$\frac{l}{a} = 2\sqrt{-\left(\frac{A_0}{2\pi\chi}\right)} \cdot \cos \left[ \frac{1}{3} \left( \arccos \left( -\frac{3\phi_l}{8\pi\chi\sqrt{\left(\frac{A_0}{2\pi\chi}\right)^3}} \right) + 2\pi k \right) \right], \quad k = 2 \quad (19)$$

### 2.1.5 Untersuchung der molekularen Eigenschaften von Lipiden: FT-IR Spektroskopie

FT-IR-Spektroskopie wird erfolgreich eingesetzt, um molekulare und konformationsabhängige Eigenschaften von Lipiden zu untersuchen. Die charakteristischen Absorptionsbanden von Lipiden sind in Tabelle 3 dargestellt. Eine detaillierte Interpretation der IR-Spektren von charakteristischen organischen Gruppen ist in Mayo et al. zu finden (Mayo 2004).

*Hydrophobe Region.* Die Schwingungsfrequenzen der Kohlenwasserstoffgruppen in den Alkylketten sind von der Konformation und der Packung der Lipidketten abhängig. So nimmt

die Frequenz der antisymmetrischen ( $\sim 2849 \text{ cm}^{-1}$ ) und symmetrischen ( $\sim 2917 \text{ cm}^{-1}$ ) Methylen-Streckschwingung ( $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  und  $\nu_s(\text{CH}_2)$ ) während des Phasenüberganges von der geordneten Gelphase in die ungeordnete flüssigkristalline Phase zu. Der Grund hierfür ist die Zunahme der repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Ketten.

Auch die Methylen-Deformationsschwingungen, wie *scissoring*  $\delta(\text{CH}_2)$ , *wagging*  $\delta(\text{CH}_2)$  und *rocking*  $\gamma(\text{CH}_2)$ , reagieren empfindlich auf die Konformationsänderungen der Alkylketten. Zum Beispiel wird die *scissoring*  $\delta(\text{CH}_2)$ -Schwingung in geordneter Phase in zwei Komponenten bei ca.  $1473$  und  $1463 \text{ cm}^{-1}$  aufgespalten. Ihre genaue Wellenzahl hängt von der Art der geordneten Phase ab. Die Methylen-Kippschwingung,  $\omega(\text{CH}_2)$ , ist in geordneten Phasen in mehrere Komponenten im Bereich zwischen  $1350$  und  $1180 \text{ cm}^{-1}$  aufgespalten, jedoch ohne charakteristische Bandenlage. In ungeordneten Phasen dagegen ist die Schwingung in drei Teilbanden bei  $1368$ ,  $1353$  und  $1341 \text{ cm}^{-1}$  aufgespalten, die den *kink* (*gtg*), *double-gauche* (*dg*) und *end-gauche*  $\text{CH}_2$ -Konformeren zugeordnet werden können. Eine quantitative Betrachtung der Ketten-Konformation wird durch Analyse der Methylen-Kippschwingung ermöglicht. Die Banden werden mit gemischten Gauß-Lorenz Funktionen angepasst und die Flächenanteile dieser Banden ermittelt. Zur Normierung wird die Intensität der konformationsunabhängigen *umbrella*  $\delta(\text{CH}_3)$ -Schwingung bei  $1378 \text{ cm}^{-1}$  verwendet. Die Methyl-Streckschwingungen  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$  und  $\nu_s(\text{CH}_3)$  spiegeln Änderungen in der Orientierungsordnung der Ketten in der Mitte der Lipid-Doppelschicht wieder.

*Hydrophile Region.* Die Analyse der C=O Streckschwingung bei  $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$  kann herangezogen werden, um die Hydratisierung der Carbonyl-Gruppen zu untersuchen. Die Wellenzahl der Schwingung hängt stark von der Hydratisierung der Carbonyl-Gruppe ab. Eine nicht-wasserstoffgebundene C=O Gruppe absorbiert bei höheren Wellenzahlen als die wasserstoffgebundene. Die Banden können mit Gauß-Lorenz-Funktionen angepasst und die Flächenanteile der beiden Komponenten bestimmt werden. In Phospholipiden wird zu diesem Zweck die Phosphat  $\text{PO}_2^-$ -Streckschwingung analysiert.

Auch andere Schwingungsbanden von Lipiden sind interessant, wie zum Beispiel die antisymmetrische C-N-C-Streckschwingung bei  $\sim 971 \text{ cm}^{-1}$ , die bei Hydratation um  $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$  zunimmt, und die entsprechende symmetrische Schwingungen bei  $\sim 920$  und  $\sim 900 \text{ cm}^{-1}$ , die konformationsempfindlich sind und zur Ermittlung von *trans*- und *gauche*-Konformern von O-C-C-N Gruppen genutzt werden können.

Die symmetrischen Hydroxyl-Streckschwingungen von Glycerolipiden (bei  $\sim 1120$  und  $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ ) sind empfindliche Sonden für Änderungen im Bereich der Kopfgruppen.

**Tabelle 3:** Charakteristische Infrarot-Absorptionsbanden von Lipiden (s, stark; m, mittel; w, schwach).

Funktionelle Gruppe	Schwingung	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$
N-CH <sub>3</sub>	$\nu_{\text{as}}$	3038 (w)
<i>cis</i> -CH=CH	$\nu_{\text{as}}$	3010 (w)
CH <sub>3</sub>	$\nu_{\text{as}}$	2956 (s)
CH <sub>2</sub>	$\nu_{\text{as}}$	2920 (s)
CH <sub>3</sub>	$\nu_{\text{s}}$	2870 (s)
CH <sub>2</sub>	$\nu_{\text{s}}$	2850 (s)
C=O	$\nu$	1730 (s)
<i>cis</i> -CH=CH	$\nu_{\text{s}}$	1650 (m)
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	$\delta_{\text{as}}$	1630 (m)
COO <sup>-</sup>	$\nu_{\text{as}}$	1623 (s)
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	$\delta_{\text{s}}$	1571 (m)
N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	$\delta_{\text{as}}$	1485 (m)
CH <sub>2</sub>	$\delta$ <i>scissoring</i>	1473, 1463 (m)
CH <sub>3</sub>	$\delta_{\text{as}}$	1460 (m)
N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	$\delta_{\text{s}}$	1405 (m)
CH <sub>3</sub>	$\delta_{\text{s}}$ <i>umbrella</i>	1378 (m)
CH <sub>2</sub>	$\delta_{\text{s}}$ <i>wagging</i>	1200-1400 (w)
PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	$\nu_{\text{as}}$	1228 (s)
CO-O-C	$\nu_{\text{as}}$	1170 (m)
<i>sn2</i> C-OH	$\nu_{\text{s}}$	1120 (m)
PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	$\nu_{\text{s}}$	1085 (m)
C-O-CO	$\nu_{\text{s}}$	1070 (m)
C-O-P-O-C	$\nu$	1060 (m)
<i>sn3</i> C-OH	$\nu_{\text{s}}$	1050 (m)
N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	$\nu_{\text{as}}$	972 (m)
N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	$\nu_{\text{s}}$	920, 900 (m)
P-O	$\nu_{\text{as}}$	820 (m)
CH <sub>2</sub>	$\gamma$ <i>rocking</i>	720-730 (w)

## 2.2 Proteine: Struktur und Stabilität

Proteine sind quantitativ und qualitativ die wichtigsten Komponenten aller biologischen Systeme, von niederen Prokaryoten bis zu hohen Eukaryoten. Jeder Organismus enthält eine große Vielfalt von spezifischen Proteinen, entsprechend der Zahl der verantwortlichen Gene in Chromosomen. Die Anzahl variiert von wenigen hundert Protein-Arten in Bakterien bis zu mehreren tausend bei Tieren und Menschen. Proteine sind bei allen biologischen Prozessen beteiligt. Die meisten chemischen Reaktionen sind durch Enzyme katalysiert; Proteine transportieren und lagern eine weite Palette an Ionen, Elektronen und kleinen Molekülen. Sie

regulieren hormonelle Aktivität und in Form von Antikörpern schützen sie den Organismus. Sie nehmen an der Signal-Transduktion teil und spielen eine wichtige Rolle bei der Gen-Transkription und -Translation. Außerdem sind Proteine als Bausteine für die mechanische Unterstützung und die Architektur in und zwischen den Zellen essenziell. Proteine sind auch für viele (unheilbare) Krankheiten verantwortlich.

### 2.2.1 Protein-Struktur

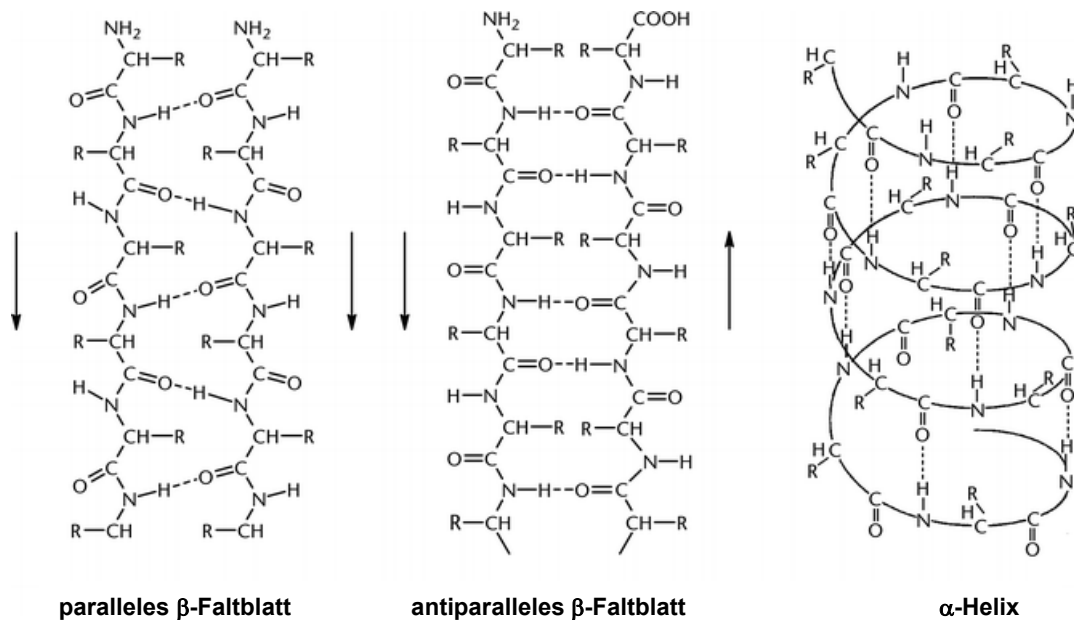
Bei Proteinen werden mehrere Strukturebenen unterschieden. Unter Primärstruktur wird die Sequenz der Aminosäuren in der Peptidkette verstanden, die die höheren Strukturebenen spezifiziert. Die *Sekundärstruktur* wird durch die nicht-kovalenten Bindungen stabilisiert. Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen, die den größten Beitrag zu Protein-Stabilität leisten sind hierfür ausschlaggebend. Unter *Tertiärstruktur* wird die Makrokonformation der gesamten Polypeptidkette verstanden. Sie umfasst die gesamte räumliche Anordnung unter Berücksichtigung der Seitenketten der Aminosäuren. Durch Bildung von Assoziaten aus mehreren Peptiden kommt es zur Ausbildung der *Quartärstruktur* eines Proteins. Sie beschreibt die gegenseitige räumliche Anordnung dieser Untereinheiten zueinander.

$\beta$ -Stränge sind an den  $C_{\alpha}$ -Atomen gefaltet (Minimierung der sterischen Abstoßung der Seitenketten) und haben eine zickzack-artige Anordnung, bei der die Peptidbindungen benachbarter Aminosäuren in entgegengesetzte Richtung zeigen, ebenso die Seitenketten (senkrecht zur Ausrichtung der CO-NH-Gruppen). Daher sind sie wesentlich gestreckter als eine  $\alpha$ -Helix (Abstand: 6.8 Å entlang des Stranges). Im  $\beta$ -Faltblatt liegen einzelne  $\beta$ -Stränge (bis zu 6 Stränge) entweder parallel oder antiparallel zueinander und sind durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden (Abb. 7). Die meisten Faltblätter sind verdrillt, wobei parallele Faltblätter weniger verdrillt sind als antiparallele und somit etwas instabiler. Die Richtung der  $\beta$ -Stränge kann geändert werden, indem Schleifen zwischen C=O und H-N der Aminosäuren  $i$  und  $i+3$  oder  $i+2$  gebildet werden.

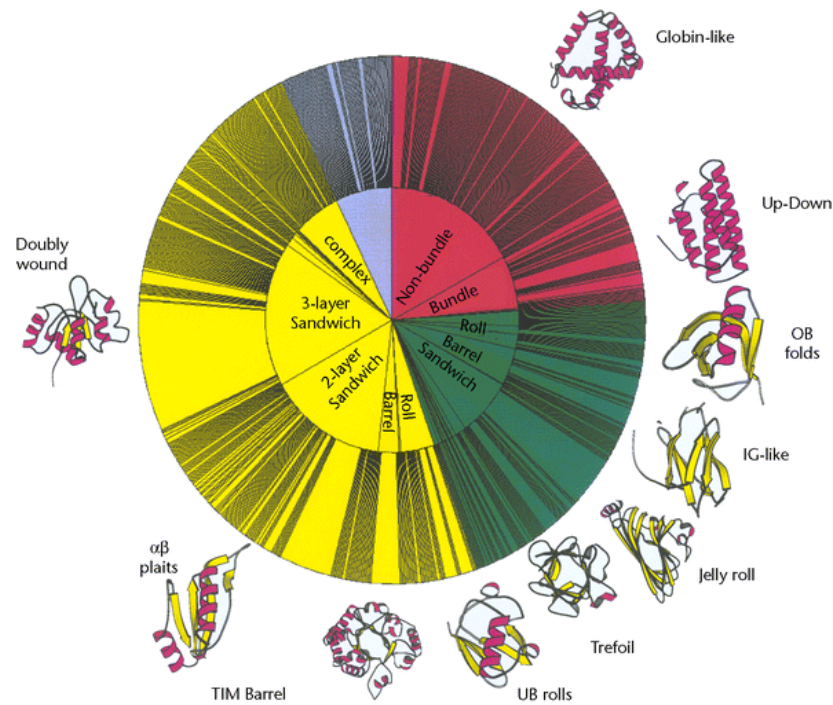
In der  $\alpha$ -Helix ist die Peptidkette schraubenartig gewunden; aus energetischen Gründen (L-Aminosäuren) ist die rechtsgängige Helix begünstigt. Sie wird über Wasserstoffbrücken zwischen C=O und H-N der Aminosäuren  $i$  und  $i+4$  stabilisiert (Abstand: 5.4 Å entlang der Achse, 3.6 Aminosäuren pro Umdrehung). Es ergibt sich eine regelmäßige, stabile Anordnung und eine parallele Ausrichtung der Bindungsdipole. Die Wasserstoffbrücken sind hier im Allgemeinen schwächer als im  $\beta$ -Faltblatt, da sich - bedingt durch den Aufbau der  $\alpha$ -Helix - eine größere sterische Hinderung der Seitenketten ergibt. Bei der relativ seltenen  $3_{10}$ -Helix,

die weniger stabil als eine  $\alpha$ -Helix ist, werden H-Brücken zwischen C=O und H-N der Aminosäuren  $i$  und  $i+3$  gebildet (Abstand: 6.0 Å entlang der Achse). Die CO-NH-Dipole sind dabei nicht ideal entlang der Helixachse) ausgerichtet ( $30^\circ$  Abweichung).

Proteine lassen sich in vier verschiedene Klassen unterteilen (Abb. 8), die das Verhältnis zwischen den Sekundärstruktur-Elementen im Protein widerspiegeln: Überwiegend  $\alpha$ -helikale Proteine, überwiegend  $\beta$ -strukturierte Proteine, gemischte Klasse ( $\alpha + \beta$ ) und irreguläre Klasse. Die räumliche Anordnung der Sekundärstruktur-Elemente wird durch die sogenannte *Architektur* beschrieben. Zum Beispiel können  $\beta$ -Stränge in verschiedenen Geometrien auftreten, wie *barrel* oder *sandwich*. Eine Protein-Familie umfasst schließlich Proteine, die eine ähnliche Sequenz und Struktur haben.



**Abbildung 7:** Aufbau von parallelen und antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und der  $\alpha$ -Helix (aus Cozzone 2002).



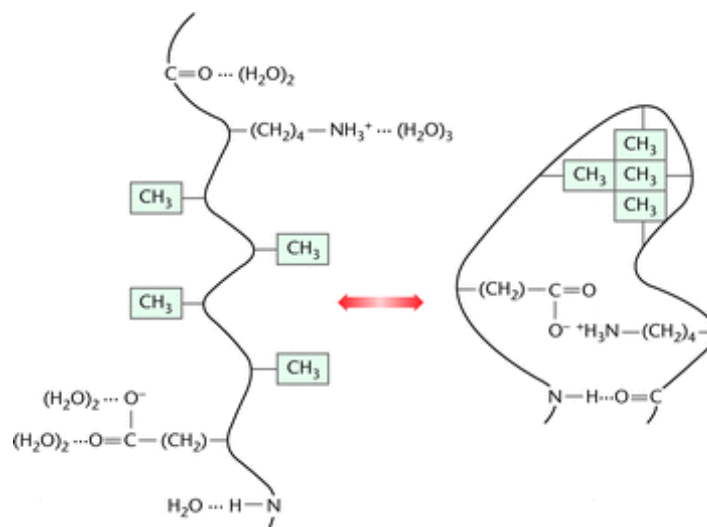
**Abbildung 8:** Klassifikation der Protein-Struktur. Protein-Klassen sind in Rot (überwiegend  $\alpha$ -helikal), Grün (überwiegend  $\beta$ -Faltblätter) und Gelb ( $\alpha+\beta$ ) dargestellt. In Blau ist die Klasse der irregulären Strukturen. Jede Klasse lässt sich weiterhin in die sog. *Architekturen* (innerer Kreis) und Faltungs-Familien (äußerer Kreis) unterteilen. Am Rand sind einige Repräsentanten der Familien abgebildet (CATH Datenbank, aus Pearl 2001).

### 2.2.2 Protein-Stabilität

Die native Protein-Struktur ergibt sich aus einem delikaten Gleichgewicht zwischen mehreren konkurrierenden Wechselwirkungen. Unter physiologischen Bedingungen ist die nativ gefaltete Form nur weniger stabiler als die entfaltete Form. Der energetische Unterschied zwischen dem entfalteten und nativen Protein beträgt oft nur 20-30 kJ/mol. Der thermodynamische Unterschied resultiert aus Beiträgen der nicht-kovalenten Wechselwirkungen (elektrostatische, Van-der-Waals, Wasserstoffbrücken-Bindungen) und des hydrophoben Effektes, die gegen die destabilisierende Kraft, die Konformationsentropie, antreten (Abb. 9). Diese Balance kann durch physikalische (Temperatur, Druck) und/oder chemische (pH-Wert, Denaturantien) Einflüsse gestört werden. Die Folge ist eine Entfaltung oder Missfaltung des Proteins, die zum Verlust der biologischen Aktivität bzw. zu bösartigen Veränderungen seiner Funktion führen kann.

*Hydrophober Effekt.* Der hydrophobe Effekt beschreibt die Beobachtung, dass die unpolaren Moleküle oder Gruppen sich in Wasser zusammenlagern, um den Kontakt mit Wasser zu minimieren. Da die hydrophoben Gruppen keine Wasserstoff-Bindungen mit Wasser bilden können, formen Wasser-Moleküle mehr oder weniger geordnete Eis-ähnliche Cluster um

diese Gruppen, was zu einer Reduktion der Entropie des Systems führt. Werden diese Gruppen zusammengelagert, nimmt die gesamte Wasser-Ordnung wieder ab. Normalerweise enthalten Proteine eine große Anzahl von hydrophoben Seitenketten, wie Phe, Ile und Leu, die zu ca. 80 % im Inneren des Moleküls verborgen werden. Dieser Protein-„Kern“ ist sehr dicht gepackt, die zwischenmolekulären Abstände ähneln mehr einem Festkörper als einer Flüssigkeit. Die hydrophoben Wechselwirkungen leisten nicht nur den Hauptbeitrag zu Protein-Stabilität, sie sind auch die wichtigsten Kräfte bei den nicht-kovalenten Protein-Protein Wechselwirkungen. Dafür sind dann die hydrophoben Bereiche an der Protein-Oberfläche verantwortlich.



**Abbildung 9:** Bildung einer Wasserstoffbrücke, eines Ionenpaares und eines hydrophoben Kontaktes in einem nativen Protein (Schematisch, aus Pace 2001).

*Wasserstoffbrücken-Bindungen.* Die Wasserstoff-Bindung ist eine schwache nicht-kovalente Wechselwirkung elektrostatischer Natur zwischen einem kovalent gebundenen Proton und einem freiem Elektronenpaar. Proteine haben mehrere chemische Gruppen, die als Proton-Donoren (N-H, O-H, S-H, C-H) und Akzeptoren ( $\text{O}=\text{}$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{N}=\text{}$ ,  $-\text{S}-$ ) agieren können. Die Stärke der Bindung hängt von Faktoren, wie Elektonegativität des Donors, Länge der Bindung, und dem Medium ab. Wasser hat eine große Dielektrizitätskonstante, und schwächt folglich die elektrostatischen Wechselwirkungen. Die freie Energie der Wasserstoffbrücken-Bildung in Wasser beträgt nur ca.  $-4$  kJ/mol. Die wichtigste Wasserstoff-Bindung ist zwischen dem Amid-Proton und dem Carbonyl-Sauerstoff ( $>\text{N}-\text{H} \dots \text{O}=\text{C}<$ ) und macht ca. 70 % aller Wasserstoffbrücken-Bildungen eines globulären Proteins aus. Die drei wichtigsten Sekundärstrukturen,  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Schleifen, werden durch diese Bindung stabilisiert (s. Abschnitt 2.2.1).

*Ionen-Paar Bildung.* Die polaren Seitenketten des Proteins können - je nach pH-Wert - ionisiert werden. Attraktive Wechselwirkungen zwischen zwei benachbarten ( $< 40 \text{ \AA}$ ) verschieden geladenen Gruppen werden Ionenpaare genannt (manchmal auch als Salzbrücken bezeichnet, falls die Bindung zusätzlich einen partiellen Wasserstoffbrücken-Charakter besitzt). Diese elektrostatischen Anziehungskräfte haben eine große Reichweite und hängen stark von der Dielektrizitätskonstante des Mediums ab. So sind die Wechselwirkungen in Hexan ca. 40 mal stärker als in Wasser. Bei der Protein-Entfaltung werden die ursprünglich kompakt an der Protein-Oberfläche konzentrierten Ladungen verteilt. Demzufolge nimmt die effektive Dielektrizitätskonstante zu, und die elektrostatischen Wechselwirkungen werden reduziert. Der Beitrag dieser Kräfte zur Protein-Stabilität ist relativ klein an der Oberfläche (0-4 kJ/mol) und wesentlich größer im Protein-Inneren (10-20 kJ/mol). Da aber nur ca. ein von fünf Ionenpaaren im Inneren verborgen ist, ist der Gesamtbeitrag zur Stabilität kleiner als der von Wasserstoffbrücken-Bindungen und hydrophoben Wechselwirkungen.

*Van-der-Waals Kräfte.* Van-der-Waals Kräfte sind Anziehungskräfte zwischen induzierten Dipolen (sog. Dispersionskräfte). Die Stärke dieser Wechselwirkungen, z. B. beschrieben durch das Lennard-Jones-Potential, nimmt mit sechster Potenz des Abstandes ab. Folglich wirken diese Kräfte nur auf kurzen Distanzen (unter  $7 \text{ \AA}$  zwischen den Atomzentren). In dicht gepackten Proteinen sind sie durchaus von Bedeutung und liefern einen Beitrag zum hydrophoben Effekt.

### 2.2.3 Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen: IR-Spektroskopie

In Proteinspektren im mittleren Infrarotbereich ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ) können verschiedene charakteristische Banden beobachtet werden, die den Schwingungen der Aminosäureseitengruppen und des Peptidrückgrates zugeordnet werden können (Susi 1972, Krimm 1986, Jung 2000) (Tabellen 4 und 5). Die Schwingungsmoden des Peptidrückgrates werden als Amid-Banden bezeichnet.

Die Lage der Amid I'-Bande, die zu  $\sim 76 \%$  aus der C=O Streckschwingung besteht, hängt von der Stärke der Wasserstoffbrücken im Peptidrückgrat ( $>N-H \cdots O=C<$ ) ab. Je stärker die Wasserstoffbrücke, desto mehr Elektronendichte wird von der Carbonylbindung abgezogen und desto kleiner wird die Frequenz ihrer Schwingung. In einem Protein, das gewöhnlich aus mehreren Sekundärstruktur-Elementen mit unterschiedlich starken H-Bindungen besteht, wird die Amid I'-Bande in mehrere Komponenten aufgespaltet (vgl. Abschnitt 2.2.1).

**Tabelle 4:** Charakteristische Schwingungsmoden von Proteinen.

Bezeichnung	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	Schwingung
Amid A	3300 (s)	$\nu(\text{NH})$
Amid B	3100 (s)	$\nu(\text{NH})$
Amid I	1600-1700 (s)	$\nu(\text{CO})$ (76 %), $\nu(\text{CN})$ (14 %), $\delta(\text{CCN})$ (10 %)
Amid II	1510-1580 (m)	$\delta(\text{NH})$ (43 %), $\nu(\text{CN})$ (29 %), $\delta(\text{CO})$ (11 %), $\nu(\text{CC})$ (9 %), $\nu(\text{NC})$ (8 %)
Amid III	1200-1400 (w)	$\delta(\text{NH})$ (55 %), $\nu(\text{CC})$ (19 %), $\nu(\text{CN})$ (15 %), $\delta(\text{CO})$ (11 %)
Amid V	610-710 (w)	CN <i>torsion</i> (66 %), $\delta(\text{NH})$ (34 %)

**Tabelle 5:** IR-Absorptionsbanden von Aminosäurenresten im Bereich von 1800 bis 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

Funktionelle Gruppe	Schwingung	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	
		In $\text{H}_2\text{O}$	In $\text{D}_2\text{O}$
Terminal COOH	$\nu$	1740 (m)	1720 (m)
Asp COOH	$\nu$	1716 (m)	1713 (m)
Glu COOH	$\nu$	1712 (m)	1706 (m)
Asn C=O	$\nu$	1678 (s)	1648 (s)
Arg $\text{CN}_3\text{H}_5^+$	$\nu_{\text{as}}$	1673 (s)	1608 (s)
Gln C=O	$\nu$	1670 (s)	1635 (s)
Arg $\text{CN}_3\text{H}_5^+$	$\nu_{\text{s}}$	1633 (m)	1586 (s)
Terminal $\text{NH}_3^+$	$\delta_{\text{as}}$	1631 (m)	
Lys $\text{NH}_3^+$	$\delta_{\text{as}}$	1629 (m)	
Asn $\text{NH}_2$	$\delta$	1622 (m)	
Gln $\text{NH}_2$	$\delta$	1610 (m)	
Tyr Ring- $\text{O}^-$		1602 (m)	
Terminal $\text{COO}^-$	$\nu_{\text{as}}$	1598 (m)	1603 (s)
His Ring		1596 (w)	1592 (s)
Asp $\text{COO}^-$	$\nu_{\text{as}}$	1574 (w)	
Glu $\text{COO}^-$	$\nu_{\text{as}}$	1560 (s)	1584
Terminal $\text{NH}_2$	$\delta$	1560 (s)	1567 (s)
Lys $\text{NH}_3^+$	$\delta_{\text{s}}$	1526 (m)	
Tyr Ring-OH		1518 (m)	1615 (m), 1515 (s)
Terminal $\text{NH}_3^+$	$\delta_{\text{as}}$	1515 (m)	
Tyr Ring- $\text{O}^-$		1498 (s)	1500 (s)
Phe Ring		1494 (w)	

*Bandenanalyse.* Durch eine Analyse der Amid I'-Bande können Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur des untersuchten Proteins gezogen werden. Durch theoretische Studien und Untersuchungen an Modellproteinen, deren Sekundärstruktur bekannt ist, wurden den einzelnen Sekundärstrukturelementen bestimmte Wellenzahlen im Amid I'-Bereich des FT-IR-Spektrums zugeordnet. Eine Übersicht dieser Zuordnung ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Durch bestimmte Kurvenanpassungsroutinen (*curve fit*) wird die Absorptionsbande nach der Levenberg-Marquardt Methode simuliert und so der prozentuale Anteil eines Strukturelements bestimmt. Zuerst wird die Ableitung des Spektrums gebildet und die Anzahl der unter der Amid I'-Bande liegenden Teilbanden sowie deren Wellenzahl-Maxima bestimmt. Dann wird die Bande durch FSD entfaltet (s. *Bandenauflösung*). An die entfaltete Bande werden Kurven angepasst, die üblicherweise aus einer Mischung von Gauß- und Lorentz-Funktionen bestehen. Eine ideale Absorptionsbande wird durch eine Lorentz-Kurve am besten beschrieben. Die Verbreiterung der Bande durch instrumentelle Einflüsse und intermolekulare Wechselwirkungen wird durch einen zusätzlichen Gauß-Anteil mathematisch kompensiert. Bei jeder Kurveniteration werden vier Peak-Parameter, maximale Intensität, Bandenmaximum, Halbwertsbreite und Gauß-Anteil, variiert, bis die Fit-Statistik das Optimum erreicht hat. So ergeben sich zum Beispiel bei einer Amid I'-Bande, die eine Überlagerung aus fünf darunter liegenden Banden darstellt, zwanzig Variablen. Da eine Iteration dann weder statistisch noch physikalisch sinnvolle Ergebnisse liefern kann, wird zuerst einer der Parametern fixiert (z. B. das Bandenmaximum), während die anderen iteriert werden (mit den anderen Parametern wird dann analog verfahren). Die Flächenanteile der einzelnen Banden werden anschließend bestimmt und Rückschlüsse über die Sekundärstruktur gezogen. Es lassen sich allerdings nur die relativen Änderungen der einzelnen Sekundärstruktur-Elemente bestimmen, da sich ihre Übergangsdipolmomente stark unterscheiden können.

**Tabelle 6:** Schwingungsmoden einzelner Sekundärstruktur-Elemente von Proteinen.

Sekundärstruktur-Element	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$
antiparallele $\beta$ -Faltblätter	$\sim 1680$ und $\sim 1618$
Schleifen	1660-1670
$\alpha$ -Helices	1650-1658
ungeordnete Strukturen	1640-1650
parallele $\beta$ -Faltblätter	1620-1635

*Bandenauflösung.* Wenn eine IR-Bande eine Überlagerung einzelner Schwingungen darstellt und physikalisch nicht auflösbar ist, werden mathematische Methoden zur Bandenauflösung herangezogen. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten: Die Fourier-Selbstentfaltung (*Fourier-self-deconvolution*, FSD) und die Bildung der zweiten Ableitung des Spektrums.

Eine Absorptionsbande lässt sich als Faltung einer Bandenformfunktion mit einer Bandenpositionsfunktion auffassen. Um die Auflösung des Spektrums zu erhöhen, wird durch FSD die Bandenbreite verringert. Dazu wird das experimentell bestimmte Spektrum mit der Formfunktion entfaltet (Kauppinen 1983), wobei Parameter wie die Halbwertsbreite der einzelnen Banden und der sogenannte Verstärkungsfaktor (Verhältnis zwischen der nicht-entfalteten und der entfalteten Bande) variiert werden. Die Halbwertsbreite liegt für Proteine im Bereich zwischen ca. 12 und 15  $\text{cm}^{-1}$  und der Verstärkungsfaktor liegt zwischen 1.1 und 2. Die maximale Verbesserung der Auflösung wird dabei durch die instrumentelle Auflösung und das Signal-Rausch-Verhältnis begrenzt. Die zweite Ableitung des Spektrums wird in dieser Arbeit dazu genutzt, um die Bandenmaxima vor der Bandensimulation (*curve fit*) zu finden.

Da Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) eine starke Absorption im Bereich der Amid I Bande aufweist, werden FT-IR Messungen in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt (der Lösungsmittelwechsel wird durch einen Strich im Namen der Bande (Amid I') angedeutet).

## 3 Experimentelle Durchführung

### 3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sowie deren Bezugsquellen sind in Tabelle 7 aufgeführt. *Wild-type* Prion-Protein von Maus (PrP<sup>23-231</sup>) wurde mit Hilfe der Rekombinant PCR Technik im *Escherichia coli*-Expressionssystem hergestellt und in pRSET plasmid geklont (Ausubel 1993, Zahn 1997). Für die Herstellung von Prion-Mutanten (PrP<sup>Δ51-90</sup> und PrP<sup>Δ32-121</sup>) wurden cDNA Fragmente ersetzt, wie bei Cordeiro et al. 2005 beschrieben. Human *wild-type* Transthyretin (TTR) wurde mit Hilfe der Rekombinant-Technik nach dem Protokoll von Lai et al. 1996 hergestellt. Transthyretin, Prion-Protein und die Prion-Mutanten wurden von Arbeitskreis Prof. J. Silva (Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro) hergestellt.

**Tabelle 7:** Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Chemikalie	Bezugsquelle
Deuteriumoxid	Aldrich, Taufenkirchen, Deutschland
Tris (Tris[hydroxymethyl]-aminomethan]	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
MES (2[N-Morpholino]-ethanesulfonic acid)	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzäure, deuteriert	Merck, Darmstadt, Deutschland
Prion-Protein (PrP <sup>23-231</sup> ), von Maus, rekombinant	Instituto Bioquimiva Medica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Prion-Mutant (PrP <sup>Δ51-90</sup> ), von Maus, rekombinant	Instituto Bioquimiva Medica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Prion-Mutant (PrP <sup>Δ32-121</sup> ), von Maus, rekombinant	Instituto Bioquimiva Medica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Transthyretin (TTR), human, rekombinant	Instituto Bioquimiva Medica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
E2DBS DNA	Instituto Bioquimiva Medica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
pGC DNA	Instituto Bioquimiva Medica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Insulin, von Rind	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
Cytochrom c, von Pferd	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
α-Chymotrypsin, von Rind	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
1-monooleoyl-rac-glycerol (MO)	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate (DOPA)	Avanti Polar Lipids, USA
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 3.2 Präparation

Die Zusammensetzung der Protein-Proben ist in Tabelle 8 aufgeführt, und die Zusammensetzung der Lipid-Proben in Tabelle 9 aufgelistet.

*PrP und TTR Proben.* Proteine wurden in D<sub>2</sub>O gelöst und dreifach lyophilisiert, um H<sub>2</sub>O und Salze weitgehend zu entfernen. Getrocknetes Protein wurde dann im entsprechenden Puffer gelöst.

*Insulin-Proben.* Insulin wurde ohne weitere Reinigung in D<sub>2</sub>O gelöst und der pD Wert mit DCI-Lösung auf 1.9 eingestellt. Die Proben wurden anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert, um den H/D Austausch zu ermöglichen.

*Cytochrom c und  $\alpha$ -Chymotrypsin Proben.* Diese Proteine wurden ohne weitere Reinigung im entsprechenden D<sub>2</sub>O-Puffer gelöst und 2-3 Stunden bei Raumtemperatur zwecks H/D Austausch gelagert.

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der Protein-Proben für FT-IR Experimente.

Protein	Konzentration	Temperaturabhängige Experimente	Druckabhängige Experimente
Prion-Protein ( <i>wild-type</i> PrP, PrP <sup><math>\Delta</math>32-121</sup> , PrP <sup><math>\Delta</math>51-90</sup> )	4 Gew.%	10 mM Phosphat-Puffer, 100 mM NaCl, pD 6.5	10 mM TRIS-Puffer, 100 mM NaCl, pD 7.5
Transthyretin (TTR)	4 Gew.%	10 mM Phosphat-Puffer, 100 mM KCl, pD 7.0 10 mM Phosphat-Puffer, 100 mM KCl, pD 5.0	10 mM TRIS-Puffer, 100 mM KCl, pD 7.5 10 mM MES-Puffer, 100 mM KCl, pD 5.0
Insulin	2 und 4 Gew.%	D <sub>2</sub> O/DCI, pD 1.9	D <sub>2</sub> O/DCI, pD 1.9
Cytochrom c	2 und 5 Gew.%	10 mM Phosphat-Puffer, pD 7.0	10 mM TRIS-Puffer, pD 7.0
$\alpha$ -Chymotrypsin	7 und 10 Gew.%	10 mM Phosphat-Puffer, pD 7.0	10 mM TRIS-Puffer, pD 7.0

*Protein-Einbau in MO.* Die Lipid-Proben werden hergestellt, indem eine entsprechende Menge an Monoolein bei ca. 35 °C geschmolzen und die Protein-Lösung zugegeben wird. Danach wird das Gemisch in flüssigem Stickstoff (-195 °C) eingefroren und 10 min im Wasserbad (30 °C) erwärmt. Dieser Zyklus wird so lange wiederholt, bis die Probe homogen erscheint. Anschließend wird die Probe durchmischt und ca. 5 min zentrifugiert. Bei Bedarf wird der letzte Schritt mehrmals wiederholt. Die fertige Probe zeichnet sich durch einen glasähnlichen Zustand aus, ist durchsichtig und homogen. Die Präparation von reinen Lipid-

Proben ohne Protein erfolgt auf die oben beschriebene Weise, die Hydratisierung von MO erfolgt jedoch mit einer Puffer-Lösung. Bei MO/DOPA Systemen werden die zwei Lipid-Komponenten im gewünschten Verhältnis gemischt und in  $\text{CHCl}_3$  gelöst, um eine homogene Verteilung der Lipid-Komponenten zu gewährleisten. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und die anschließende Präparation der Proben erfolgt wie bereits oben beschrieben. Die Präparationsweise und die Zusammensetzung der Proben ist bei den SAXS- und FT-IR-Untersuchungen gleich. Für alle Experimente wurden nur ausschließlich frische (vor dem Experiment präparierte) Proben verwendet.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung der MO/Protein/Wasser-Proben für SAXS und FT-IR Experimente. Der Wassergehalt beträgt 20 Gew.% in allen Proben.

System	DOPA-Konzentration	Protein-Konzentration	Temperaturabhängige	Druckabhängige
	/ Gew.%	/ Gew.%	Experimente	Experimente
MO/Cytochrom c	-	0, 0.02, 0.06, 0.2, 0.7, 2, 5, 7, 10	10 mM Phosphat- Puffer, pD 7.0	10 mM TRIS- Puffer, pD 7.0
MO/Insulin	-	0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4	$\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ , pD 1.9	-
MO/Chymotrypsin	-	0.1, 2, 5, 7, 10, 14	30 mM Phosphat- Puffer, pD 7.0	30 mM TRIS- Puffer, pD 7.0
MO/DOPA	0, 5, 10, 20, 40	-	30 mM Phosphat- Puffer, pD 7.0	-

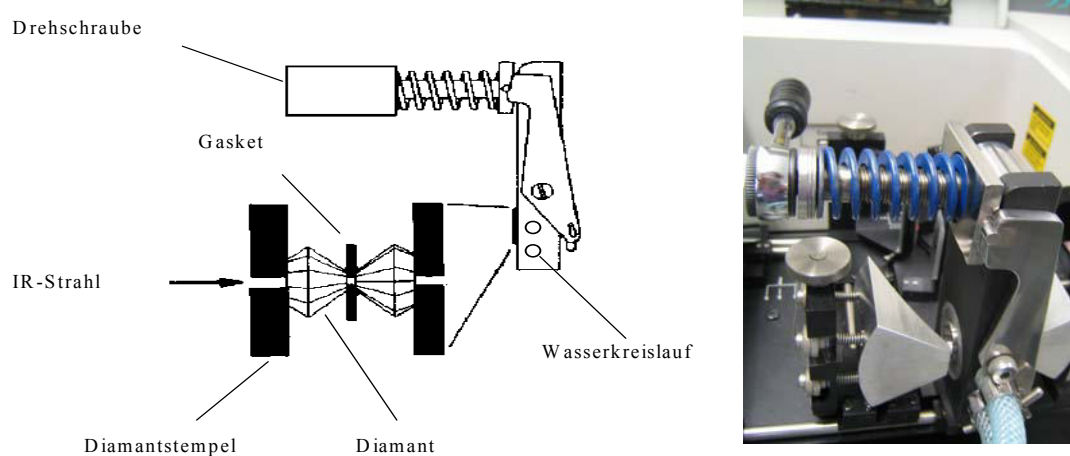
### 3.3 FT-IR Messungen

Die FT-IR Spektren werden mit einem Magna 550 FTIR-Spektrometer von Nicolet (Offenbach, Deutschland) aufgenommen, welches als Interferenzeinheit ein Michelson-Interferometer hat. Der Strahlteiler des Interferometers besteht aus Kaliumbromid (KBr). Als Detektor dient ein Stickstoff-gekühlter (Quecksilber-Cadmium-Tellur) MCT-A-Detektor, der für den Spektralbereich zwischen  $4000\text{ cm}^{-1}$  und  $650\text{ cm}^{-1}$  geeignet ist. Der Probenraum wird mit Wasser- und Kohlendioxid-freier Luft aus einem Adsorptionstrockner Typ 15 der Firma Zander (Essen, Deutschland) gespült. Als Referenz wird das Spektrum des  $\text{D}_2\text{O}/\text{Puffer}$ -Systems subtrahiert. Die FT-IR Spektren werden mit einer Auflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$ , was einem Datenpunktabstand von  $0.954\text{ cm}^{-1}$  entspricht, aufgenommen. Die Apodisierung erfolgt durch eine Happ-Genzel-Funktion. Für die temperatur- bzw. druckabhängigen Messungen beträgt die Blendenöffnung 9 bzw. 68. Bei den meisten Messungen werden 256 Interferogramme, und in Einzelfällen 512 Interferogramme addiert.

Die Fourierselbstentfaltung (FSD) und weitere Korrekturen der Spektren werden mit Hilfe der Software OMNIC 5.2 der Firma Nicolet (Madison/WI, U.S.A.) and GRAMS (Galactic, Salem NH, U.S.A. Offenbach, Deutschland) durchgeführt.

Die Temperaturmessungen werden in einer Zelle aus Stahl vorgenommen. Die Probe befindet sich zwischen zwei 4 mm dicken  $\text{CaF}_2$ -Fenstern mit einem Durchmesser von 25 mm, wobei durch einen ringförmigen Abstandshalter aus 20  $\mu\text{m}$  dicker Mylar-Folie ein Probenraum geschaffen wird. Zur Temperierung der Zelle dient ein Heizmantel.

Die Druckmessungen werden in einer Diamantstempelzelle der Firma High Pressure Diamond Optics Inc. (Tucson, Arizona, USA) durchgeführt (Abb. 10). Darin dienen zwei Diamanten des Typs II mit einem Oberflächendurchmesser von ca. 0.6 mm als Fenster. Diese Fenster sind in den spektralen Bereichen von  $38500\text{ cm}^{-1}$  bis  $2500\text{ cm}^{-1}$  und  $1800\text{ cm}^{-1}$  bis  $50\text{ cm}^{-1}$  durchlässig. Eine Stahlfolie mit einer 0.45 mm Bohrung dient als Abstandshalter zwischen den Diamanten. Die Dicke der Folie beträgt 20  $\mu\text{m}$  für Lipid-Proben und 50  $\mu\text{m}$  für die Protein-Lösungen. In die Bohrung werden bei der Messung ca. 50 nL Probe zusammen mit kristallinem Quarz gegeben.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Diamantstempelzelle (*diamond anvil cell, DAC*) für Hochdruck FT-IR.

Der Druck im Probenraum wird mechanisch durch Drehen eines Hebels erzeugt. Durch einen externen Kryostaten kann die Druck-Zelle temperiert werden. Der IR-Strahl wird mit einem Vierfach-Strahlkondensator von Spectra-Tech (Stamford, Connecticut, USA) auf den Probenraum fokussiert.

Der Druck in der Zelle wird mit Hilfe von kristallinem  $\alpha$ -Quarz bestimmt. Das IR-Spektrum von  $\alpha$ -Quarz weist drei charakteristische Phononen-Banden, bei  $\sim 695\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 780\text{ cm}^{-1}$  und

801 cm<sup>-1</sup>, auf. Zur Druckbestimmung wird die Verschiebung  $\Delta\tilde{\nu}$  der Bandenlage relativ zur Bandenlage unter Normaldruck, genutzt. Für die Bande bei 695 cm<sup>-1</sup> gilt folgende Beziehung (Siminovitch 1987):

$$p = \left[ 1.2062 \frac{\Delta\tilde{\nu}}{\text{cm}^{-1}} + 0.01504 \left( \frac{\Delta\tilde{\nu}}{\text{cm}^{-1}} \right)^2 \right] \text{ kbar} \quad (20)$$

Die Druckabhängigkeit der Bande bei 801 cm<sup>-1</sup> kann durch folgendes Polynom zweiten Grades beschrieben werden (Wong 1985):

$$p = \left[ 1.168 \frac{\Delta\tilde{\nu}}{\text{cm}^{-1}} + 0.0158 \left( \frac{\Delta\tilde{\nu}}{\text{cm}^{-1}} \right)^2 - 0.1660 \right] \text{ kbar} \quad (21)$$

Mit dieser Methode kann der Druck direkt in der Probe auf etwa  $\pm 300$  bar genau bestimmt werden.

### 3.4 SAXS Experimente an Synchrotron-Anlagen

Die SAXS Experimente wurden an den Synchrotron-Strahlungsquellen HASYLAB (Hamburger Synchrotronstrahlungslabor am DESY, Soft Condensed Matter Beamline A2), APS (Advanced Photon Source am Argonne National Laboratory in Chicago, BioCAT Beamline) und ESRF (European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble, ID2 High Brilliance Beamline) durchgeführt. Einige wichtige Parameter dieser Beamlines sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Kamera-Länge  $L$  ( $\approx$  Probe-Detektor-Abstand) und die Position des Beamstops, die die Detektor-Höhe  $D$  bestimmt, wurden so angepasst, dass der detektierbare Messbereich zwischen  $s = 0.001$  und  $0.05 \text{ \AA}^{-1}$  liegt (Gl. 22).

$$s_{\text{max(min)}} = 2 \frac{\sin \Theta_{\text{max(min)}}}{\lambda}, \text{ mit } \Theta_{\text{max(min)}} = \frac{1}{2} \arctan \frac{D_{\text{max(min)}}}{L} \quad (22)$$

Die CCD-Rohdaten werden auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der Detektor-Quadranten (Dark Exposure) und auf die Intensität des nicht-gestreuten Strahls normiert (Intensität der Ionisationskammer). Die Diffraktion-Intensität als Funktion des Beugungswinkels wird durch die radiale Integration des 2-D CCD Bildes mit Hilfe der FIT2D Software gewonnen. Die Daten werden anschließend mit Silber-Stearat ( $a = 48.68 \text{ \AA}$ ) kalibriert. Die Indizierung der Reflexe und die Berechnung der entsprechenden Gitterkonstanten werden vorgenommen, wie im Abschnitt 2.1.4 beschrieben (Winter 2000, Winter 2004).

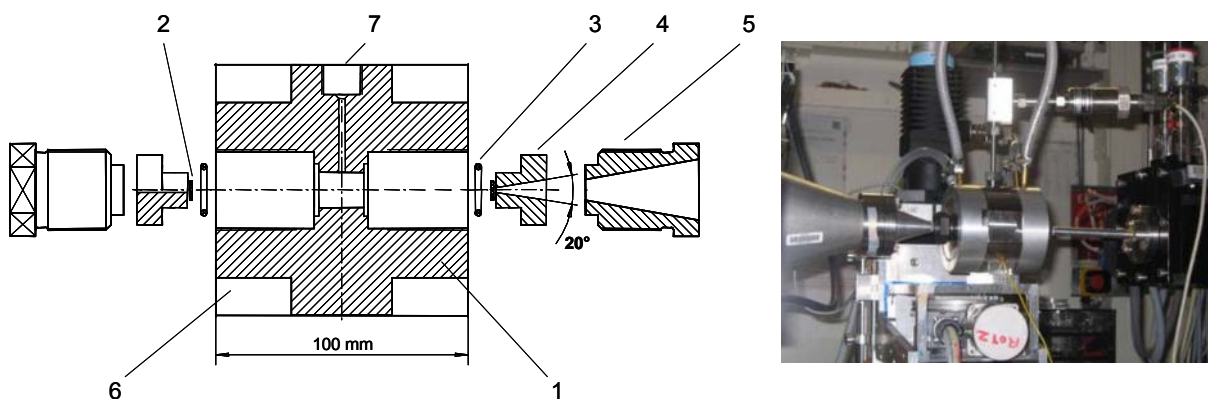
**Tabelle 10:** Charakteristiken der Synchrotron-Beamlines.

Parameter	Beamline A2, HASYLAB	BioCAT Beamline, APS	ID2 High Brilliance Beamline, ESRF
beam flux (an der Probe)	$10^8$ ph/s-mm	$5 \times 10^{14}$ ph/s-mm	$6 \times 10^{13}$ ph/s-mm
X-ray Energie	8.05 keV ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ )	13.8 keV ( $\lambda = 0.898 \text{ \AA}$ )	16.5 keV ( $\lambda = 0.751 \text{ \AA}$ )
Detektor	Mar-CCD (1024×1024 pixel)	Brandeis CCD (1024×1024 pixel)	FReLoN CCD (1024×1024 pixel)
Kamera-Länge	1 m	1.5 m	2.5 m
typische Belichtungszeit	60 s	1 s	10 - 100 ms

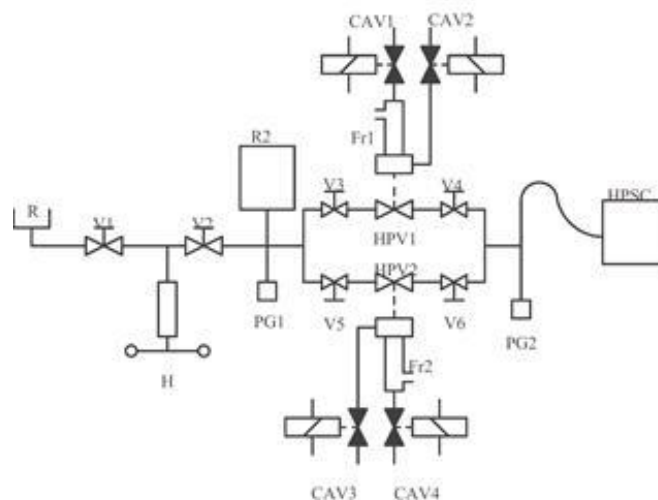
Für die statischen und kinetischen SAXS Experimente wurde eine Hochdruckzelle gebaut (Abb. 11), die für Experimente bis 7 kbar und 80 °C geeignet ist (Anfertigung der mechanischen Werkstatt, Universität Dortmund, FB Chemie). Die Zelle ist mit flachen polierten Diamantfenstern aus einem Naturdiamant Typ IIa mit einer Dicke von 0.8 bis 1 mm, Durchmesser von 6 mm und Orientierung [100] ausgestattet (Elementsix Advancing Diamond, Cuijk, Niederlande). Die Zelle hat eine Öffnung von 2 mm und eine maximale Probendicke von 1 mm, was für eine Fokussierung des Strahles und Justierung der Zelle an jeder Beamline ausreichend ist (eine größere Öffnung würde die Fensterbelastbarkeit unter Druck drastisch herabsetzen). Der Öffnungswinkel beträgt 20°, der maximal detektierbare Beugungswinkel  $2\theta$  ist somit 10°, was z. B. bei einer Wellenlänge von 1.54 Å einen theoretischen  $s_{\max}$ -Wert von  $0.12 \text{ \AA}^{-1}$  ergibt. Die Probe befindet sich in einem Teflonring, der beidseitig mit Mylarfolie mit einer Dicke von 20 µm festgeklebt ist und die Probe von dem Druckmedium (Wasser) trennt. Das Probenvolumen kann zwischen 8 und 30 µL durch Verwendung verschiedener Ringgrößen variiert werden. Die Zelle wird auf einem X,Y-Tisch fest montiert und im Strahl justiert (Abb. 11). Alle Experimente erfolgen mit demselben setup, mit der Ausnahme, dass für Messungen bei Raumdruck die Diamantfenster entfernt werden und der Strahl eventuell mit einem Al-Filter abgeschwächt wird. Die Druckerzeugung erfolgt über eine Spindelpresse, die über eine Stahlkapillare mit der Zelle verbunden ist (Woencckhaus 2000). Nadelventile riegeln die Apparatur gegenüber dem Atmosphärendruck ab. Zur Messung des Druckes wird ein elektronischer Sensor verwendet. Alle Hochdruck-Komponenten der Apparatur, außer der Zelle, sind von Nova Swiss (Efretikon, Schweiz). Der lineare Absorptionskoeffizient von Diamanten ist relativ hoch und hängt dabei stark von der Energie der Strahlung ab: z. B.  $2.8 \text{ cm}^{-1}$  bei 15.5 keV und  $16.1 \text{ cm}^{-1}$  bei 8.05 keV. Die Transmission durch 2 mm Diamant beträgt somit ca. 57 % bei 15.5 keV und nur ca. 4 % bei

8.05 keV, also erfordern solche Experimente Synchrotron-Strahlungsquellen mit hoher Brillanz (insbesondere für die Zeit-aufgelösten Experimente).

Zur Durchführung der kinetischen Experimente wurde eine Drucksprungapparatur entwickelt (Abb. 12), die es ermöglicht, Druckänderungen von mehreren 1000 bar innerhalb von ca. 7 ms in der Hochdruckzelle zu erzeugen (Woenckhaus 2000). Hauptbestandteile sind die oben beschriebene Hochdruckzelle mit Diamantfenstern, das Pneumatikventil, die Handpumpe mit Spindeltrieb und das Reservoir (Anfertigung der mechanischen Werkstatt, Universität Dortmund, FB Chemie).



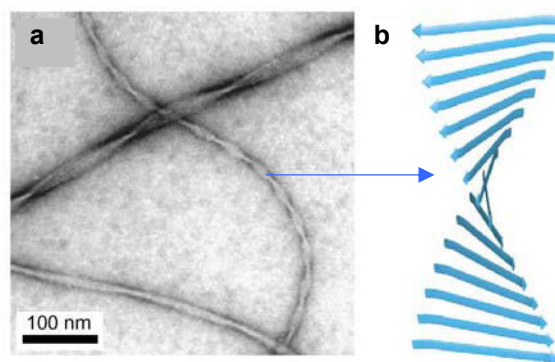
**Abbildung 11:** Hochdruckzelle für SAXS-Experimente: (1) Stahl-Körper aus NIMONIC 90, (2) Diamantfenster (Naturdiamant Typ IIa), (3) O-Ringdichtung aus Viton500, (4) Fensterträger (Fixierung des Diamanten mit Klebstoff Uhu Endfest300, 10 min Aushärtung bei 100 °C ergibt eine Zugfestigkeit von 2500 N/cm<sup>2</sup>), (5) Druckeschraube, (6) Heizmantel, (7) Druckanschluss für die 1/4" Kapillare (NovaSwiss, Schweiz). Die Probe befindet sich zwischen den Diamant-Fenstern in der Mitte der Zelle.



**Abbildung 12:** Schematischer Aufbau der Drucksprungapparatur: (V) Nadelventile, (CAV) Magnetventile, (Fr) Schnellentlüftungsventile, (H) Handpumpe mit Spindelvortrieb, (HPSC) Hochdruckzelle, (PG) Druckesensoren, (R) Reservoir, 20 ml (Woenckhaus 2000).

## 4 Amyloidogene Proteine

Eine ganze Reihe von Erkrankungen geht mit einer veränderten und damit pathogenen Form von körpereigenen Proteinen einher. In allen Fällen werden stabile, geordnete Ablagerungen körpereigener Proteine (sogenannte amyloide Aggregate) im extrazellulären Gewebe angesammelt, die letztendlich zu degenerativen Veränderungen der Organe führen. Es sind rund 20 verschiedene Proteine identifiziert, die in Amyloidosen involviert sind (Tabelle 11). Interessanterweise haben diese Proteine in der nativen Ausgangsform keine strukturellen, sequenziellen oder funktionellen Gemeinsamkeiten. Die pathogene Form ist allerdings bei allen sehr ähnlich und zeichnet sich durch eine charakteristische fibrillare Morphologie aus (Abb. 13). Abgesehen von der *cross*- $\beta$ -Faltblatt Struktur ist kaum etwas über die molekulare Struktur von Amyloid-Fibrillen bekannt (u. a. aufgrund der Tatsache, dass die nahezu unlöslich sind). Über den Mechanismus der Fibrill-Bildung wird heutzutage kontrovers diskutiert. Auch „normale“ Proteine, die *in vivo* nicht an Amyloidosen beteiligt sind, können *in vitro* Fibrillen bilden. Es ist sogar sehr wahrscheinlich, dass nahezu alle Proteine unter bestimmten Bedingungen Amyloide bilden können (Pertinhez 2001, Dobson 1999, Uverski 2004). Somit stellt sich die Frage, mit der sich die aktuelle Forschung auf diesem Gebiet beschäftigt: Was veranlasst die amyloidogenen Proteine zur Missfaltung und Bildung von überdimensionalen Aggregaten?



**Abbildung 13:** Protein-Fibrille: (a) EM-Aufnahme von A $\beta$ -Fibrillen; (b) schematische Darstellung eines *cross*- $\beta$ -Strukturmotivs. Die  $\beta$ -Faltblätter liegen fast senkrecht zur Fibrill-Achse, während die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Strängen fast parallel zur vertikalen Achse verlaufen (Tycko 2004).

**Tabelle 11:** Wichtigste amyloidogene Proteine, deren Struktur und die verursachte Erkrankung.

Protein	native Struktur (überwiegend)	Erkrankung	befallenes Organ
Prion-Protein (PrP) und seine Fragmente	N-terminale Domäne: ungeordnet, C-terminale Domäne: $\alpha$ -helikal	Creutzfeld-Jacob (CJD), Gerstmann-Straussler-Schneiker Syndrom (GSS), Fatal familial insomnia (FFI), Kuru, Scrapie, Bovine spongiform encephalopathy (BSE)	Gehirn
Amyloid- $\beta$ (A $\beta$ ) und seine Fragmente	ungeordnet	Alzheimer, cerebrovascular amyloidosis (HCHWA), Congophilic angiopathy	Gehirn, Rückenmark
Huntingtin	$\alpha$ -helikal	Huntington Disease	Gehirn
Ataxin-1	unbekannt	Spinocerebellar ataxia (SCA)	Gehirn, Rückenmark
Islet Amyloid Polypeptid (IAPP, Amylin)	ungeordnet	Neuronal intranuclear inclusion (NIID)	Zentrales und peripheres Nervensystem
Calcitonin	ungeordnet	Pancreatic islet amyloidosis bei Typ II Diabetes mellitus	Pankreas
Lysozym	$\alpha$ -helikal/ $\beta$ -Faltblatt	Medullary Carcinoma of the Thyroid (MCT)	Thyroid
Transthyretin (TTR, oder Prealbumin)	$\beta$ -Faltblatt	Hereditary systemic amyloidosis	vizerale Organe
Apolipoprotein A1	$\alpha$ -helikal	Senile systemic amyloidosis (SSA)	fast alle Organe (Herz, Arterien, Nieren, Leber etc.)
Tau-Protein	ungeordnet	familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), familial amyloidotic cardiomyopathy (FAC)	verschiedene Organe
$\alpha$ -Synuclein	ungeordnet	Hereditary systemic amyloidosis	Augen
Fibrinogen und seine Fragmente	$\beta$ -Faltblatt	Alzheimer's disease (AD), Pick's disease, Progressive supranuclear palsy (PSP)	Gehirn
Insulin	$\alpha$ -helikal	Parkinson's disease (PD), Diffuse Lewy bodies disease (DLBD), Dementia with Lewy bodies (DLB), Multiple system atrophy (MSA), Hallervorden-Spatz	Gehirn
		Hereditary renal amyloidosis	Nieren
		Injection-localized amyloidosis	Muskeln, Haut

Generell sind für die Amyloid-Bildung mindestens drei Hauptschritte notwendig: Destabilisierung des Proteins und Bildung eines partiell entfalteten Intermediates, Assoziation der Intermediate zu Oligomeren (Protofibrillen oder *nucleus*) und Bildung der Fibrillen. Die kritische Destabilisierung der nativen Struktur kann durch Mutationen, kleinen oder großen pH-Wert, Erwärmen, Druck-Einwirkung, organische Lösungsmittel, chemische Denatanten, Komplexbildung mit DNA oder Absorption an der Lipidmembran beschleunigt werden (Uversky 2004 und Ref. darin). Andererseits kann die Amyloid-Bildung durch Stabilisierung

der nativen Struktur gehemmt werden (z. B. durch spezifische Liganden-Bindung, wie 2,4-Dinitrophenol). Es ist also ein sehr komplexer Mechanismus und wahrscheinlich findet *in vivo* eine Überlagerung verschiedener Faktoren statt, sowohl struktureller als auch äußerer. Es ist allerdings äußerst schwierig, ein Intermediat unter physiologischen Bedingungen experimentell zu fassen und zu charakterisieren, da diese Spezies nur als kurzlebige Zwischenstufen existieren.

## 4.1 Prion-Protein: Mechanismus der Aggregation

### 4.1.1 Strukturelle und biologische Eigenschaften von Prion-Protein

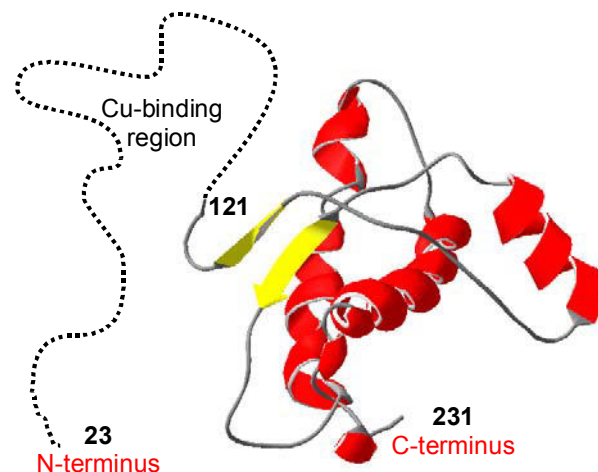
Prion-Krankheiten, oder *transmissible spongiform encephalopathies* (TSEs), zeichnen sich durch degenerative Schäden des zentralen Nervensystems aus, die sowohl eines genetischen als auch infektiösen Ursprungs sein können (Tabelle 11). Im Gegensatz zu allen anderen Amyloidosen treten Prionerkrankungen überraschenderweise auch als infektiöse Formen auf. Dem Krankheitsausbruch geht die Umwandlung des Prion-Proteins von seiner natürlichen physiologischen Form ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) in eine pathologische Isoform ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) voraus. Dabei scheint  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  posttranslational aus  $\text{PrP}^{\text{C}}$  gebildet zu werden.  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ist also ein wirtseigenes Protein und kein exogenes Produkt, was ein *novum* darstellt. Die Tatsache, dass ein Protein alleine als infektiöses, replizierendes Agent dienen soll, spricht gegen das zentrale Dogma der Molekularbiologie, wonach der Fluss der genetischen Information immer von der Nukleinsäure zum Protein verläuft. Bis heute konnten in infektiösen Präparationen keine Nukleinsäuren mit codierender Funktion identifiziert werden.  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  akkumuliert während des Krankheitsverlaufes und bildet amyloide Plaques im Hirn betroffener Individuen. PrP ist mit einem GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Anker an die Zellmembran gebunden und ist leicht löslich. Das  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  hingegen ist fast unlöslich und hat einen hohen  $\beta$ -Faltblatt-Anteil (Pan 1993). Während  $\text{PrP}^{\text{C}}$  von Proteasen leicht verdaubar ist, wird von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  nur die N-terminale Region abgeschaltet und der kompakte amyloide Rest ( $\text{PrP}^{27-30}$ ) ist gegen weitere Proteasen resistent (Caughey 1991). Die physiologische Bedeutung der normalen, zellulären Form des Prion-Proteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) ist immer noch unklar, aber auch die Rolle des abnorm gefalteten  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  ist unbekannt. Mäuse, die kein  $\text{PrP}^{\text{C}}$  exprimieren, entwickeln sich normal und sind gegenüber der Infektion mit Prionen resistent (Prusiner 1998).

Es gibt drei Modelle zur Vermehrung von Prionen. Die Theorie der *protein-only*-Hypothese besagt, dass die Konformationsänderung von der zellulären in die pathogene Struktur der relevante Schritt für die Prion-Vermehrung ist. Das sogenannte Heterodimer-Modell besagt, dass ein  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Molekül durch einen direkten Kontakt die Fehlfaltung eines  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Moleküls

induzieren kann. Dabei wird zunächst ein Heterodimer ausgebildet, das dann in ein Homodimer umgewandelt wird. Dieses Homodimer dissoziiert in zwei  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Moleküle, die für den nächsten Zyklus zur Verfügung stehen. Im keimabhängigen Polymerisationsmodell ist die Umwandlung von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  mit einer Anlagerung an  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Aggregate verbunden. Das entstehende  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Molekül ist alleine nicht stabil, sondern wird durch die Anlagerung an bereits bestehende Aggregate stabilisiert. Diese Polymere können wieder zerfallen und somit die Anzahl aktiver Keime erhöhen.

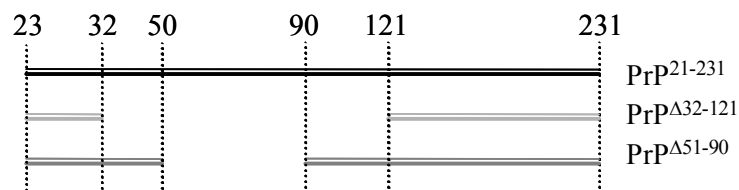
Trotz intensiver Forschung ist es bis jetzt nicht gelungen, infektiöse Spezies *in vitro* zu erzeugen. Das wäre ein Beweis für die *protein-only*-Hypothese. Daher kann ein Einfluss weiterer Faktoren, wie Nukleinsäuren, andere Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate, nicht ausgeschlossen werden. Für zusätzliche Faktoren spricht auch, dass Mäuse nicht oder nur mit langen Inkubationszeiten mit menschlichen Prionen infiziert werden können. Mäuse, die transgen für das menschliche PrP sind, sind ebenfalls nicht oder kaum mit menschlichen Prionen infizierbar. Dagegen sind transgene Mäuse, bei denen nur ein Teil des Maus-PrP durch menschliche PrP-Sequenzen ersetzt wurde, mit menschlichen Prionen infizierbar. Dennoch bleibt der Mechanismus der Prion-Umwandlung unbekannt.

PrP ist ein kleines monomeres Protein, bestehend aus einem ungeordneten flexiblen N-terminalen Region (23-120), und einem C-terminalen Kern (121-231), der in drei  $\alpha$ -Helices und ein kurzes antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt gefaltet ist und über eine Disulfidbindung zwischen der Helix 2 und 3 stabilisiert wird (Abb. 14) (Riek 1997).



**Abbildung 14:** Struktur von Prion-Protein (von Maus). Der N-terminale Segment 23-120 ist komplett ungeordnet, der kompakte C-terminale Kern 121-231 ist überwiegend  $\alpha$ -helikal (basierend auf NMR-Daten, PDB-Eintrag für 121-231: 1AG2).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass andere Makromoleküle, wie z. B. DNA, tatsächlich an der Amyloid-Bildung beteiligt sein können (Deleault 2003, Cordeiro 2001, Cordeiro 2005). Einige Punktmutationen am C-Terminus stehen vermutlich in Verbindung mit der genetischen Form der TSE (Prusiner 1998), sodass vermutet wird, dass diese Region für die Fibrillbildung und Vermehrung verantwortlich sind. Zum Beispiel ist die neurotoxische 90-145 Region für die Bildung der  $\beta$ -Faltblätter verantwortlich (Huang 1996). Die N-terminale Domäne enthält fünf Oktapeptid-Abschnitte (60-91) mit der Sequenz PHGGGWGQ, die bis fünf  $\text{Cu}^{2+}$  Kationen (bei pH 7.4) binden können (Brown 1997, Viles 1999). Die Komplexbildung mit  $\text{Cu}^{2+}$  hemmt die  $\text{PrP}^c \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$  Umwandlung *in vitro* (Bocharova 2005). Die zelluläre Lage von PrP unterstützt die Hypothese, dass die N-Domäne direkt mit dem exogenen  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  oder mit den Komponenten der extrazellulären Matrix wechselwirken kann (Priola 1994, Graner 2000, Martins 2002). Die Expression von amino-terminal trunziertem PrP ohne 32-121 oder 32-134 Regionen verursacht massive neurodegenerative Schäden in Mäusen, während die Entfernung von kürzeren Abschnitten, 32-80, 32-93 oder 32-106, keinen toxischen Effekt haben (Shmerling 1998).



**Abbildung 15:** Prion-Protein Mutanten. Die vertikalen Linien markieren trunzierte Aminosäuren.

In dieser Studie wird die Stabilität von *wild-type* PrP ( $\text{PrP}^{21-231}$ ) von Maus gegen physikalische Einflüsse, wie Temperatur und Druck, untersucht und mit zwei N-terminal trunzierten Mutanten,  $\text{PrP}^{\Delta 32-121}$  und  $\text{PrP}^{\Delta 51-90}$ , verglichen. Der ersten Mutante fehlt die N-terminale Domäne fast vollständig, während in der zweiten Mutante nur die Oktapeptid-Region entfernt wurde (Abb. 15). Besonderes Interesse richtet sich hier natürlich auf den molekularen Mechanismus der Aggregation. Druck als physikalischer Parameter bietet eine einzigartige Möglichkeit, die Hydratation und Packung von  $\text{PrP}^c$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  von verschiedenen Spezies zu untersuchen und zu vergleichen. Da unter Druck nur die Strukturänderungen begünstigt werden, die mit einem negativen Reaktionsvolumen verbunden sind, werden bevorzugt hydrophobe Gruppen solvatisiert und interne Hohlräume im Protein hydratisiert. Der Druckeinfluss kann zu einer Entfaltung führen oder auch zur Dissoziation von Oligomeren und Aggregaten. Folglich kann die Thermodynamik der druckinduzierten

Entfaltung von PrP<sup>c</sup> mit seinen Mutanten verglichen werden (Gl. 23) und missgefaltete Intermediate können eventuell „gefangen“ und charakterisiert werden.

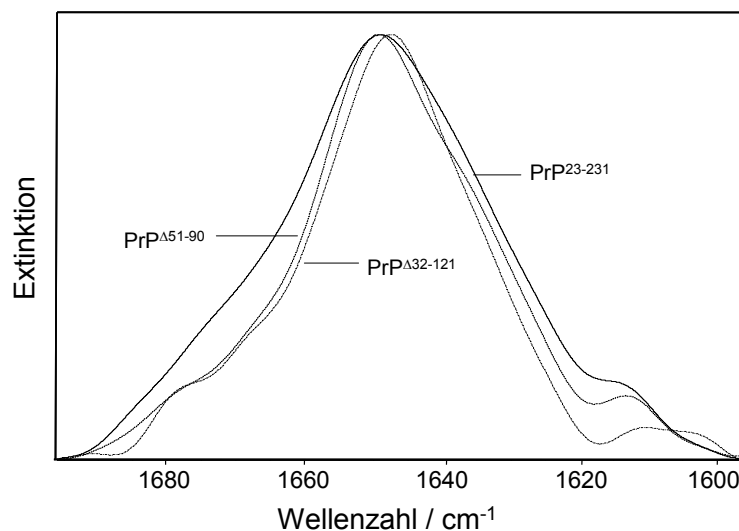
Die Volumenänderung  $\Delta V^0$  kann durch die Druckabhängigkeit der Änderung der Standard Gibbs-Energie  $\Delta G^0$  bzw. der Gleichgewichtskonstanten  $K_{eq}$  in einem Zweizustandsmodell beschrieben werden:

$$\Delta V^0 = \left( \frac{\partial \Delta G^0}{\partial p} \right)_T = -RT \left( \frac{\partial \ln K_{eq}}{\partial p} \right)_T \quad (23)$$

Das Zweizustandsmodell setzt voraus, dass nur zwei stabile Zustände (nativer und denaturierter Zustand) bestehen. Es ist somit für die viel komplexere Aggregationsprozesse nicht mehr gültig.

#### 4.1.2 Native Sekundärstruktur von wild-type PrP und seinen Mutanten

Zuerst wird die Sekundärstruktur von *wild-type* PrP (PrP<sup>23-231</sup>) und seinen beiden N-terminal trunkierten Mutanten FT-IR-spektroskopisch bestimmt. Dazu werden die charakteristischen Schwingungsbanden im Amid I'-Bereich, wie im Abschnitt 2.2.3 beschrieben, analysiert. Die ermittelten Strukturanteile beruhen dabei auf den gemessenen relativen Intensitäten und stellen nur die Intensitätsanteile dar. Die Amid I'-Banden von PrP<sup>Δ32-121</sup>, PrP<sup>Δ32-121</sup> und PrP<sup>Δ51-90</sup> bei 25 °C sind in Abbildung 16 vergleichend dargestellt.



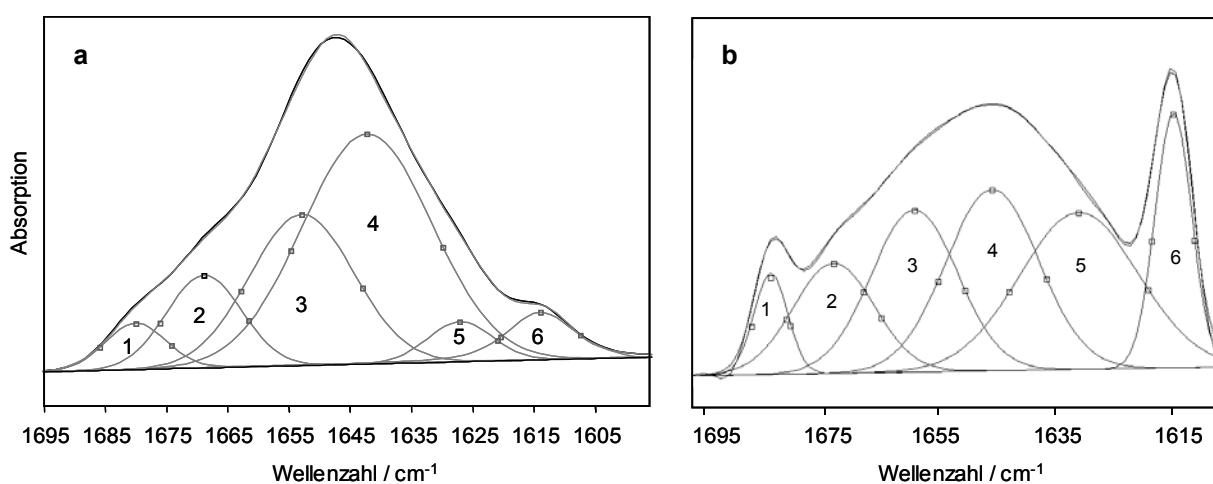
**Abbildung 16:** Amid I'-Bande von PrP<sup>23-231</sup>, PrP<sup>Δ32-121</sup> und PrP<sup>Δ51-90</sup> bei 25 °C (4 Gew.%, pD 6,5, 100 mM NaCl).

Um die Strukturanteile zu bestimmen, werden die Spektren im Bereich von 1596 bis 1710 cm<sup>-1</sup> mit einer Halbwertsbreite von 15 cm<sup>-1</sup> und einem Verstärkungsfaktor von 1.8 entfaltet und mit sechs Teilbanden gefittet, wie in Abbildung 17a exemplarisch für PrP<sup>23-231</sup> gezeigt ist.

Die genaue Zuordnung aller Wellenzahlen im Bereich der Amid I'-Bande ist in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12:** Bestimmte Sekundärstrukturen von PrP<sup>23-231</sup>, PrP<sup>Δ51-90</sup> und PrP<sup>Δ32-121</sup> in nativer (bei 25 °C) und aggregierter (12 h nach der Abkühlung von 80 auf 25 °C) Form. Fehler in der Bestimmung der Bandenlagen beträgt ± 1 cm<sup>-1</sup> und der Bandenflächen ± 2 %.

Struktur-Element	PrP <sup>C</sup>		PrP <sup>Δ51-90</sup> , nativ		PrP <sup>Δ32-121</sup> , nativ	
	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Fläche / %	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %
Schleifen	1668	11.3	1666	12.7	1668	11.3
α-Helices	1651	25.5	1652	36.9	1651	41.9
ungeordnet	1642	48.5	1639	33.4	1641	32.3
intramolekulare β-Faltblätter	1628	4.2	1627	6.7	1630	9.5
intermolekulare β-Faltblätter	1680, 1613	4.6	1679, 1613	10.3	1679, 1611	5.0
Struktur-Element	PrP <sup>Sc</sup>		PrP <sup>Δ51-90</sup> , aggregiert		PrP <sup>Δ32-121</sup> , aggregiert	
	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %
Schleifen	1670	13.9	1670	7.7	1670	10.2
α-Helices	1657	21.4	1659	14.0	1659	10.7
ungeordnet	1645	19.6	1646	19.1	1646	25.6
intramolekulare β-Faltblätter	1632	25.7	1629	24.2	1630	22.5
intermolekulare β-Faltblätter	1682, 1616	19.3	1681, 1612	35.0	1681, 1612	31.0



**Abbildung 17:** Bandenanalyse der Amid I'-Region von PrP<sup>C</sup> (a) und PrP<sup>Sc</sup> (b). Die Banden wurden mit sechs Gauß-Lorentz-Funktionen angepasst: (1, 6) antiparallele intermolekulare β-Faltblätter, (2) Schleifen, (3) α-Helices, (4) ungeordnete Strukturen, (5) intramolekulare β-Faltblätter.

Das native Prion-Protein besteht demnach aus 11.3 % Schleifen, 25.5 %  $\alpha$ -Helices, 48.5 % ungeordneten Strukturen, 10.5 %  $\beta$ -Strängen und 10.5 % antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mit  $\pm 2$  % Abweichung. Der Vergleich mit klassischen Struktur-Bestimmungsmethoden, wie Röntgen-Kristallographie oder NMR-Spektroskopie gestaltet sich hier als schwierig, da keine Röntgenkristallstruktur für das *wild-type* PrP<sup>23-231</sup> von Maus bekannt ist und die NMR-Methode nur die Struktur des geordneten C-terminalen Fragments liefern kann. Es wurde durch vergleichende NMR-Untersuchungen gezeigt, dass sowohl die 3-D Struktur als auch die  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur der C-terminalen Domäne PrP<sup>121-231</sup> im PrP<sup>23-231</sup> erhalten bleibt (Riek 1997). Die Auswertung der NMR-Struktur von PrP<sup>121-231</sup> (PDB-Eintrag: 1AG2.pdb) und Hinzurechnung des N-terminalen Segments 23-120 (unter der Annahme, dass das Segment komplett ungeordnet ist) ergibt folgende Sekundärstrukturanteile: 10.0 % Schleifen, 25.8 %  $\alpha$ -Helices, 62.2 % ungeordnete Strukturen und 1.9 %  $\beta$ -Stränge (Tabelle 12). Die FT-IR-spektroskopisch bestimmten Anteile stimmen damit in Rahmen der Messgenauigkeit überein. Nur bei ungeordneten Strukturen werden 48.5 % gegenüber 62.2 % beobachtet, wahrscheinlich zugunsten der  $\beta$ -Faltblätter. Allerdings muss hier darauf hingewiesen werden, dass die relativen Intensitäten in der FT-IR Spektroskopie nicht unbedingt die tatsächlichen Anteile widerspiegeln, da die Übergangsdipolmomente der einzelnen Sekundärstrukturelemente verschieden sein können.

Beim Vergleich der Amid I'-Region von Mutanten und *wild-type* PrP fällt auf, dass die Spektren etwas unterschiedlich sind. Mit zunehmender Eliminierung von N-Terminus nimmt die Bandenbreite ab, was ein Hinweis darauf ist, dass immer weniger ungeordneter Strukturen vorhanden sind. Die Bestimmung der Sekundärstruktur der Mutanten erfolgt analog der von PrP<sup>23-231</sup>. Die Bandenlagen und entsprechende Flächenanteile sind in Tabelle 13 aufgelistet. Wie erwartet, verändert sich die Sekundärstrukturverteilung durch die Verkürzung des N-terminus. Die helikalen Strukturen nehmen von 25.5 % in PrP<sup>23-231</sup> über 36.9 % in PrP <sup>$\Delta$ 51-90</sup> auf 41.9 % in PrP <sup>$\Delta$ 32-121</sup> zu, während die ungeordneten Strukturen von 48.4 % in PrP<sup>23-231</sup> über 33.3 % in PrP <sup>$\Delta$ 51-90</sup> auf 32.3 % in PrP <sup>$\Delta$ 32-121</sup> abnehmen. Die Sekundärstruktur der C-Domäne wird offensichtlich nicht beeinflusst, wie der Vergleich der experimentell bestimmten mit den berechneten Werten zeigt (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Berechnete Sekundärstruktur von *wild-type* PrP, PrP<sup>Δ51-90</sup> und PrP<sup>Δ32-121</sup> (basierend auf NMR-Daten, PDB-Eintrag für PrP<sup>121-231</sup>: 1AG2). Es wird angenommen, dass die trunkierten Aminosäuren nur den Anteil der ungeordneten Strukturen reduzieren und die Struktur des C-terminalen Kerns nicht beeinflussen.

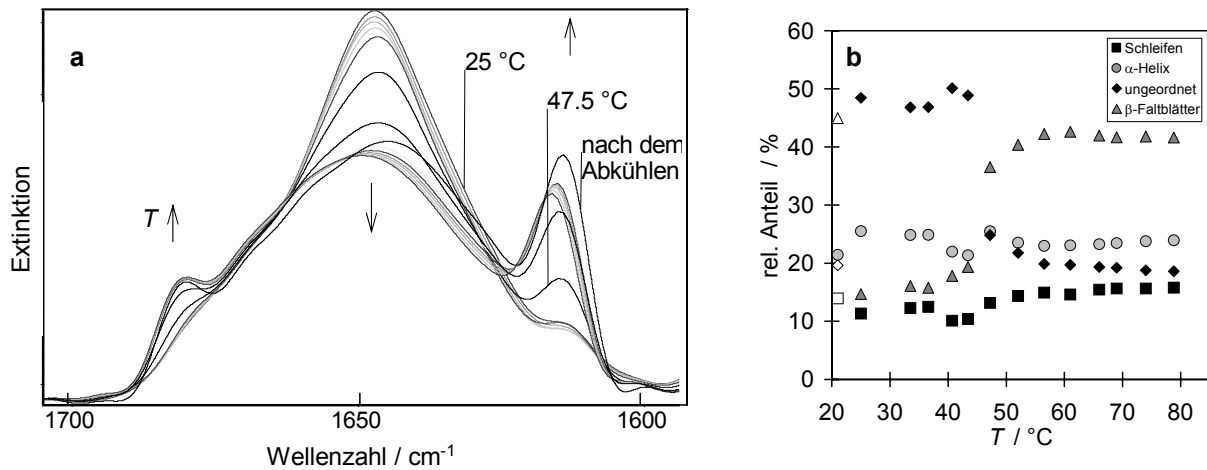
Sekundärstruktur-Element	PrP <sup>23-231</sup>	PrP <sup>Δ51-90</sup>	PrP <sup>Δ32-121</sup>
	209 AS	169 AS	119+17 AS*
β-Faltblätter	1.9 %	2.4 %	2.9 %
α-Helices	25.8 %	31.9 %	39.7 %
Schleifen	10.1 %	12.4 %	15.5 %
Ungeordnet	62.2 %	53.3 %	41.9 %

\*diese Mutante enthält einen Histidin-Tag.

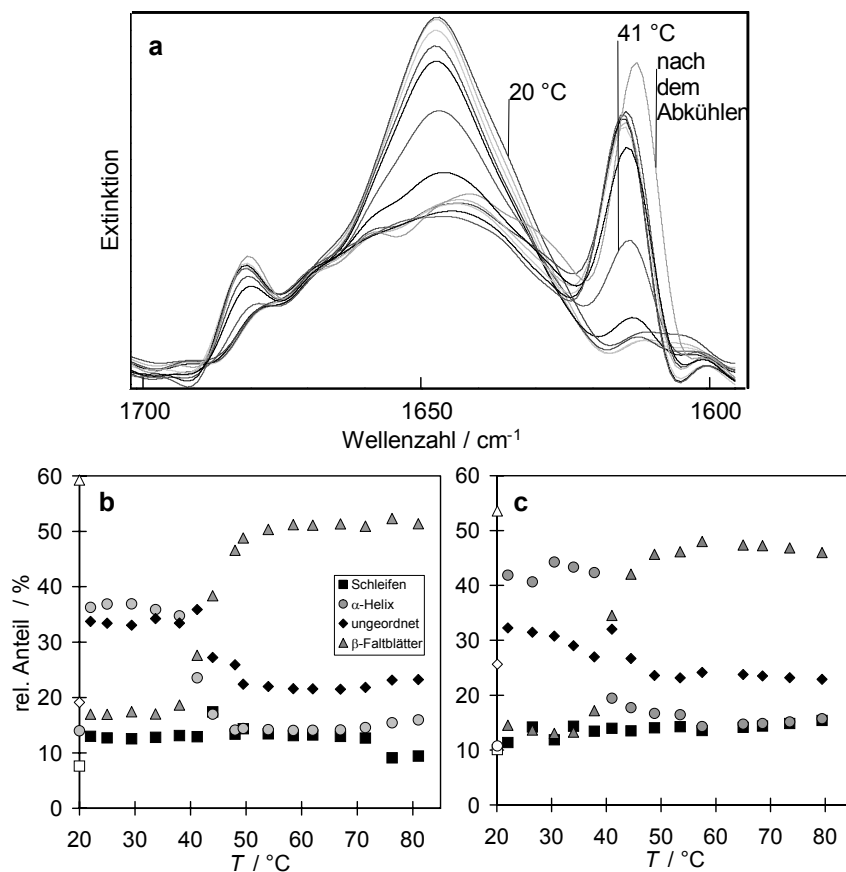
#### 4.1.3 Temperaturinduzierte Aggregation von PrP und PrP-Mutanten

Abbildung 18a zeigt Spektren von PrP<sup>23-231</sup> im Bereich der Amid I'-Bande in Abhängigkeit der Temperatur. Natives PrP zeigt ein Bandenmaximum bei  $\sim 1648 \text{ cm}^{-1}$ , typisch für Proteine mit einem hohem Anteil an ungeordneten Strukturen. Die Entfaltung zeichnet sich durch das Erscheinen von zwei Banden bei  $1613 \text{ and } 1680 \text{ cm}^{-1}$  aus, die typisch für intermolekulare antiparallele β-Faltblatt Strukturen sind und ein Indiz für Proteinaggregation sind (Ismail 1992). Der Verlauf der relativen Intensitäten in Abhängigkeit der Temperatur ist in Abbildung 18b dargestellt. Die Entfaltungstemperatur  $T_{1/2}$  liegt bei  $45.5 \pm 0.2 \text{ °C}$ . Dabei nimmt der Anteil an α-Helices von 28 % bei 25 °C auf 21.4 % bei 70 °C, und der Anteil an ungeordneten Strukturen von 48.5 % bei 25 °C auf 19.6 % bei 70 °C ab. Gleichzeitig bilden sich intermolekulare antiparallele β-Faltblätter (bis zu 45 %). Die Umwandlung ist irreversibel (Fig. 18b, leere Symbole).

In Abbildung 19 sind charakteristische Spektren von der kleinsten Mutante, PrP<sup>Δ32-121</sup>, bei verschiedenen Temperaturen dargestellt (die Spektren von PrP<sup>Δ51-90</sup> zeigen einen ähnlichen Verlauf und werden daher nicht gezeigt). Die Intensität der Amid I'-Bande nimmt mit steigender Temperatur stark ab, während die Intensität der Aggregationsbanden bei  $1612 \text{ and } 1681 \text{ cm}^{-1}$  drastisch ansteigt. Die relativen Sekundärstrukturanteile von PrP<sup>Δ32-121</sup> und PrP<sup>Δ51-90</sup> als Funktion der Temperatur sind in den Abbildungen 19b und 19c gezeigt (s. auch Tabelle 13).



**Abbildung 18:** Temperaturinduzierte Entfaltung/Aggregation von PrP<sup>23-231</sup>. a) FT-IR Spektren von PrP<sup>23-231</sup> im Bereich von 1700 bis 1590 cm<sup>-1</sup> als Funktion der Temperatur. b) Flächenanteile (integrale Intensitäten) der Sekundärstrukturelemente im Amid I'-Bereich. Leere Symbole repräsentieren die Sekundärstruktur nach der Abkühlung auf 25 °C (4 Gew.%, pD 6.5, 100 mM NaCl).



**Abbildung 19:** Temperaturinduzierte Aggregation von PrP-Mutanten. a) Ausgewählte FT-IR Spektren von PrP<sup>A32-121</sup>. Relative Sekundärstrukturanteile von PrP<sup>A32-121</sup> (b) und PrP<sup>A51-90</sup> (c) als Funktion der Temperatur (4 Gew.%, pD 6.5, 100 mM NaCl).

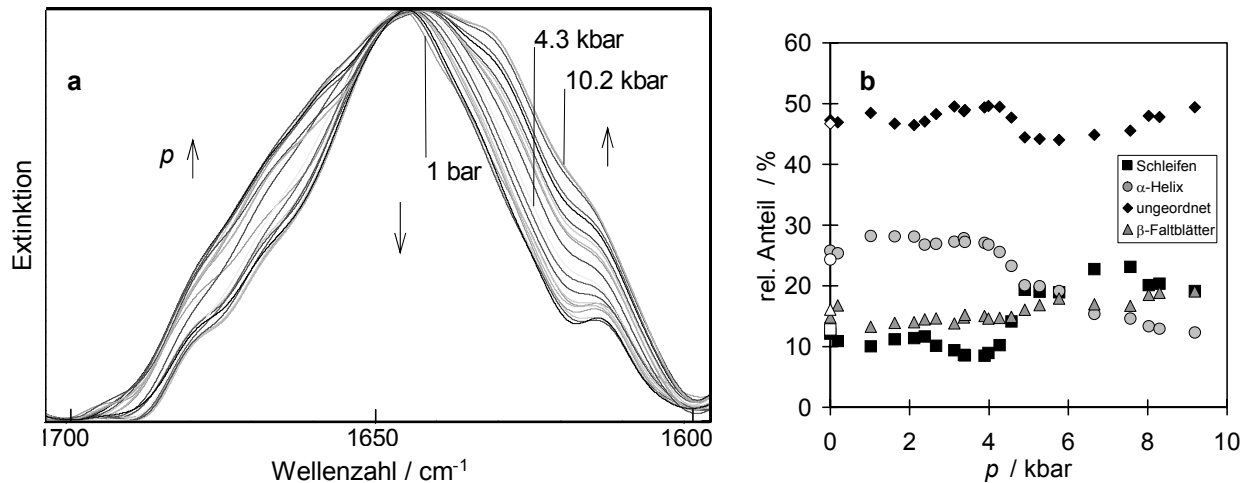
Die Entfaltungstemperatur ( $T_{1/2}$ ) von PrP<sup>Δ51-90</sup> ist  $43.0 \pm 0.1$  °C, PrP<sup>Δ32-121</sup> entfaltet bei  $40.1 \pm 0.8$  °C. Im Verlaufe der Aggregation verliert das *wild-type* Prion-Protein ~16 % der  $\alpha$ -Helices und ~60 % der ungeordneten Strukturen zugunsten von nicht-nativen  $\beta$ -Faltblättern. Fast die Hälfte der Aminosäuren (45 %) ist an der Bildung von  $\beta$ -Faltblättern beteiligt (bei 25 °C, 12 h nach dem Abkühlen von 80 °C). Mit abnehmender Größe der N-terminalen Domäne nimmt die Stabilität der  $\alpha$ -Helices in der C-Domäne drastisch ab: In PrP<sup>Δ51-90</sup> entfalten ~62 % der  $\alpha$ -Helices, und in PrP<sup>Δ32-121</sup> sind es sogar ~75 %. Der Anteil der nicht-nativen  $\beta$ -Faltblätter ist in Mutanten höher, als in PrP<sup>23-231</sup> (~59 % der Aminosäuren in PrP<sup>Δ51-90</sup> und ~54 % in PrP<sup>Δ32-121</sup> sind an der Bildung von Aggregatstrukturen beteiligt).

Offensichtlich schützt die flexible N-Domäne des Prion-Proteins die globuläre C-Domäne gegen die Bildung von intermolekulären  $\beta$ -Faltblättern (und folglich gegen die Fibrillbildung), wahrscheinlich durch schwache Wechselwirkungen mit der Oberfläche der C-Domäne und sterische Abschirmung (vgl. Abbildung 14).

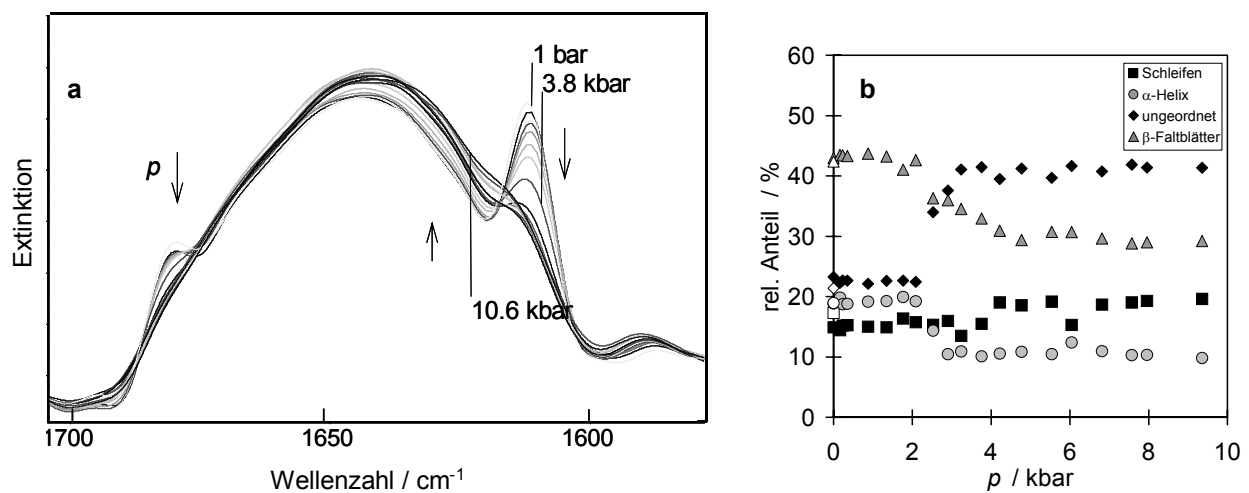
#### 4.1.4 Prion-Protein und seine Mutanten unter Druck

Die Stabilität von Prion-Protein unter Druck wird im Bereich von 1 bar bis ~10 kbar bei 25 und 50 °C untersucht. Bei 25 °C ist das Protein nativ (PrP<sup>c</sup>), während bei 50 °C das PrP bereits aggregiert ist. Es werden zwei Arten von Aggregaten untersucht, ein „frisches“ PrP<sup>Sc</sup> (nach 2 h bei 50 °C), und ein „altes“ PrP<sup>Sc,alt</sup> (nach 48 h bei 50 °C).

Die FT-IR Spektren von PrP<sup>23-231</sup> als Funktion des Druckes bei 25 °C sind in Abbildung 20a dargestellt. Die Form der Amid I'-Bande verändert sich mit steigendem Druck. Ab ~4 kbar wird die Bande zunehmend breiter, die Intensität im Bereich von Schleifen und  $\beta$ -Faltblättern nimmt zu und das Bandenmaximum verschiebt sich zu kleineren Wellenzahlen. Das native Protein entfaltet sich also unter Druck. Die Analyse der Bande zeigt, dass die  $\alpha$ -helikale Struktur dabei von 26 auf 12 % abnimmt, während die Schleifen zunehmen (Abb. 20b). Der Entfaltungsdruck  $p_{1/2}$  liegt bei  $5.4 \pm 0.2$  kbar. Auffallend ist hier eine leichte, aber kontinuierliche Zunahme von  $\beta$ -Faltblättern, was unter Druck eher ungewöhnlich ist. Die Entfaltung ist reversibel. Es wurden keine Änderungen nach 12 h beobachtet.



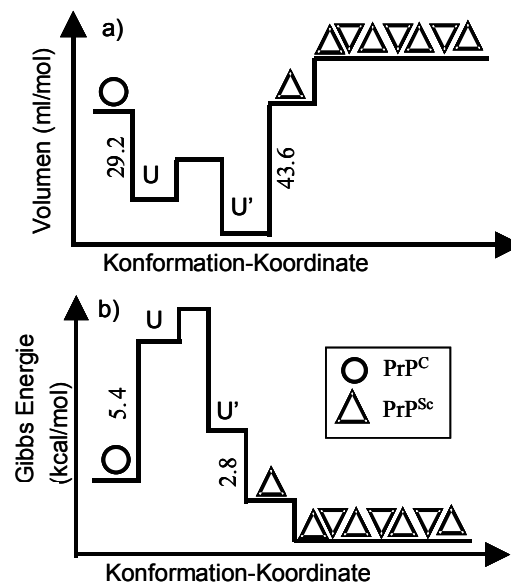
**Abbildung 20:** Druckinduzierte Entfaltung von PrP<sup>c</sup>. FT-IR Spektren von PrP<sup>23-231</sup> im Bereich von 1700 bis 1590 cm<sup>-1</sup> (a) und relative Sekundärstrukturanteile von PrP<sup>23-231</sup> (b) als Funktion des Druckes bei 25 °C (4 Gew.%, pD 7.5, 100 mM NaCl).



**Abbildung 21:** Druckinduzierte Entfaltung von PrP<sup>Sc</sup>. FT-IR Spektren von PrP<sup>Sc</sup> im Bereich von 1705 bis 1580 cm<sup>-1</sup> (a) und relative Sekundärstrukturanteile von PrP<sup>32-231</sup> (b) als Funktion des Druckes bei 50 °C (4 Gew.%, pD 7.5, 100 mM NaCl).

In Abbildung 21a sind die Spektren von PrP<sup>Sc</sup> im Bereich von 1 bar bis ~10 kbar bei 50 °C gezeigt. Die Amid I'-Bande bei 1 bar und 50 °C hat eine Aggregat-typische Form mit einem breitem Maximum bei 1641 cm<sup>-1</sup> und zwei Schultern bei 1613 und 1680 cm<sup>-1</sup>. Im Druckbereich zwischen 2.5 und 4 kbar ( $p_{1/2} = 2.8 \pm 0.1$  kbar) nimmt die Intensität der beiden Schultern stark ab, was auf eine Dissoziation hindeutet. Der relative Anteil von  $\beta$ -Faltblättern nimmt von ~43 auf ~29 % ab, während der Gehalt von ungeordneten Strukturen auf 41 % ansteigt und der Anteil von  $\alpha$ -helikalen Strukturen auf ~10 % absinkt (bei 10 kbar). Dennoch

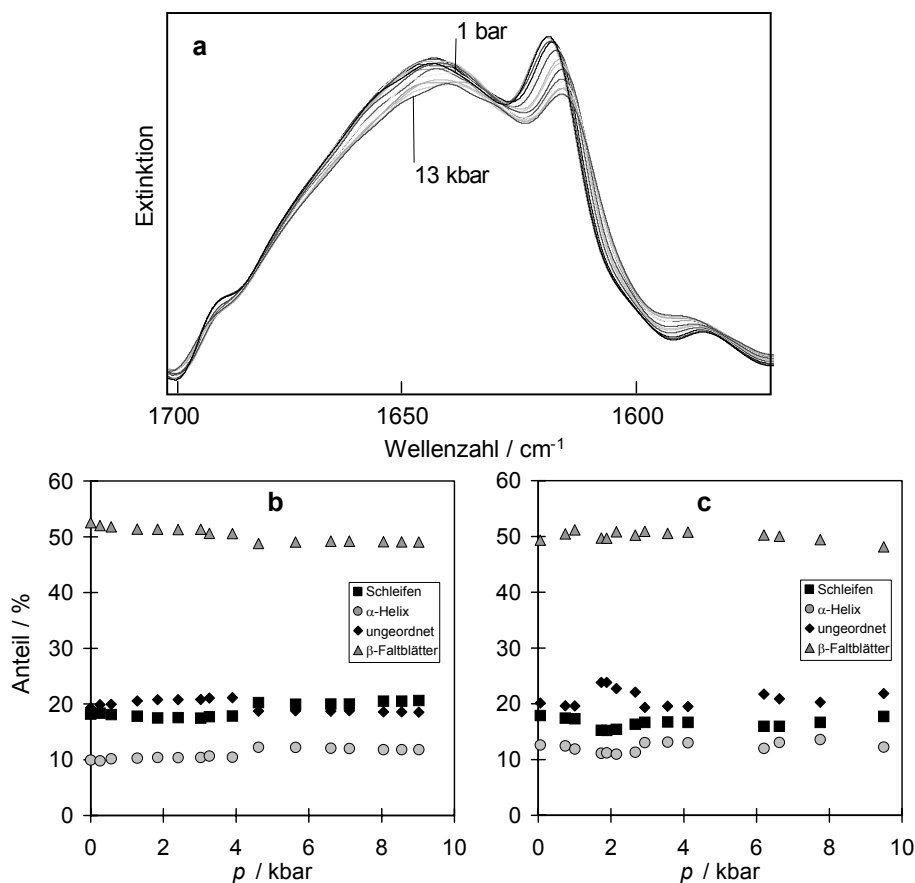
zerfallen die  $\beta$ -Faltblatt Strukturen nicht komplett unter Druck und bilden sich nach dem Ablassen des Druckes zurück (Abb. 21b).  $\text{PrP}^c$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  haben unterschiedliche Struktur im entfalteten Zustand, demzufolge handelt es sich hier um verschiedene Entfaltungszustände. Die thermodynamischen Parameter der Entfaltung sind in Abbildung 22 dargestellt. Offensichtlich ist natives Prion-Protein mehr hydratisiert und hat eine größere *solvent accessible surface area* (ASA) als seine aggregierte Form. Die kleine ASA von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  wurde auch durch PPC-Experimente (*pressure perturbation calorimetry*) bestätigt (Cordeiro 2004). Die Anwesenheit von großen Kavitäten, die dem Wasser nicht zugänglich und daher nicht hydratisiert sind, erklärt die viel größere Druck-Sensibilität von „frischem“  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  ( $\Delta V = -43.6 \pm 7.0 \text{ ml/mol}$ ;  $\Delta G^0 = 2.81 \pm 0.10 \text{ kcal/mol}$ ) verglichen mit  $\text{PrP}^c$ . Weiterhin beobachtet man hier zwei verschiedene Faltungswege mit zwei unterschiedlichen Intermediaten (U und U'): Die Entfaltung von  $\text{PrP}^c$  in U erfordert wesentlich kleinere Volumen-Änderungen verglichen mit dem  $\text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow \text{U}'$  Übergang. Dies ist eine deutliche kinetische Barriere, sowohl im Volumen (Aktivierungsvolumen), als auch in der Gibbs-Energie zwischen U und U'. Das könnte die langsame Umwandlung *in vivo* erklären und einer der Gründe sein, warum die *in vitro* generierte  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  Form keine nachweisbare Infektizität *in vivo* zeigt (s. Abschnitt. 4.1.1).



**Abbildung 22:** Druckinduzierte Entfaltung von  $\text{PrP}^c$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ : Volumen (a) und Gibbs-Energie (b) Diagramme. Entfaltete Zustände von  $\text{PrP}^c$  (Kreise) und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Dreiecke) werden als U und U' bezeichnet.

Die Stabilität von  $\text{PrP}^{\text{Sc,alt}}$  wurde im Bereich von 1 bar bis 12 kbar bei zwei verschiedenen Temperaturen, 25 und 50 °C, untersucht (Abbildung 23). Die längere Hitze-Behandlung bewirkt eine Verschiebung der Aggregations-Banden zu etwas höheren Wellenzahlen (um ca.

$3 \text{ cm}^{-1}$ ), was darauf hindeutet, dass die Zahl bzw. die Stärke der Wasserstoffbrücken-Bindungen der C=O Gruppen bei der Aggregation abnimmt. Während der Gehalt von Schleifen und ungeordneten Strukturen in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc,alt}}$  annähernd gleich ist, weist  $\text{PrP}^{\text{Sc,alt}}$  einen höheren Anteil an  $\beta$ -Faltblätter und einen kleineren Anteil an  $\alpha$ -Helices auf. Es konnten keine signifikanten Änderungen in der Sekundärstruktur zwischen 1 bar und 10 kbar detektiert werden. Die erstaunliche Druck-Stabilität von „alten“ Aggregaten kann mit einer veränderten Morphologie erklärt werden.



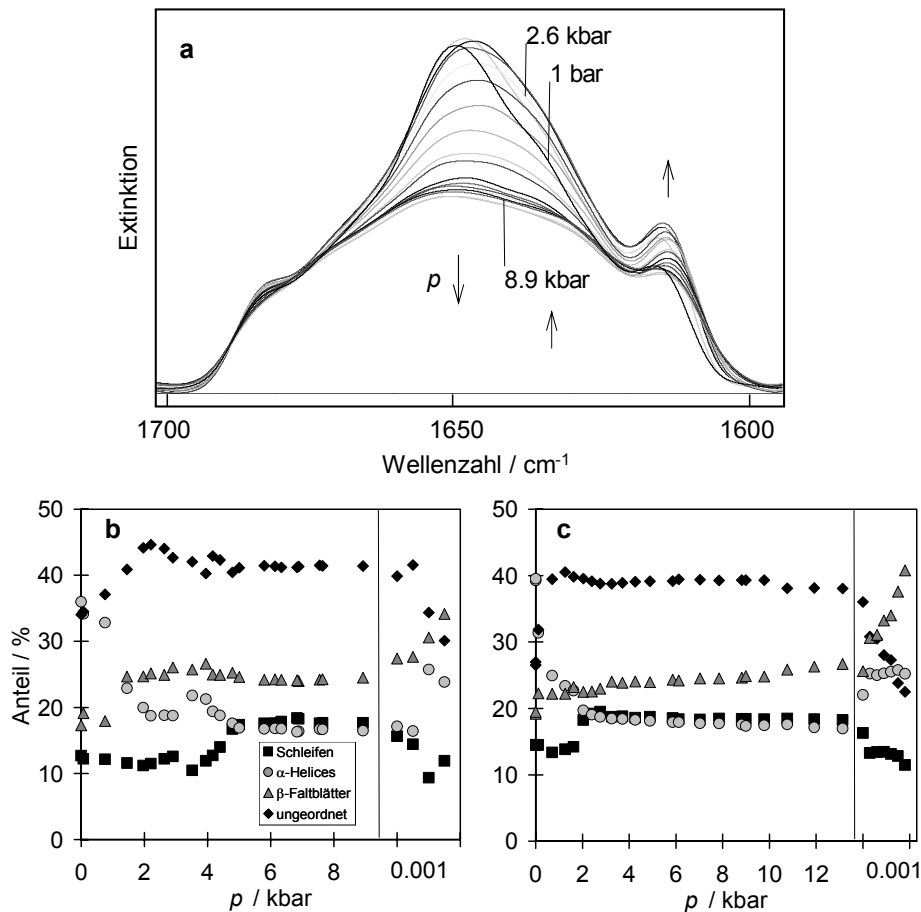
**Abbildung 23:** Druckinduzierte Entfaltung von  $\text{PrP}^{\text{Sc,alt}}$  (nach 48 h bei 50 °C). a) Amid I'-Bande von  $\text{PrP}^{\text{Sc,alt}}$ . Relative Sekundärstrukturanteile als Funktion des Druckes bei 25 (b) und 50 °C (c) (4 Gew.%, pD 7.5, 100 mM NaCl).

Druck bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der Konformation, die das Gesamtvolumen des Systems verkleinert (Le Châtelier), was somit zu einer Dissoziation der Oligomere oder Protein-Entfaltung führen kann. Im Allgemeinen dissoziieren oligomere Proteine (Silva 1993, Mozhaev 1996) und amyloide Aggregate (Foguel 2003, Ferrão-Gonzales 2000) in einem Druckbereich zwischen 1 und 3 kbar. Offensichtlich enthalten die „alten“ Aggregate keine internen Kavitäten mehr, die unter Druck hydratisiert werden

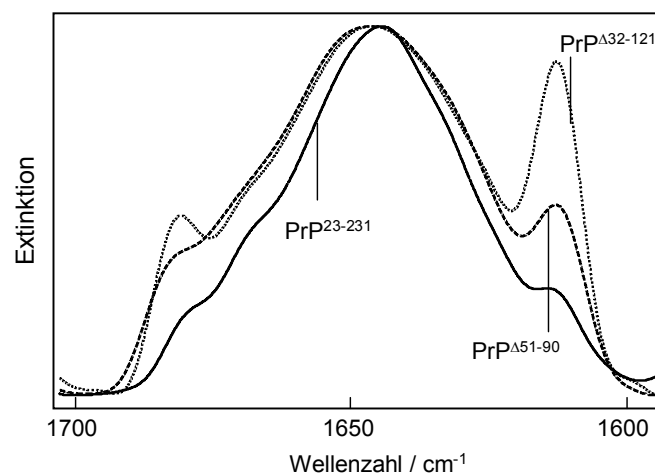
können. Diese Amyloide sind also sehr dicht gepackt, viel dichter als die frischen Aggregate (1-2 h alt).

Als nächstes wurde die Stabilität der Mutanten PrP<sup>Δ32-121</sup> und PrP<sup>Δ51-90</sup> im Bereich von 1 bar bis ~13 kbar bei 25 °C untersucht und mit dem *wild-type* Prion-Protein verglichen. Die FT-IR Spektren von PrP<sup>Δ51-90</sup> und relativen Sekundärstrukturanteile von PrP<sup>Δ51-90</sup> und PrP<sup>Δ32-121</sup> als Funktion des Druckes sind in Abbildung 24 dargestellt (Spektren von PrP<sup>Δ32-121</sup> sind nicht abgebildet). Mit zunehmender Eliminierung nimmt der Entfaltungsdruck drastisch ab. PrP<sup>Δ51-90</sup> ist oberhalb von ~2.2 kbar mit  $p_{1/2} = 1.23$  kbar komplett entfaltet. Bei PrP<sup>Δ32-121</sup> ist die Entfaltung schon oberhalb von ~2.0 kbar mit  $p_{1/2} = 0.74$  kbar beendet (zum Vergleich:  $p_{1/2}$  von PrP<sup>23-231</sup>: 5.4 kbar). Das PrP<sup>Δ32-121</sup> ist extrem instabil unter Druck. Die Entfaltung beginnt bereits bei sehr kleinen Drücken im Bereich zwischen 50 und 100 bar. Das Entfaltungsszenario ist allerdings ähnlich dem des PrP<sup>23-231</sup>. Das PrP<sup>Δ51-90</sup> verliert ~55 % der  $\alpha$ -Helices (von 36.9 % bei 1 bar auf 16.5 % bei 9 kbar). Bei PrP<sup>Δ32-121</sup> sind es ~58 % (von 41.9 % bei 1 bar auf 17.4 % bei 9 kbar). Gleichzeitig steigt der Anteil von ungeordneten Strukturen und - überraschenderweise - von  $\beta$ -Faltblättern. Dabei nimmt der Gehalt an  $\beta$ -Faltblättern mit abnehmender Größe der N-Domäne zu (~19 % in PrP<sup>23-231</sup>, ~25 % in PrP<sup>Δ51-90</sup> und ~27 % PrP<sup>Δ32-121</sup> bei 9 kbar). Die Entfaltung ist nicht reversibel (s. rechts in Abb. 24b und 24c). Die Mutanten aggregieren sofort (innerhalb von 1 h) nach Druckentlastung auf 1 bar, wobei PrP<sup>Δ32-121</sup>, dem fast die komplette N-terminale Region fehlt, schneller aggregiert als PrP<sup>Δ51-90</sup>. In Abbildung 25 sind die entsprechenden Spektren von PrP<sup>23-231</sup>, PrP<sup>Δ32-121</sup> und PrP<sup>Δ51-90</sup> verglichen.

Wahrscheinlich wird die C-Domäne durch das Fehlen des N-Terminus geschwächt, was die Penetration von Wasser in das Protein-Innere unter Druck begünstigt. Das Protein entfaltet folglich unter Bildung von ungeordneten Strukturen, die dann viel schneller aggregieren. Obwohl die Sekundärstruktur der globulären Domäne durch das Entfernen des N-Terminus nicht signifikant verändert wird, ändert sich vermutlich die Kavitäten-Verteilung (Packung) und interne Hydratisierung, was somit die Druck-Stabilität beeinträchtigt.



**Abbildung 24:** Druckinduzierte Entfaltung von PrP-Mutanten. FT-IR Spektren von PrP<sup>A51-90</sup> im Bereich von 1700 bis 1590 cm<sup>-1</sup> (a) und relative Sekundärstrukturanteile von PrP<sup>A51-90</sup> (b) und PrP<sup>A32-121</sup> (c) als Funktion des Druckes bei 25 °C (4 Gew.%, pD 6.5, 100 mM NaCl).

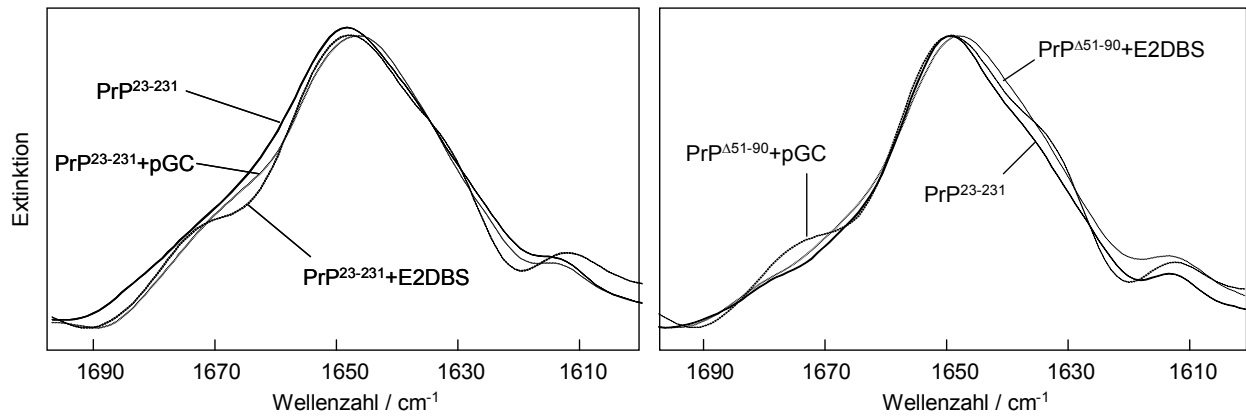


**Abbildung 25:** Druckinduzierte Aggregation von Prion-Protein. FT-IR Spektren von PrP<sup>23-231</sup>, PrP<sup>A51-90</sup> und PrP<sup>A32-121</sup> nach 1 h bei 1 bar und 25 °C (der Druck wurde von 9 kbar auf 1 bar abgelassen).

#### 4.1.5 Prion-DNA Komplexe

Einige Makromoleküle können an der  $\text{PrP}^c \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$  Umwandlung beteiligt werden, wie z. B. Nukleinsäuren (Cordeiro 2001, Deleault 2003, Nandi 2004) und Glycosaminoglycan (Priola 1994). Zum Beispiel können Nukleinsäuren (DNA, RNA) an PrP binden und die Bildung von  $\beta$ -Faltblättern *in vitro* katalysieren (Cordeiro 2001, Deleault 2003). Die PrP-DNA Komplexbildung kann dabei davon abhängen, ob es sich um eine Doppelhelix (*ds*) oder Einzelhelix (*ss*) handelt (*ds* ist am effektivsten). Die Sequenz und Länge der DNA (RNA) und das DNA/Protein-Konzentrationsverhältnis spielen ebenfalls eine Rolle (Cordeiro *et al.*, 2005, unpublizierte Ergebnisse). Durch die Protein-Bindung kann die Struktur der DNA verändert werden (Grossman 2003 und Ref. darin). Die physiologische Bedeutung von PrP-DNA-Wechselwirkungen ist bis jetzt unklar. Nukleinsäuren und PrP-Moleküle sind allerdings in intakten Zellen durch die Zellmembran getrennt. RNA-Moleküle werden im Kern und Zytoplasma gefunden, während  $\text{PrP}^c$ - und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Moleküle hauptsächlich außerhalb der Zelle an der Zelloberfläche oder in intrazellularen Organellen vorkommen, was ein logistisches Problem einer PrP-DNA-Komplexbildung darstellt. Überraschenderweise wurden jedoch neuerdings PrP-Moleküle auch in Zellkernen detektiert (Mangé 2004). Da diese Forschung sich erst im Anfangsstadium befindet, bleiben die Fragen nach dem molekularen Mechanismus der Bindung und eventuellen Katalyse durch DNA offen.

Hier wird das *wild-type*  $\text{PrP}^{23-231}$  und seine beiden Mutanten  $\text{PrP}^{\Delta 51-90}$  und  $\text{PrP}^{\Delta 32-121}$  mit zwei unterschiedlichen DNA-Sequenzen im Molverhältnis 2:1 komplexiert und deren Sekundärstruktur und thermische Stabilität bei pH 7.5 untersucht. Die erste *ds*-DNA Sequenz wird als E2DBS bezeichnet und besteht aus 18 Basenpaaren (5'-TCA ACC GAT TTC GGT TAC-3' und 5'-GTA ACC GAA ATC GGT TGA-3'). Die Umwandlungstemperatur  $T_m$  liegt bei 46.7 °C (oberhalb dieser Temperatur findet die *ds*→*ss* Entfaltung statt). Die zweite *ds*-DNA ist eine polymerisierte GC-DNA (pGC) aus 21 Basenpaaren mit  $T_m = 74$  °C. Die Sekundärstruktur-Analyse erfolgt wie im Kapitel 4.1.2 beschrieben, mit dem Unterschied, dass hier statt einer Puffer-Lösung ein entsprechendes DNA/Puffer-Spektrum als Referenz abgezogen wird. Die Bandenlagen und die bestimmte Sekundärstruktur von  $\text{PrP}^{23-231}$  und  $\text{PrP}^{\Delta 51-90}$  im Komplex mit E2DBS und pGC sind in Tabelle 14 aufgelistet. Ein Vergleich der Spektren der Komplexe ist in Abbildung 26 dargestellt. Mit  $\text{PrP}^{\Delta 32-121}$  bilden beide DNA sofort nach der Zugabe zum Protein unlösliche Komplexe, die deswegen nicht charakterisiert werden können.



**Abbildung 26:** Prion:DNA Komplexe. Amid I'-Bande von PrP<sup>23-231</sup> und PrP<sup>A51-90</sup> im Komplex mit *ds*-DNA E2DBS (18 bp) und pGC (21 bp) bei 25 °C (Molverhältnis PrP:DNA = 2:1, pD 7.5, 100 mM NaCl).

**Tabelle 14:** Sekundärstruktur von PrP<sup>23-231</sup> und PrP<sup>A51-90</sup> im Komplex mit *ds*-DNA E2DBS (18 bp) und pGC (21 bp) bei 25 °C (Molverhältnis PrP:DNA = 2:1, pD 7.5, 100 mM NaCl). PrP<sup>A32-121</sup> bildet mit E2DBS und pGC einen unlöslichen Komplex und kann daher nicht mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie charakterisiert werden. Abweichung der Bandenlagen  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$  und der Bandenflächen  $\pm 2 \%$ .

Struktur-Element	PrP <sup>23-231</sup>		PrP <sup>23-231</sup> +E2DBS		PrP <sup>23-231</sup> +pGC	
	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Fläche / %	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %
Schleifen	1669	11.3	1668	18.1	1668	17.6
$\alpha$ -Helices	1652	25.5	1653	26.7	1653	26.2
ungeordnet	1642	48.5	1642	37.2	1641	41.7
intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	1627	4.2	1630	9.4	1627	7.0
intermolekulare $\beta$ -Faltblätter	1680, 1613	4.6	1677, 1612	8.6	1679, 1613	7.5
Struktur-Element	PrP <sup>A51-90</sup>		PrP <sup>A51-90</sup> +E2DBS		PrP <sup>A51-90</sup> +pGC	
	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %	Wellenzahl / cm <sup>-1</sup>	Anteil / %
Schleifen	1666	12.7	1671	14.6	1665	13.3
$\alpha$ -Helices	1652	36.9	1653	32.5	1651	33.3
ungeordnet	1639	33.4	1643	33.8	1639	35.3
intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	1627	6.7	1631	13.7	1627	6.1
intermolekulare $\beta$ -Faltblätter	1679, 1613	10.3	1680, 1612	5.4	1679, 1613	12.0

Die Struktur von *wild-type* PrP<sup>23-231</sup> wird durch die Komplexbildung beeinflusst. Der Anteil an ungeordneten Strukturen nimmt in PrP<sup>23-231</sup>:E2DBS um  $\sim 11 \%$  ab, während die  $\beta$ -Faltblätter um  $\sim 9 \%$  zunehmen. In PrP<sup>23-231</sup>:pGC ist diese Tendenz etwas schwächer ausgeprägt; die ungeordneten Strukturen nehmen um  $\sim 7 \%$  ab und die  $\beta$ -Faltblätter steigen um  $\sim 6 \%$  an.

Dagegen bindet PrP<sup>A51-90</sup> beide DNA ohne signifikante Strukturänderungen. Die thermische Stabilität der Komplexe ist in Tabelle 15 aufgelistet. Da der Entfaltungsvorgang in allen untersuchten Komplexen einen ähnlichen Verlauf hat, wird auf die Abbildung verzichtet. Für PrP<sup>23-231</sup> führt die Bindung an E2DBS zu einer erheblichen Stabilisierung; die Aggregation beginnt erst bei 54.4 °C, während im Komplex mit pGC die Aggregatbildung bei 48.6 °C erfolgt. Dagegen führt die Bindung von E2DBS und pGC an PrP<sup>A51-90</sup> zu einer geringen Destabilisierung des Proteins.

Offensichtlich hat PrP zwei DNA-Bindungsstellen, eine am  $\alpha$ -helikalen C-Terminus und eine weitere am flexiblen N-Terminus, was auch durch aktuelle NMR-Untersuchungen bestätigt wird (Lima et al. 2005, unpublizierte Ergebnisse). Allerdings lässt sich die Frage nach der Art der Bindung nicht einfach beantworten. Sequenz-spezifische Bindung findet hauptsächlich via Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Seitenketten der  $\alpha$ -helikalen oder  $\beta$ -Faltblatt Strukturen und den Nukleinbasen statt, kombiniert mit Phosphat-Bindungen und hydrophoben Wechselwirkungen. Die unspezifische DNA-Bindung erfolgt hauptsächlich durch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Phosphat- und Deoxyribose-Gruppen und wird unter anderem durch die DNA (RNA) Konformation beeinflusst. Darüber hinaus kann die Struktur des Proteins durch die unspezifische Bindung geändert und „angepasst“ werden. In den meisten DNA-bindenden Proteinen wird eine Kombination aus spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen gefunden (Kerppola 2002).

**Tabelle 15:** Thermische Stabilität von PrP<sup>23-231</sup>, PrP<sup>A51-90</sup> und PrP<sup>A32-121</sup> im Komplex mit den DNA-Sequenzen *ds*-E2DBS (18bp) und *ds*-pGC (21bp) (die aufgelisteten Temperaturen beziehen sich auf den Anfang der Aggregation).

	frei	+ E2DBS	+ pGC
PrP <sup>23-231</sup>	45.3 ± 1.9 °C	54.4 ± 2.4 °C	48.6 ± 2.4 °C
PrP <sup>A51-90</sup>	39.6 ± 1.6 °C	36.9 ± 1.9 °C	37.7 ± 1.7 °C
PrP <sup>A32-121</sup>	39.4 ± 1.6 °C	unlöslicher Komplex	unlöslicher Komplex

Wahrscheinlich handelt es sich im Fall von PrP<sup>23-231</sup> um eine sequenzunspezifische Bindung der C-terminalen Domäne und um eine spezifische Bindung am N-Terminus, da fast alle der untersuchten DNA-Sequenzen an PrP<sup>23-231</sup> binden (Cordeiro et al. 2005, unpublizierte Ergebnisse). Die Bindung an die N-terminale Region bewirkt offensichtlich eine Umstrukturierung der Domäne; es bilden sich mehr  $\beta$ -Faltblätter. Dabei wird die

temperaturinduzierte Aggregatbildung gehemmt, vermutlich durch die sterische Abschirmung des Proteins. Die Spezifität der Bindung würde auch den Unterschied in der Struktur und Stabilität zwischen  $\text{PrP}^{23-231}:\text{E2DBS}$  und  $\text{PrP}^{23-231}:\text{pGC}$  erklären. Wird ein Teil der N-Domäne entfernt, bindet das PrP unspezifisch mit der C-Domäne an DNA und wird dabei destabilisiert. Fehlt die N-Domäne fast vollständig, aggregiert das gebundene Protein sofort. Wahrscheinlich wird die Aktivierungsbarriere der  $\text{PrP}^c \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$  Umwandlung, die in Mutanten ohnehin schon geringer ist, durch diese Bindung zusätzlich gesenkt.

#### 4.1.6 Zusammenfassung

Das Aggregationsverhalten von *wild-type* Prion-Protein  $\text{PrP}^{23-231}$  und seinen N-terminal eliminierten Mutanten  $\text{PrP}^{\Delta 51-90}$  und  $\text{PrP}^{\Delta 32-121}$  wurde untersucht und verglichen. Dabei wurden Szenarien der thermischen und druckinduzierten Entfaltung studiert. Die aggregierte Form des Proteins,  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , zeichnet sich durch einen extrem hohen Anteil an nicht-nativen  $\beta$ -Faltblättern, die bei der temperaturinduzierten Entfaltung aus  $\alpha$ -Helices und ungeordneten Strukturen gebildet werden. Im Gegensatz zu neugebildeten Aggregaten besitzen ältere Amyloide eine viel dichtere Packung und keine internen Kavitäten mehr. Die Entfaltungstemperatur  $T_{1/2}$  (und damit die Stabilität) nimmt mit Verkürzung des N-Terminus ab. Der Beitrag der  $\alpha$ -helikalen Strukturen an der Bildung von  $\beta$ -Faltblättern nimmt dabei zu, da durch die Trunkierung der Anteil der ungeordneten Strukturen im nativen Protein kleiner wird. Die druckinduzierte Entfaltung von  $\text{PrP}^{\Delta 51-90}$  und  $\text{PrP}^{\Delta 32-121}$  unterscheidet sich stark von  $\text{PrP}^{23-231}$ , was auf Unterschiede in der Packung und Hydratation zurückzuführen ist. Weiterhin aggregieren die Mutanten nach der druckinduzierten Entfaltung. Der flexible N-Terminus stabilisiert die C-Domäne, möglicherweise durch schwache Wechselwirkungen mit der Protein-Oberfläche und durch die sterische Abschirmung. Offensichtlich besteht eine kinetische Barriere zwischen den  $\text{PrP}^c$ - und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Isoformen und das N-Terminus spielt dabei eine kritische Rolle. DNA kann sich an das PrP binden, seine Struktur und Stabilität beeinflussen und die Aggregation katalysieren. Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine Sequenz-unspezifische Bindung der C-terminalen Domäne und um eine spezifische Bindung am N-Terminus.

## 4.2 Transthyretin: Mechanismus der Amyloid-Bildung

### 4.2.1 Strukturelle und biologische Eigenschaften von TTR

Transthyretin (TTR) gehört zur Gruppe der sogenannten Präalbumine und dient dem Transport von Retinol und von Schilddrüsenhormon Thyroxin durch die Blutbahn und Zerebrospinalflüssigkeit. Es wird nahezu ausschließlich in der Leber gebildet. TTR wurde im Plasma (0.1-0.4 mg/ml) und Zerebrospinalflüssigkeit (0.017 mg/ml) gefunden (Sousa 2003). Eine Veränderung am *wild-type* Transthyretin tritt bei der systemischen Amyloidose (SSA) auf, eine Erkrankung, die bei 25 % der Menschen im Alter von über 80 Jahre auftritt und durch amyloide Ablagerungen im Herz gekennzeichnet ist. Die in jüngeren Jahren auftretende Polyneuropathie (FAP) und Cardiomyopathie (FAC) sind angeboren. Sie entstehen, weil ein Gendefekt Punktmutationen am TTR verursacht. Bis heute sind über 100 solcher Punktmutationen beschrieben worden (Saraiva, 2001).

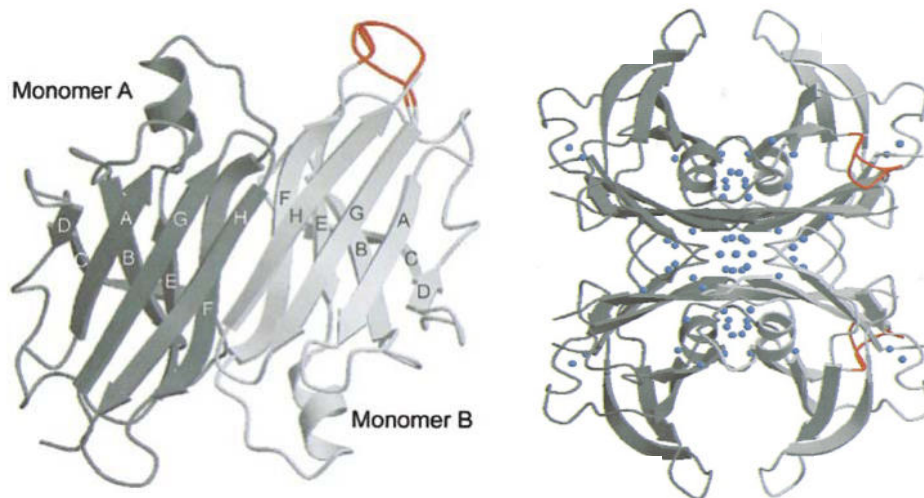
TTR ist ein 55 kDa großes Homotetramer, das aus vier identischen monomeren Einheiten aus je 127 Aminosäuren besteht. Jedes Monomer besteht aus acht  $\beta$ -Strängen, die mit A-H bezeichnet werden. Zwei  $\beta$ -Faltblätter in jedem Monomer (D-A-G-H und C-B-E-F) bilden ein  $\beta$ -Barrel. Zwei Monomere dimerisieren über Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Aminosäuren 115-123 in gegenüberliegenden H-Strängen und den Aminosäuren 91-97 in F-Strängen jedes Monomers in ein kontinuierliches  $\beta$ -Faltblatt. Zwei Dimere assoziieren über hydrophobe „Wechselwirkungen“ zwischen den Aminosäuren 113-114 der GH-Schleife und den Aminosäuren 19-28 der AB-Schleife. Dabei wird ein hydrophober Kanal (sogenannter hydrophober Kern) mit Thyroxin-bindenden Seiten gebildet (Abbildung 27).

Das Tetramer stellt die biologisch aktive Form dar. Erst wenn das Tetramer in die Monomere dissoziiert, werden sie für eine Aggregation anfällig. Einige Mutationen, wie z. B. L55P und V30M, können die thermodynamische Stabilität und die Kinetik der Dissoziation *in vitro* beeinflussen, und damit möglicherweise die pathogene Aggregation begünstigen, während andere Mutationen, wie z. B. T119M, das native Tetramer stabilisieren und die Dissoziation hemmen (Hurshman 2004 und Ref. darin). Allerdings genügt die Dissoziation alleine zur Fibrillbildung nicht. Erst wenn die Monomere ihre Struktur verändern (missfalten), können sie zu verschiedenen größeren Strukturen aggregieren.

Der molekulare Mechanismus der TTR-Aggregation und die Struktur des monomeren Intermediates sind noch ungeklärt. Die meisten thermodynamischen und kinetischen Untersuchungen wurden bei sehr niedrigen pH-Werten durchgeführt, bei denen TTR pH-induziert dissoziiert, partiell entfaltet und Fibrillen bildet. Untersuchungen mit chemischen

Denaturantien (Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid) haben gezeigt, dass TTR extrem stabil gegen eine chemische Denaturierung ist (Hammarstrom 2002). Detaillierte temperaturabhängige Studien am *wild-type* TTR sind bis heute kaum bekannt.

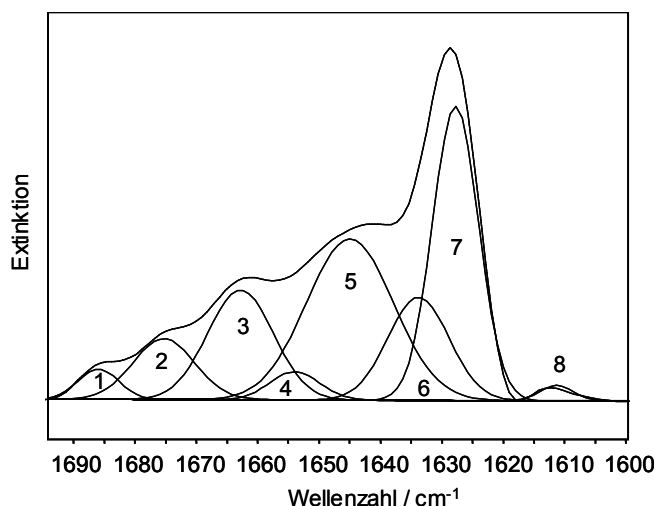
Druck als physikalischer Parameter bietet hier eine einzigartige Möglichkeit, die TTR Entfaltung ohne Zusatz von Chemikalien oder Änderungen am Protein (Mutationen) bei physiologischen pH-Werten zu untersuchen und das Intermediat zu „fangen“. In dieser Arbeit wird die druck- und temperaturinduzierte Entfaltung und Aggregation von human *wild-type* TTR mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie untersucht. Die Experimente finden bei zwei für TTR relevanten pH-Werten statt: Bei pH 7.5 (pH-Wert des Blutes) und pH 5.0 (Lysosome).



**Abbildung 27:** Röntgen-Kristallstruktur von *human* Transthyretin: TTR-Dimer (links) und TTR-Tetramer (rechts) (Hörnberg 2000). Die acht  $\beta$ -Stränge in jedem Monomer werden mit A-H bezeichnet. Zwei  $\beta$ -Faltblätter in jedem Monomer (D-A-G-H und C-B-E-F) bilden ein  $\beta$ -Barrel. Zwei Dimere assoziieren über hydrophobe „Wechselwirkungen“ zwischen den ungeordneten Regionen und zwischen den Strängen G und U sowie A und B. In Blau sind 36 fest gebundene Wasser Moleküle gekennzeichnet. Die FG-Schleife ist rot gefärbt.

#### 4.2.2 Sekundärstruktur von nativem *wild-type* TTR

Die Sekundärstruktur von nativem TTR bei pD 7.5 und 5.0 wird durch Analyse charakteristischer Schwingungsbanden im Amid I'-Bereich bestimmt, wie im Abschnitt 2.2.3 beschrieben wurde. Die ermittelten Strukturanteile beruhen dabei auf den gemessenen relativen Intensitäten und stellen nur die Intensitätsanteile dar. Die TTR Spektren werden im Bereich von  $1595$  bis  $1710\text{ cm}^{-1}$  mit einer Halbwertsbreite von  $15\text{ cm}^{-1}$  und einem Verstärkungsfaktor von 1.8 entfaltet und mit acht Teilbanden angepasst: bei  $1675$  (Schleifen/ $\beta$ -Faltblätter),  $1655$  ( $\alpha$ -Helices),  $1646$  (ungeordnete Strukturen),  $1634$  (intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter),  $1627$  (intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter),  $1686$  und  $1616\text{ cm}^{-1}$  (antiparallele intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter) (s. Abbildung 28).

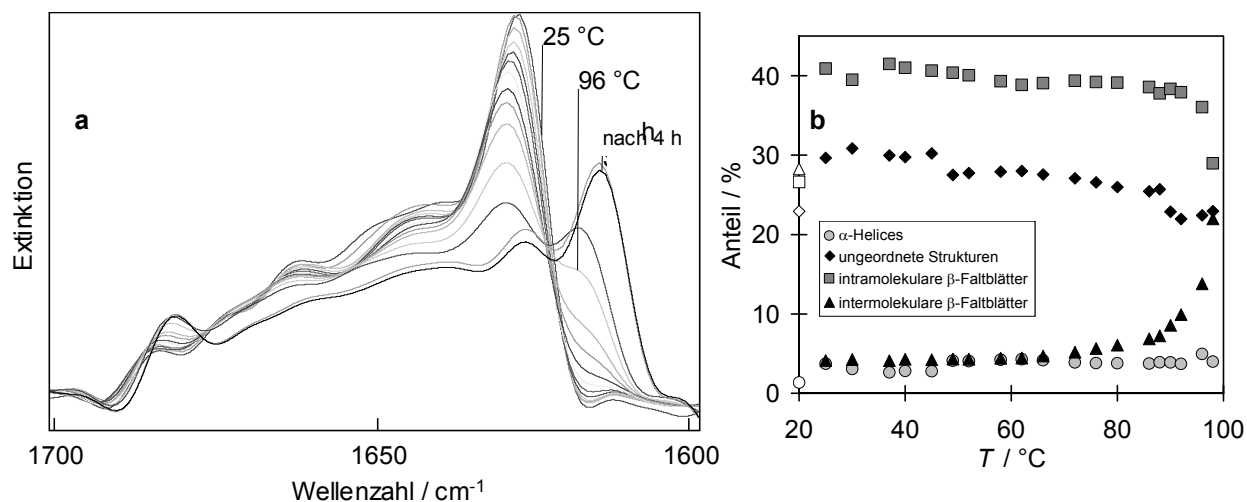


**Abbildung 28:** Bandenanalyse der Amid I'-Region von TTR. Die Bande wird mit acht Gauß-Lorentz Funktionen angepasst: (1, 8) intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter, (2) Schleifen/ $\beta$ -Faltblätter, (3) Schleifen, (4)  $\alpha$ -Helices, (5) ungeordnete Strukturen, (6, 7) intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (25 °C, pD 7.5, 100 mM KCl).

Natives TTR (sowohl bei pD 7.5 als auch bei pD 5.0) besteht demnach aus 44 %  $\beta$ -Strukturen (27.3 % intramolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, 3.7 % intermolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, 13 %  $\beta$ -Strängen), 3.1 %  $\alpha$ -Helices, 29.5 % ungeordneten Strukturen und 23.4 % Schleifen ( $\pm 2$  % Abweichung). Zum Vergleich wird die Röntgen-Kristallstruktur von *human* TTR (PDB-Eintrag *1F41*, Hörnberg 2000) hinsichtlich der Sekundärstruktur analysiert und die entsprechenden Strukturanteile berechnet. Demnach besteht TTR aus 48 %  $\beta$ -Strukturen und 5.5 %  $\alpha$ -Helices. Der Rest sind ungeordnete Strukturen und Schleifen, was gut mit den IR-Ergebnissen übereinstimmt.

#### 4.2.3 Temperatur-induzierte Aggregation von TTR

Die temperaturinduzierte Entfaltung und Aggregation wird im Temperaturbereich von 5 bis 100 °C untersucht. Die temperaturabhängigen Änderungen der Amid I'-Bande werden detektiert und die Entwicklung der Sekundärstruktur wird mit einer Kurvenanpassung charakterisiert. Die Spektren von TTR bei pD 5.0 sind in Abbildung 29a dargestellt. Das Maximum der Amid I'-Bande liegt bei 1628  $\text{cm}^{-1}$ , typisch für Proteine, die hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblättern bestehen (Byler 1986). Die temperaturinduzierte Entfaltung zeichnet sich durch den Anstieg der Banden bei 1616 und 1686  $\text{cm}^{-1}$  aus, die die Bildung von intermolekularen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern widerspiegeln (Ismail 1992). Gleichzeitig nimmt die Intensität der Bande bei 1646  $\text{cm}^{-1}$  ab, die den ungeordneten Strukturen zugeordnet wurde. Offensichtlich werden die ungeordneten Strukturen für die Aggregatbildung umorganisiert.

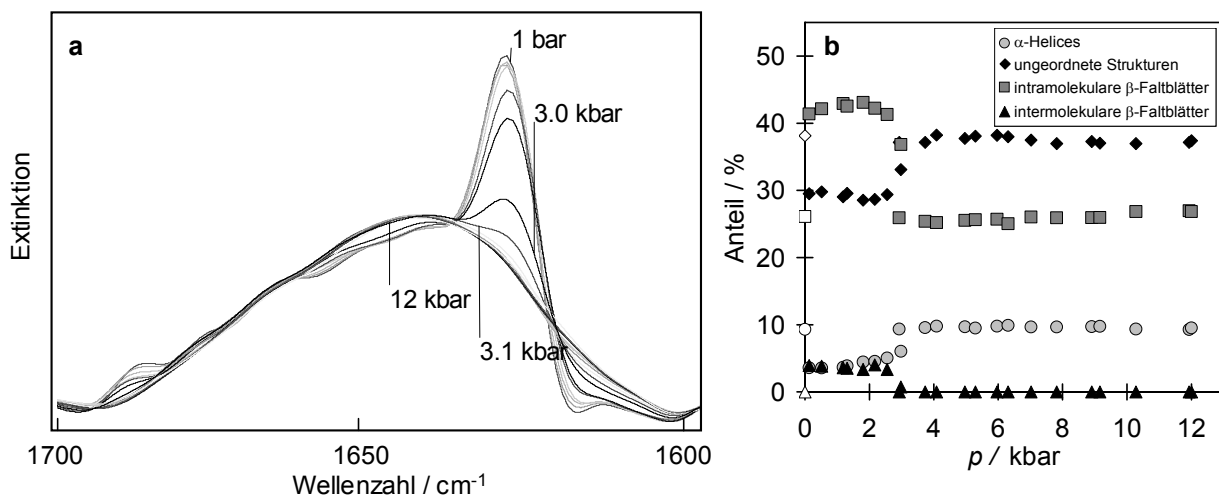


**Abbildung 29:** Temperaturinduzierte Entfaltung von TTR bei pD 5.0 (4 Gew.%, 100 mM KCl). (a) FT-IR Spektren von TTR im Bereich von 1700 bis 1600  $\text{cm}^{-1}$  als Funktion der Temperatur (Heizraterate:  $20^\circ/\text{h}$ ). (b) Flächenanteile (integrale Intensitäten) der Sekundärstrukturelemente im Amid I'-Bereich. Leere Symbole repräsentieren die Sekundärstruktur nach der Abkühlung auf  $25^\circ\text{C}$ .

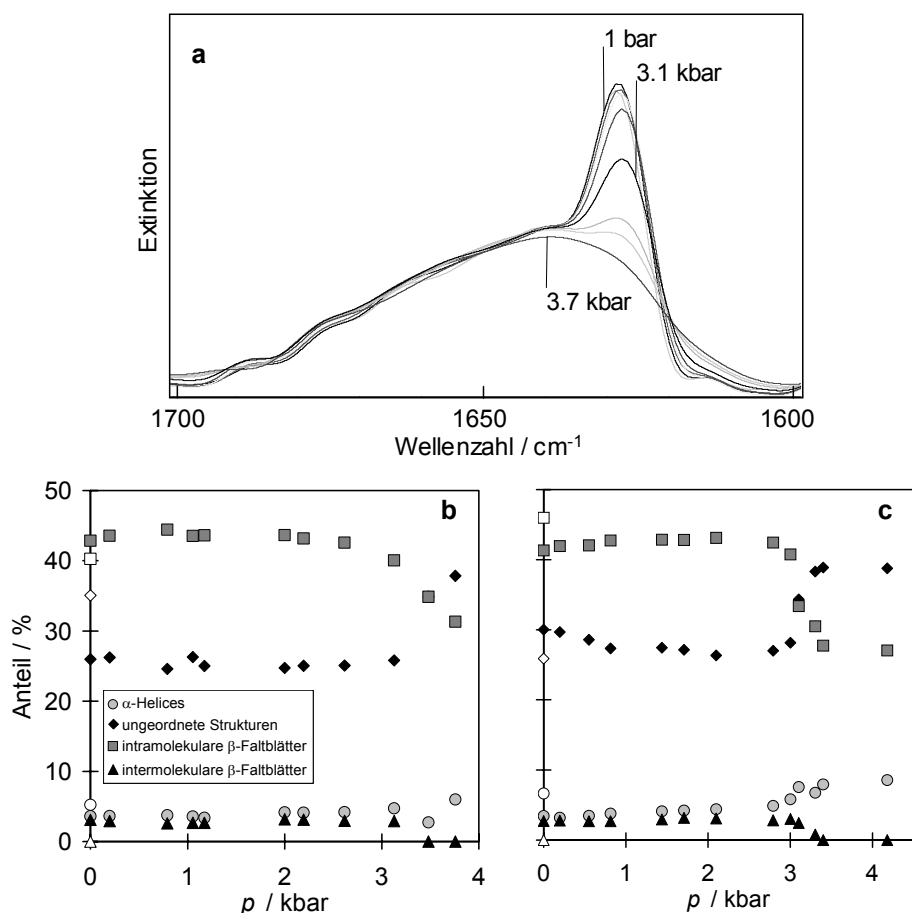
Die Spektren von TTR bei pD 7.5 zeigen einen ähnlichen Verlauf wie bei pD 5 (nicht abgebildet). Nach der Abkühlung von 98 auf  $25^\circ\text{C}$  bleiben die Spektren bei beiden pD's unverändert, was darauf hindeutet, dass die temperaturinduzierte Aggregation irreversibel verläuft. Die Entwicklung der Sekundärstruktur von TTR bei pD 7.5 als Funktion der Temperatur ist in Abbildung 29b gezeigt. Die Abnahme der ungeordneten Strukturen ist ähnlich bei den beiden pD-Werten: Von  $29.5\%$  bei  $25^\circ\text{C}$  auf  $20.9 \pm 2\%$  bei  $98^\circ\text{C}$  (pD 7.5), und von  $29.6$  auf  $23\%$  bei pD 5.0. Die intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter nehmen bei pD 7.5 von  $40.4\%$  bei  $25^\circ\text{C}$  auf  $32.6\%$  bei  $98^\circ\text{C}$  ab, und von  $40.9\%$  auf  $29\%$  bei pD 5.0. Die Anteile von Schleifen und  $\alpha$ -Helices ändern sich nicht signifikant während der Aggregation. Gleichzeitig bilden sich antiparallele intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter. Der Anteil von  $\beta$ -Faltblättern ist allerdings höher bei pD 5.0 als bei pD 7.5 ( $28.3\%$  bei pD 5 gegenüber  $19.2\%$  bei pD 7.5, nach dem Abkühlen auf  $25^\circ\text{C}$ ). Dieses Ergebnis bestätigt die Tendenz von TTR zur Aggregation bei niedrigen pH-Werten. Die temperaturinduzierte Entfaltung führt also zum Verlust von internen  $\beta$ -Strängen, wobei neue intermolekulare Kontakte entstehen, die zur Aggregation führen. Die Entfaltungstemperatur von TTR ist mit  $\sim 96^\circ\text{C}$  überraschend hoch und deutet auf starke intramolekulare Bindungen im Protein hin. Die native  $\beta$ -Struktur bleibt bei der thermischen Entfaltung teilweise erhalten. Anscheinend wird das Protein durch seinen hydrophoben Kern zusätzlich stabilisiert.

#### 4.2.4 Entfaltung und Missfaltung von TTR unter Druck

Um die Entfaltung von TTR unter Druck zu untersuchen, wurden FT-IR Messungen an TTR bei pD 5.0 und 37 °C bis 12 kbar durchgeführt. Die entsprechenden Spektren von TTR sind in der Abb. 30a dargestellt, und der Verlauf der relativen Intensitäten der einzelnen Strukturelemente in der Abb. 30b als Funktion des Druckes aufgetragen. Der Entfaltungsdruck  $p_{1/2}$  liegt hier bei  $3.1 \pm 0.1$  kbar. Die Entfaltung zeichnet sich durch die Abnahme der Intensität der Hauptbande bei  $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$  (intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter) und der Zunahme der Intensität der Bande bei  $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$  (ungeordnete Strukturen). Die Analyse der Bande zeigt, dass die nativen  $\beta$ -Faltblätter dabei von  $\sim 45\%$  bei 1 bar auf  $\sim 27\%$  bei 12 kbar abnehmen, während die ungeordneten Strukturen von  $\sim 30\%$  bei 1 bar auf  $\sim 37\%$  bei 12 kbar zunehmen. Schleifen und  $\alpha$ -Helices nehmen nur um wenige Prozent zu. TTR entfaltet bei pD 7.5 bei etwas höherem Druck, als bei pD 5.0 ( $p_{1/2}$  liegt hier bei  $3.4 \pm 0.1$  kbar). Die Entfaltungsszenarios sind bei beiden pD Werten sehr ähnlich (Abb. 31). Der Anteil von intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern nimmt dabei von  $\sim 43\%$  (1 bar) auf  $29\%$  ( $\sim 4$  kbar) ab, gleichzeitig nimmt der Anteil der ungeordneten Strukturen von  $\sim 26\%$  auf  $39\%$  zu. Nicht alle  $\beta$ -Faltblätter entfalten also unter Druck, fast ein Drittel der Aminosäuren ist in die native  $\beta$ -Struktur involviert, ähnlich wie bei der temperaturinduzierten Entfaltung. Allerdings bleibt hier die Frage offen, ob die Tetramere dabei dissoziieren. Um Informationen über Änderungen der Tertiärstruktur zu erhalten, wurden ergänzend Fluoreszenz-Experimente durchgeführt (Ferrão-Gonzales 2003). Der ermittelte Entfaltungsdruck  $p_{1/2}$  liegt dabei bei 2.7 kbar bei pH 7.5. Die Fluoreszenz-Ergebnisse zeigen, dass bei der Entfaltung erst die Tertiärstruktur und anschließend die Sekundärstruktur partiell zerstört wird.



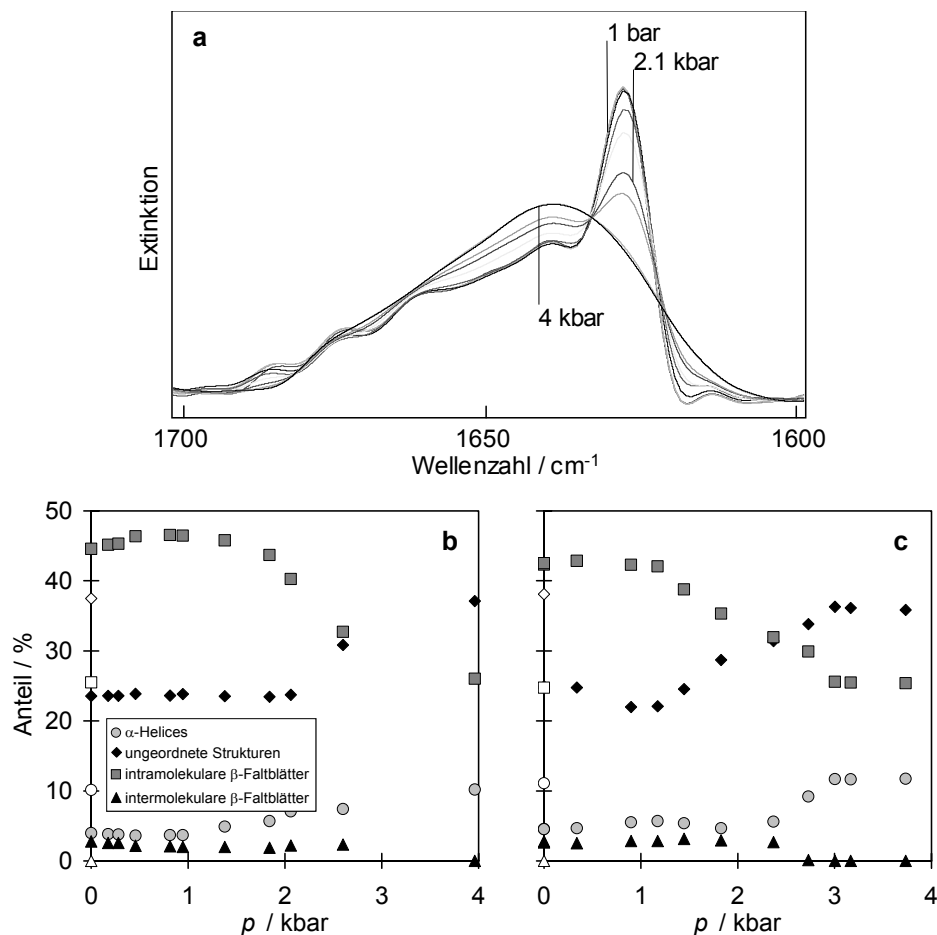
**Abbildung 30:** Druckinduzierte Entfaltung von TTR bei 37 °C und pD 5.0 (4 Gew.%, 100 mM KCl). (a) FT-IR Spektren von TTR im Amid I'-Bereich. (b) Relative Sekundärstrukturanteile als Funktion des Druckes.



**Abbildung 31:** Druckinduzierte Entfaltung und Aggregation von TTR bei 37 °C (4 Gew.%, 100 mM KCl). FT-IR Spektren von TTR bei pD 7.5 im Bereich von 1700 bis 1600 cm<sup>-1</sup> (a) und relative Sekundärstrukturanteile von TTR bei pD 7.5 (b) und bei pD 5.0 (c) als Funktion des Druckes. Leere Symbole repräsentieren die Sekundärstruktur nach dem Rückkehr zu 1 bar (Schleifen werden hier nicht gezeigt).

Um den Einfluss tiefer Temperaturen auf die Entfaltung zu untersuchen, wurden druckabhängige Experimente bei 5 °C durchgeführt. Tiefe Temperaturen schwächen die hydrophoben „Wechselwirkungen“ und können folglich die Proteinstruktur beeinflussen (Privalov 1990, Foguel 1994). Da aber unter Druck die hydrophoben Flächen bevorzugt solvatisiert werden, kann es zu einer Beeinträchtigung der Druckstabilität bei tiefen Temperaturen kommen. Die Spektren von TTR bei pD 7.5 und 5 °C und der Verlauf der relativen Intensitäten der einzelnen Strukturelemente bei pD 7.5 und pD 5.0 sind in Abbildung 32 dargestellt. Die Spektren im nativen Zustand haben eine ähnliche Form wie die Spektren bei hohen Temperaturen. Im Rahmen der Fehlerabweichung lassen sich keine signifikanten Unterschiede bei den einzelnen Sekundärstrukturanteilen zwischen 37 °C und 5 °C erkennen. Allerdings entfaltet das Protein bei 5 °C bei etwas kleineren Drücken als bei 37 °C ( $p_{1/2}$  liegt hier bei  $2.2 \pm 0.1$  kbar bei pD 5.0 bzw. bei  $2.4 \pm 0.1$  kbar bei pD 7.5). Die Veränderungen der einzelnen Sekundärstrukturanteile bei der Entfaltung sind ähnlich wie bei

der Entfaltung bei 37 °C. Es werden neue ungeordnete Strukturen aus  $\beta$ -Faltblättern und Schleifen aufgebaut. Dabei steigt der Anteil der ungeordneten Strukturen von 25 % (pD 5.0) bzw. 24 % (pD 7.5) auf 36 % (pD 5.0) bzw. 37 % (pD 7.5) an. Die  $\beta$ -Faltblätter nehmen von 42 % (pD 5.0) bzw. 45 % (pD 7.5) auf 25 % (pD 5.0) bzw. 26 % (pD 7.5) ab. Die Angaben beziehen sich auf die Zustände bei 1 bar und 4 kbar.



**Abbildung 32:** Druckinduzierte Entfaltung von TTR bei 5 °C. FT-IR Spektren von TTR bei pD 7.5 im Bereich von 1700 bis 1600 cm<sup>-1</sup> (a) und relative Sekundärstrukturanteile von TTR bei pD 7.5 (b) und pD 5.0 (c) als Funktion des Druckes (Schleifen werden nicht gezeigt). Leere Symbole repräsentieren die Sekundärstruktur nach dem Rückkehr zu 1 bar.

Offenbar führt die Entfaltung unter Druck zu einem anderen Zustand als die Entfaltung durch hohe Temperaturen. Während der Anteil der ungeordneten Strukturen bei der thermischen Entfaltung abnimmt, steigt er bei der druckinduzierten Entfaltung bei den untersuchten Bedingungen. Intermolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, die zu einem geringen Anteil im nativen Tetramer vorhanden sind (4 %), nehmen während der thermischen Entfaltung drastisch zu, während unter Druck der native  $\beta$ -Barrel von TTR nur partiell abgebaut wird. Unter Druck muss das Protein/Wasser-System ein kleineres Volumen einnehmen, was hier

durch Abbau von geordneten zu Gunsten ungeordneter Strukturen erreicht wird. Die Entfaltung unter Druck führt hier nicht zu einem völlig entfalteten Zustand, sondern zu einem partiell entfalteten Zustand, der auf dem Faltungsweg unter Normaldruck-Bedingungen liegen könnte. Interessanterweise werden unter Druck ca. 40 % der nativen  $\beta$ -Faltblätter abgebaut - nahezu konstant bei allen Bedingungen. Das bedeutet, dass 23 der 56 Aminosäuren, die beim Aufbau der A-H Stränge beteiligt sind, eine andere Sekundärstruktur annehmen (hauptsächlich Schleifen und ungeordnete Strukturen). H/D Austausch-Experimente (Liu 2000, 2002) zeigen, dass das Faltblatt CBEF wesentlich labiler ist als die andere Hälfte des Barrels (ADGH). Das Faltblatt CBEF besteht aus insgesamt 29 Aminosäuren. Möglicherweise wird gerade diese labile Region unter Druck entfaltet. Ergänzende Studien an TTR bei pH 5.0 und 37 °C zeigen, dass nach dem Wiederherstellen des Normaldruckes die Lichtstreuung drastisch zunimmt, begleitet durch eine starke Bindung von Kongorot und Thioflavin T (Foguel 2003). Anscheinend ist die druckinduzierte Entfaltung nicht vollständig reversibel im Fall des TTR, was eine Ausnahme darstellt. Das gebildete Intermediat neigt zur Fibrillbildung nach dem Ablassen des Druckes.

Um diese These zu überprüfen, wird die Sekundärstruktur der gebildeten Spezies FT-IR-spektroskopisch untersucht. Dazu wird der Druck erst langsam (2 kbar/h) auf 4 kbar erhöht und dann 1 h gehalten; anschließend wird der Normaldruck wieder hergestellt und zeitabhängig Spektren aufgenommen (innerhalb von 3 h und nach 18 h). Die Messungen werden an TTR bei pD 7.5 und 5.0 bei zwei Temperaturen (37 °C und 5 °C) durchgeführt.

Im Fall von TTR bei 37 °C und pD 5.0 beobachtet man eine stetige Zunahme der Intensität der Bande bei  $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$ , unmittelbar nach dem Ablassen des Druckes. Nach  $\sim 90$  min ist die Umwandlung beendet und die Form der Amid I'-Bande ändert sich nicht mehr. Die Entwicklung der Sekundärstruktur erinnert auf den ersten Blick an eine Rückfaltung: Die ungeordneten Strukturen nehmen ab (26 % nach 18 h), und die  $\beta$ -Faltblätter nehmen zu (46 % nach 18 h). Allerdings unterscheidet sich die Bandenform und die Lage der Bandenmaxima signifikant von der nativen Form. In Abbildung 31c ist der Endzustand durch die leeren Symbole dargestellt, und in Tabelle 16 sind die Sekundärstruktur-Anteile vergleichend aufgelistet.

Für TTR bei pD 7.5 (37 °C) beobachtet man ein ähnliches Verhalten wie für TTR bei pD 5.0. Auch hier entsteht eine Bande bei  $\sim 1624 \text{ cm}^{-1}$  nach dem Ablassen des Druckes. Diese nimmt allerdings wesentlich langsamer zu als im Fall von TTR bei pD 5.0. Der Anteil der  $\beta$ -Faltblätter nimmt dabei von  $\sim 29$  % (4 kbar) auf 40 % (nach 18 h bei 1 bar) zu, während der Anteil der ungeordneten Strukturen von  $\sim 39$  % auf  $\sim 35$  % abnimmt. Die Schleifen nehmen

dabei von ~26 % auf ~19 % ab (s. Abbildung 31b und Tabelle 16). Dagegen wird das native TTR bei 37 °C und 1 bar bei einer mehrtägigen Lagerung nicht verändert.

Bei 5 °C findet keine signifikante Änderung der Sekundärstruktur nach dem Wiederherstellen des Normaldruckes statt. Die Form der Amid I'-Bande und die relativen Strukturanteile im entfalteten Zustand bei 4 kbar und nach 18 h bei 1 bar unterscheiden sich nicht. Offensichtlich ist die druckinduzierte Entfaltung bei 5 °C irreversibel, sowohl bei pD 5.0 als auch bei pD 7.5 (Abbildungen 32b und 32c).

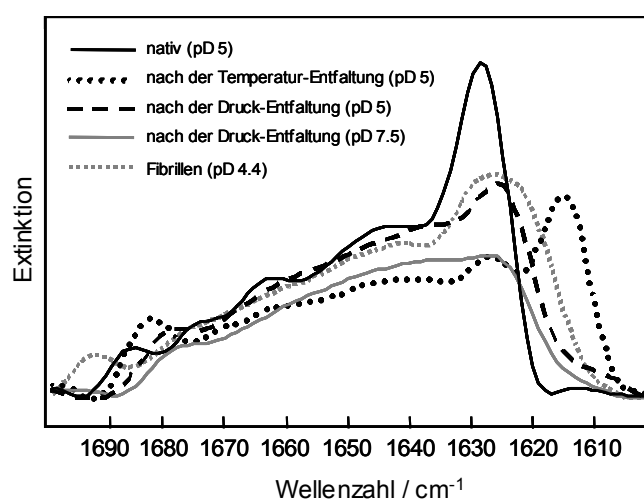
#### 4.2.5 Vergleich der Aggregatstruktur

Das tetramere TTR bleibt assoziiert bis pH 5.0 (bei 37 °C), und dissoziiert bei tieferen pH-Werten unter langsamer Bildung von amyloiden Fibrillen, wobei die stärkste und schnellste Fibrillbildung bei pH 4.4 beobachtet wird (Lai 1996). Die Sekundärstruktur solcher Fibrillen wird mit der Struktur von den druck- und temperaturinduzierten Aggregaten verglichen. Die TTR-Fibrillen wurden zu diesem Zweck extern präpariert, indem die Protein-Lösung (4 Gew.%, 100 mM KCl, pD 4.4) für 72 h auf 37 °C erhitzt wurde. In Abbildung 33 ist das Spektrum von Fibrillen zusammen mit den Spektren von anderen Aggregaten und dem nativen Protein vergleichend dargestellt (alles bei 25 °C). Die Amid I'-Bande der Fibrillen hat ein breites Maximum im Bereich zwischen 1615 und 1635  $\text{cm}^{-1}$ , das charakteristisch für  $\beta$ -Faltblattstrukturen ist. Das Spektrum unterscheidet sich sehr deutlich von dem des nativen Proteins und hat eine Ähnlichkeit mit dem druckinduzierten Aggregat bei pD 5.0. Durch die Analyse der Fibrill-Bande lassen sich sechs Teilbanden von Sekundärstrukturelementen bestimmen: Intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1630 und 1621  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\alpha$ -helikale Strukturen (1649  $\text{cm}^{-1}$ ), Schleifen (1676 und 1659  $\text{cm}^{-1}$ ) und ungeordnete Strukturen (1641  $\text{cm}^{-1}$ ). Die relativen Intensitäten der Banden sind in Tabelle 16 aufgelistet. Dabei liegt der Anteil der  $\beta$ -Faltblätter bei ~44 %, der ungeordneten Strukturen bei ~14 % und der Schleifen bei ~32 %.

Die Sekundärstruktur der Fibrillen hat eine Ähnlichkeit mit der Sekundärstruktur der druckinduzierten Aggregate bei pD 5.0. Allerdings ist der Anteil der ungeordneten Strukturen bei den Fibrillen etwas niedriger als bei anderen Aggregaten und bei nativem TTR (vgl. Tabelle 16). Dieses kann mit der Zeitabhängigkeit der druckinduzierten Aggregation erklärt werden. Möglicherweise erreichen die Aggregate dieselbe Struktur erst nach mehreren Tagen. Nun stellt sich die Frage, ob die temperaturinduzierten Aggregate auch eine fibrilläre Struktur aufweisen. Da sich das Spektrum von diesen Aggregaten vom Spektrum von Fibrillen unterscheidet, müssen diesen unterschiedliche Strukturen zugrunde liegen (Abb. 33). Auffallend ist, dass die Fibrillen keine antiparallelen intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter

aufweisen, zum Unterschied von thermisch-induzierten Aggregaten. Anscheinend entstehen beim Erhitzen amorphe Aggregate und keine geordneten fibrillaren Strukturen.

Wie die neuesten NMR Untersuchungen an amyloiden TTR Fibrillen zeigen (Olofsson 2004), bestehen die Fibrillen aus einem Kern, der aus sechs  $\beta$ -Strängen (ABEFGH) aufgebaut ist. Die Stränge C und D bilden eine lange Schleife, während die Stränge A und B frei und für intermolekulare Wechselwirkungen zugänglich sind. Dieses Modell steht im Einklang mit der Beobachtung, dass ein Teil der nativen  $\beta$ -Faltblätter nach der Aggregation erhalten bleibt.



**Abbildung 33:** Vergleich der Sekundärstruktur von TTR nach verschiedenen Behandlungen (25 °C, 1 bar, 4 Gew.%, 100 mM KCl).

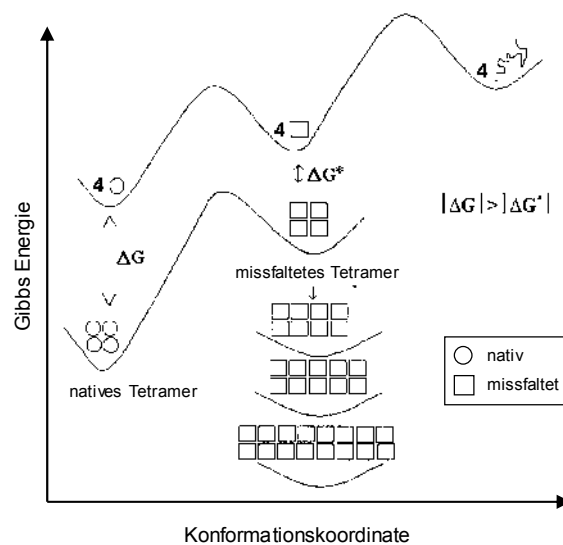
**Tabelle 16:** Vergleich der relativen Sekundärstruktur-Anteile von TTR nach Druck- Temperatur- und pH-induzierter Entfaltung (Angaben in %, Abweichung  $\pm 2$  %).

	Natives TTR		nach Druck-Entfaltung			nach Temperatur-Entfaltung		Fibrillen
	pD 7.5	pD 5.0	pD 7.5		pD 5.0	pD 7.5	pD 4.4	
	25 °C	37 °C	5 °C	37 °C	5 °C	25 °C	25 °C	
$\alpha$ -Helix	3.3	6.6	11.1	5.2	10.1	1.3	4.4	10.0
ungeordnet	28.8	25.9	38.1	35.1	37.5	22.9	21.7	13.8
Schleifen	22.7	21.5	26.1	19.5	26.9	20.8	22.4	31.7
intram. $\beta$ -Faltblätter	41.7	46.0	24.7	40.3	25.5	26.6	32.3	44.5
antiparallele $\beta$ -Faltblätter	3.6	0	0	0	0	28.3	19.2	0
<i>alle <math>\beta</math>-Faltblätter</i>	<i>45.2</i>	<i>46.0</i>	<i>24.7</i>	<i>40.3</i>	<i>25.5</i>	<i>54.9</i>	<i>51.6</i>	<i>44.5</i>

## 4.2.6 Zusammenfassung

Transthyretin ist ein tetrameres amyloidogenes Protein, dessen Aggregation für mehrere pathogene Krankheiten verantwortlich ist. Hier wurden die Änderungen der Sekundärstruktur von *wild-type human* TTR während der druck- und temperatur-induzierten Entfaltung und Aggregation mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie studiert. Außerdem wurden mögliche Szenarien der Amyloid-Bildung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass während der thermischen Entfaltung ein Teil der nativen intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter in nicht-native intermolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblätter umgewandelt werden, die allerdings keine fibrilläre Morphologie haben. Bei der druckinduzierten Entfaltung entsteht ein partiell entfaltetes Intermediat, in dem ca. 60 % der nativen  $\beta$ -Faltblätter intakt bleiben und die restlichen  $\beta$ -Faltblätter in eine ungeordnete Struktur umgewandelt werden. Dieses Intermediat aggregiert nach der Rückkehr zu 1 bar. Die Aggregation ist allerdings pH- und temperaturabhängig. Am schnellsten und ausgeprägtesten findet die Aggregation bei 37 °C und pD 5.0 statt, während bei 5 °C das Intermediat stabil bleibt. Ein Teil des TTR-Monomers muss also seine Tertiär- und Sekundärstruktur verlieren, damit es intermolekulare Kontakte ausbilden kann und somit die Bildung amyloider Fibrillen ermöglicht. Dabei findet eine Restrukturierung der entfalteten  $\beta$ -Faltblätter (möglicherweise der Stränge C und D) statt.

Diese Ergebnisse bestätigen das Modell der TTR-Aggregation, das mit Hilfe von Lichtreu- und Fluoreszenz-Experimenten aufgestellt wurde (Abbildung 34) und hier näher auf der molekularen Ebene untersucht wurde.



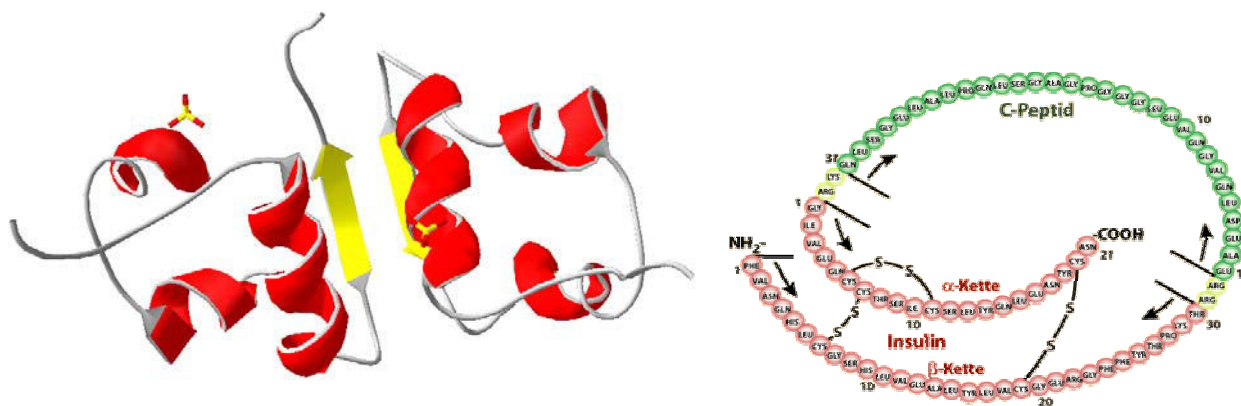
**Abbildung 34:** Schematisches Diagramm für Dissoziation, Entfaltung und Aggregation von TTR (Ferrão-Gonzales 2000).

### 4.3 Insulin-Aggregation

#### 4.3.1 Strukturelle und biologische Eigenschaften von Insulin

Das Insulin-Monomer (5.7 kDa) besteht aus 2 längeren Polypeptiden, einer A-Kette mit 21 und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren. Die beiden Ketten sind durch 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden, die zwischen den Cysteinen A7 und B7 sowie A20 und B20 ausgebildet werden (Abbildung 35). Eine dritte Disulfidbrücke (A6-A11) liegt innerhalb der A-Kette. Die A-Kette bildet zwei  $\alpha$ -Helices, A1-A8 und A12-A19. Die B-Kette besteht aus zwei  $\beta$ -Strängen, B1-B5 und B24-B28, und einer  $\alpha$ -Helix (B9-B19).

Insulin ist ein Hormon, das im Organismus den Glycose-Metabolismus reguliert und in den sogenannten  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas synthetisiert wird. In den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER) wird zunächst ein inaktives Präproinsulin synthetisiert, ein Peptid aus 107 Aminosäuren. Es besteht aus einer Signalsequenz (leader), an die sich zunächst die 30 Aminosäuren der  $\beta$ -Kette schließen, danach ein C-Peptid und schließlich die  $\alpha$ -Kette aus 21 Aminosäuren. Die Signalsequenz sorgt dafür, dass Präproinsulin in den Innenraum des Endoplasmatischen Retikulums transportiert wird. Dort erfolgt die weitere „Reifung“. Durch Abspaltung der Signalsequenz und Bildung von drei Disulfidbrücken entsteht das Proinsulin (84 Aminosäuren) (Abbildung 35b). Im weiteren Verlauf wird die C-Kette durch spezifische Peptidasen abgespalten. Das Insulinmolekül liegt dann als Hexamer, durch zwei Zinkionen stabilisiert, in Vesikeln an der Zellmembran der  $\beta$ -Zelle gespeichert vor. Ein steigender Blutzuckerspiegel (ab ca. 4 mmol Glucose/l Blut) als Sekretionsreiz führt schließlich durch Verschmelzen der Membranen zur Entleerung des Vesikelinhaltes in den Extrazellulärraum. Insulin wechselwirkt mit den Rezeptoren als Monomer.



**Abbildung 35:** Links: Röntgenkristallstruktur des Insulin-Dimers bei pH 2.0 (Whittingham 2002, PDB-Eintrag: 1guj). Rechts: Primäre Struktur von Proinsulin.

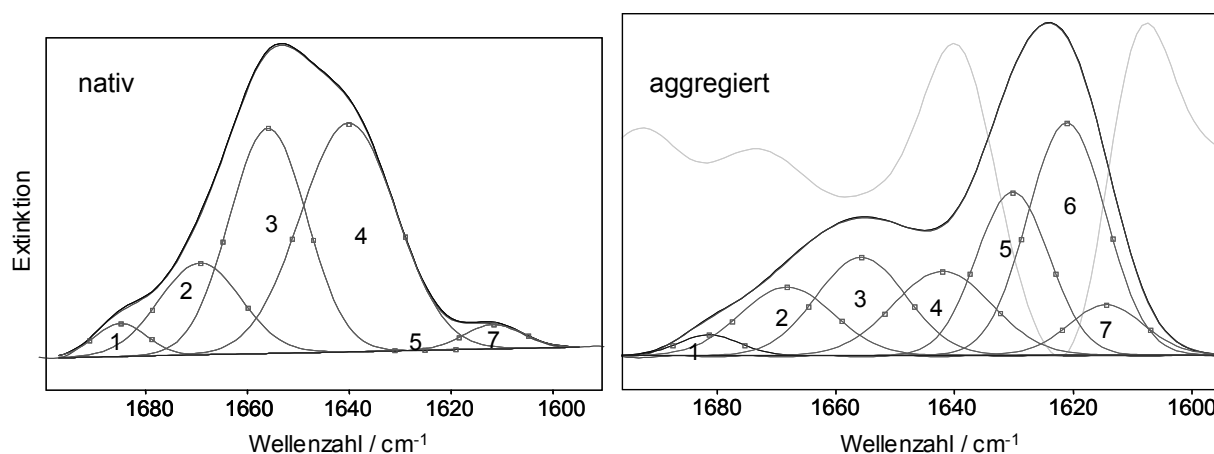
*In vitro* hat Insulin die Tendenz unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken Dimere und Tetramere zu bilden. In Anwesenheit von Zink bilden sich aus den Dimeren stabile Hexamere (zwei  $Zn^{2+}$  Ionen pro Hexamer). Durch die Bildung von Hexameren im Organismus wird eine effiziente Packung erreicht und es können größere Mengen an Protein in den pankreatischen Vesikeln gelagert werden. Je nach pH-Wert und Konzentration verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der Monomere (im saueren Bereich) oder Hexamere (im neutralen Bereich). Die native Faltung wird dabei nicht beeinflusst (Whittingham 2002). Möglicherweise schützt die Dimer- und Hexamer-Bildung auch vor der physikalischen und chemischen Degradation in den Zellen (Dodson 1998), da die hydrophoben Oberflächen des Insulin-Moleküls durch die Dimerisierung verborgen werden. Die Bedingungen, die die Bildung von Monomeren begünstigen, fördern hingegen auch die Aggregation und Fibrillierung von Insulin (Whittingham 2002 und Ref. darin).

Die Aggregation von Insulin stellt ein pharmakologisches und physiologisches Problem dar. Einerseits führt es zu einem Verlust der biologischen Aktivität und macht somit die Diabetis-Pharmaka begrenzt haltbar (Owens 2002), andererseits führen die amyloiden Ablagerungen von Insulin im Organismus von Diabetis II-Patienten (Westermarck 1983, 1987) und auch nach der Insulin-Injektion (Brange 1997) zu enormen degenerativen Schäden. Trotz der 50-jährigen Insulin-Forschung ist der Mechanismus der Insulin-Aggregation nicht geklärt. Der Aggregationsprozess verläuft vermutlich über folgende Stufen: Bildung der monomeren Form, Bildung eines partiell entfalteten Intermediates, Keimbildung (Bildung intermolekularer Kontakte über Assoziation hydrophober Flächen) und Fibrillbildung. Die Kinetik der Aggregation kann durch mehrere Faktoren beschleunigt werden: Saueres Milieu (pH 1.5-2.5), Hitze ( $T > 60$  °C), Agitation und hohe Konzentration (Brange 1997), Wechselwirkung mit hydrophoben Flächen wie Teflon (Sluzky 1991), mit Luft-Wasser (Nielsen 2001c) oder Lipid-Wasser (Sharp 2002) -Oberflächen. Die Anwesenheit von Denaturantien (z. B. Harnstoff) beschleunigt die Aggregation, während Stabilisatoren (z. B. Sucrose) eine hemmende Wirkung haben (Nielsen 2001). Die Insulin-Mutanten mit mehr polaren (Ser) oder geladenen (Glu, His, Gln) Aminosäuren an Stelle von hydrophoben (Val, Leu, Ala) verlangsamen die Aggregationskinetik (Nielsen 2001a).

#### 4.3.2 Sekundärstruktur von Insulin

Zunächst wird die Sekundärstruktur von Insulin FT-IR-spektroskopisch bestimmt. Dazu werden die charakteristischen Schwingungsbanden im Amid I'-Bereich analysiert, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben.

Um die Strukturanteile zu bestimmen, werden die Spektren im Bereich von 1696 bis 1595  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Halbwertsbreite von 15  $\text{cm}^{-1}$  und einem Verstärkungsfaktor von 1.2 entfaltet und mit sechs (natives Insulin) bzw. sieben (aggregiertes Insulin) Gauß-Lorentz-Funktionen angepasst wie in Abbildung 36 exemplarisch gezeigt ist. Die genaue Zuordnung der Wellenzahlen in der Amid I'-Bande ist in Tabelle 17 aufgelistet.



**Abbildung 36:** Bandenanalyse der Amid I'-Region von Insulin bei pD 1.9. Die Bande wird mit sechs (natives Insulin) bzw. sieben (aggregiertes Insulin) Gauß-Lorentz Funktionen angepasst: (1, 7) intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter, (2) Schleifen, (3)  $\alpha$ -Helices, (4) ungeordnete Strukturen, (5, 6) intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter. Rechts ist zusätzlich die zweite Ableitung des Spektrums gezeigt.

**Tabelle 17:** Sekundärstruktur von Insulin bei 25 und 70 °C (2 Gew.%, pD 1.9, in  $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ ). Abweichung der Bandenlagen  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$  und der Bandenflächen  $\pm 2 \%$ .

Struktur-Element	natives Insulin (25 °C)		aggregiertes Insulin (3h@70 °C)	
	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	Anteil / %	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	Anteil / %
Schleifen	1669	14.9	1667	10.9
$\alpha$ -Helices	1656	34.9	1655	15.0
ungeordnet	1640	44.0	1643	14.1
parallele $\beta$ -Faltblätter	1625	-	1622, 1631	51.2
antiparallele $\beta$ -Faltblätter	1612, 1685	6.2	1614, 1680	8.8

Das native dimere Insulin besteht bei pD 1.9 demnach aus 14.9 % Schleifen, 34.9 %  $\alpha$ -Helices, 44 % ungeordneten Strukturen und 6.2 % antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mit  $\pm 2 \%$  Abweichung. Zum Vergleich werden aus der Röntgen-Kristallstruktur von Insulin bei pH 2.0 (PDB-Eintrag: *Iguj*, Whittingham 2002) die entsprechenden Strukturanteile berechnet. Kristallines Insulin besitzt 6 % antiparallele  $\beta$ -Faltblatt, 41 %  $\alpha$ -Helices, 4 % 3-10 Helices

und 49 % ungeordnete Strukturen und Schleifen, was gut mit den IR-Ergebnissen übereinstimmt.

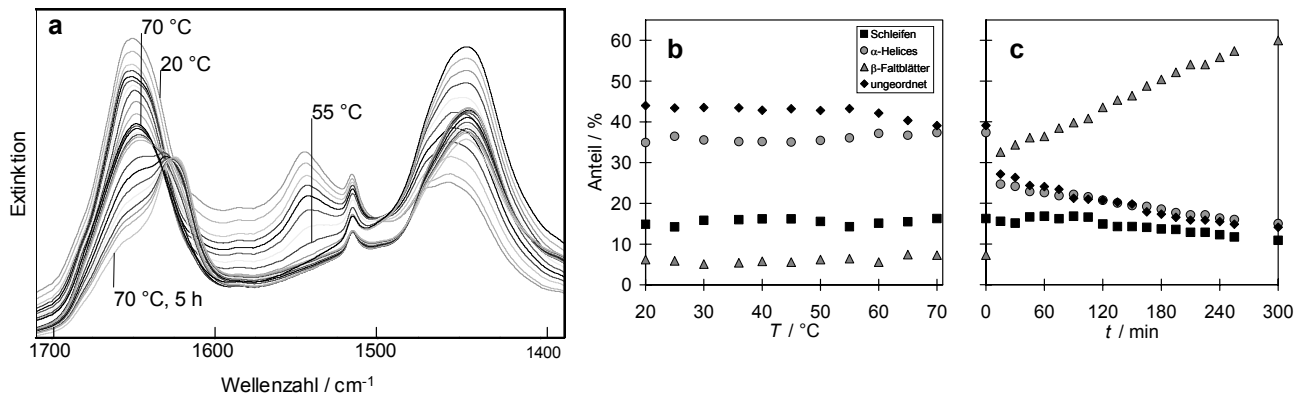
#### 4.3.3 Temperatur-induzierte Aggregation von Insulin

Das Szenario der Entfaltung und Aggregation von Insulin wird im Temperaturbereich von 20 bis 70 °C bei pD 1.9 FT-IR-spektroskopisch untersucht. Die Kinetik der Aggregation wird über mehrere Stunden bei 70 °C verfolgt. Um den Einfluss der Protein-Konzentration zu verifizieren, werden diese Experimente bei 2 und 4 Gew.% Insulin durchgeführt.

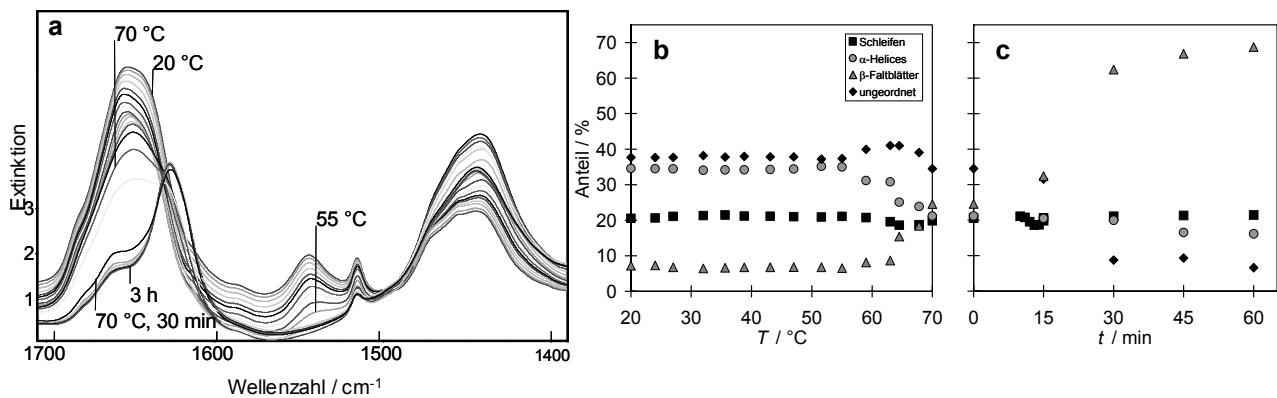
Die Abbildung 37a zeigt die Amid I'-, Amid II- und Amid II'-Banden von Insulin (2 Gew.%) in Abhängigkeit der Temperatur. Das Maximum der Amid I'-Bande von nativem Insulin liegt bei  $\sim 1653 \text{ cm}^{-1}$ , typisch für Proteine mit einem hohem Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturen. Die Amid II Bande bei  $\sim 1546 \text{ cm}^{-1}$  ist stark ausgeprägt, was ein Indiz dafür ist, dass nicht alle Protonen im Protein ausgetauscht sind. Offensichtlich verbirgt sich ein Teil der N-H Gruppen im Inneren des Moleküls und hat keinen Kontakt mit dem Lösungsmittel ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Die Form der Amid I'-Bande zeigt kaum Veränderungen bis  $\sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Es ist nur eine kleine Rot-Verschiebung des Wellenzahlmaximums von  $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$  festzustellen, die auf den H/D-Austausch zurückzuführen ist. Während dessen nimmt die Intensität der Amid II'-Bande ( $\sim 1445 \text{ cm}^{-1}$ ) auf Kosten der Amid II Bande zu. Oberhalb von 55 °C verschwindet die Amid II-Bande komplett, der H/D-Austausch ist dann vollzogen. Offensichtlich findet hier eine Änderung der Tertiärstruktur statt, bei der die native Sekundärstruktur erhalten bleibt. Möglicherweise erfolgt hier die temperaturinduzierte Dissoziation der Dimere, was den H/D Austausch der N-H Gruppen der nun freigegebenen hydrophoben Aminosäuren ermöglicht.

Die Form der Amid I'-Bande zeigt eine leichte Veränderung oberhalb von 60 °C, wobei sich ab 15 min bei 70 °C ein Bandenmaximum bei  $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$  erkennen lässt. Dieses ist auf eine Zunahme der intermolekularen parallelen  $\beta$ -Faltblätter zurückzuführen und ein Indiz für die Insulin-Aggregation. Dabei entstehen zwei Arten von parallelen  $\beta$ -Faltblätter, eine mit stärkeren Wasserstoffbrücken-Bindungen (Bande um  $1622 \text{ cm}^{-1}$ ) und eine mit schwächeren Bindungen (Bande um  $1631 \text{ cm}^{-1}$ ) (vgl. Abb. 36b, Tab. 17). Mit fortschreitender Aggregation nimmt der Anteil der stärker H-Brücken gebundenen  $\beta$ -Faltblätter zu, es bilden sich also dichter gepackte, möglicherweise fibrillartige, parallele  $\beta$ -Faltblätter mit der Zeit.

Der Verlauf der relativen Intensitäten der Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit der Temperatur und der Zeit (bei 70 °C) ist in Abbildung 37b und 37c dargestellt.



**Abbildung 37:** Temperaturinduzierte Entfaltung von 2 Gew.% Insulin bei pD 1.9 (Heizrate 20°/h). (a) Amid I<sup>'</sup>-, Amid II- und Amid II'-Banden als Funktion der Temperatur. Flächenanteile der Sekundärstrukturelemente im Amid I<sup>'</sup>-Bereich als Funktion der Temperatur (b) und der Zeit bei 70 °C (c).



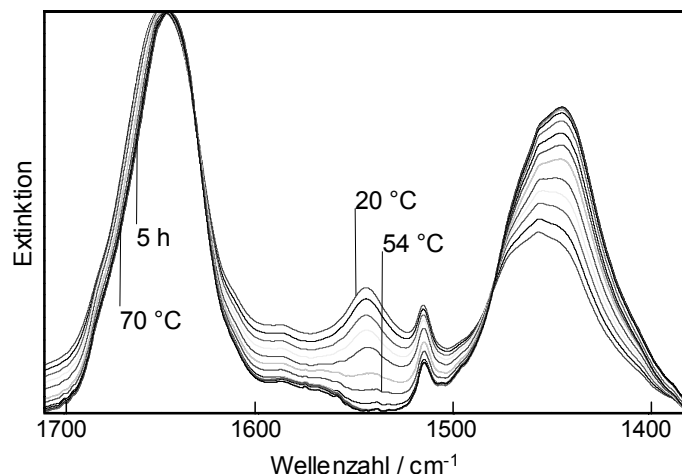
**Abbildung 38:** Temperaturinduzierte Entfaltung von 4 Gew.% Insulin bei pD 1.9. (a) Amid I<sup>'</sup>-, Amid II- und Amid II'-Banden als Funktion der Temperatur. Flächenanteile der Sekundärstrukturelemente im Amid I<sup>'</sup>-Bereich als Funktion der Temperatur (b) und der Zeit bei 70 °C (c).

Die Aggregation beginnt nach 15 min bei 70 °C und ist nach 300 min noch nicht abgeschlossen. Dabei nimmt der Anteil an  $\alpha$ -Helices von 35 % (25 °C) auf 15 % (300 min, 70 °C) und der Anteil an ungeordneten Strukturen von 44 % auf 14 % ab. Gleichzeitig bilden sich intermolekuläre parallele  $\beta$ -Faltblätter (60 % nach 300 min).

Die Erhöhung der Protein-Konzentration von 2 auf 4 Gew.% ändert zwar nicht die native Sekundärstruktur, führt aber zu einer signifikanten Beschleunigung der Aggregation (Abb. 38). Während der H/D-Austausch genau so verläuft wie im Fall von 2 % Insulin und oberhalb von 55 °C abgeschlossen ist, beginnt die partielle Entfaltung und Aggregation bereits bei 61 °C, also unmittelbar nach der Dissoziation der Dimere. Nach ~60 min, wenn der Anteil der  $\beta$ -Faltblätter 69 % erreicht hat, ist die Aggregation beendet (nach 180 min liegt der Wert bei 72 %).

#### 4.3.4 Insulin-Aggregation unter Druck

Um die Aggregation von Insulin unter Druck zu untersuchen, werden FT-IR-Experimente bei 300 bar durchgeführt. Bei moderaten Drücken unterhalb des Denaturierungsdruckes können nicht-kovalente Protein-Oligomere über eine Hydratisierung hydrophober Aminosäuren und Destabilisierung der Salz-Brücken dissoziiert werden. Der Druck wird erst auf 300 bar und dann die Temperatur von 20 auf 70 °C erhöht. Anschließend wird die Temperatur über 5 h konstant gehalten (Bedingungen wie bei der temperaturinduzierten Aggregation). Die Spektren (Amid I'-, Amid II- und Amid II'-Banden) sind in Abbildung 39 dargestellt. Das Spektrum bei 25 °C und 300 bar unterscheidet sich nicht von dem Spektrum bei 1 bar. Die native Sekundärstruktur wird durch diesen Druck nicht verändert. Im Temperaturbereich von 20 bis ~54 °C findet der H/D-Austausch statt, und das Amid I'-Bandenmaximum verschiebt sich um  $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$  zu kleineren Wellenzahlen, wie bereits für Insulin bei 1 bar beobachtet wurde. Im weiteren Verlauf lässt sich allerdings keine Veränderung der Amid I'-Bande feststellen. Es findet keine Aggregation statt. Offensichtlich dissoziiert der Druck die entstehenden Oligomere, und verhindert somit die Aggregation. Die Bildung von Aggregaten über intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter scheint hier thermodynamisch ungünstig zu sein, da dieses zunächst zu einer Zunahme des Gesamtvolumens des Systems führen würde. Die Ergebnisse bestätigen den molekularen Mechanismus der Insulin-Aggregation über die Dissoziation und Bildung eines partiell entfalteten Intermediates als wichtige Zwischenstufe.



**Abbildung 39:** FT-IR Spektren von Insulin als Funktion der Temperatur und Zeit bei 300 bar (2 Gew.%, pD 1.9).

#### 4.3.5 Zusammenfassung

Insulin ist ein kleines Protein-Hormon (5.7 kDa), das in seiner nativen Form das Glycose-Niveau im Organismus reguliert und unter bestimmten Umständen in die aggregierte (missfaltete) Isoform umgewandelt wird. Diese Form weist keine biologische Aktivität auf und ist ferner an einer Amyloidose beteiligt. Die Änderungen der Sekundärstruktur von Insulin während der temperaturinduzierten Entfaltung und Aggregation wurden mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie untersucht und Szenarien der Aggregation diskutiert. Die Ergebnisse zeigen, dass während der Aggregation ein Großteil der nativen  $\alpha$ -Helices in nicht-native intermolekulare parallele  $\beta$ -Faltblätter umgewandelt wird. Diese Umwandlung wird durch steigende Protein-Konzentration beschleunigt. Im ersten Schritt der Umwandlung findet eine Änderung der Tertiärstruktur statt, die ohne Änderungen der Sekundärstruktur verläuft und eine konzentrationsunabhängige Kinetik aufweist. Möglicherweise findet hier eine Dissoziation der Dimere statt. Im nächsten Schritt erfolgt die Bildung eines partiell entfalteten Intermediates, das über intermolekulare (hydrophobe) Kontakte  $\beta$ -Faltblätter ausbildet. Dieser Schritt wird durch einen moderaten Druck von 300 bar gehemmt.

## 5 Kubische Lipid-Phasen

### 5.1 Das System Monoolein-Wasser

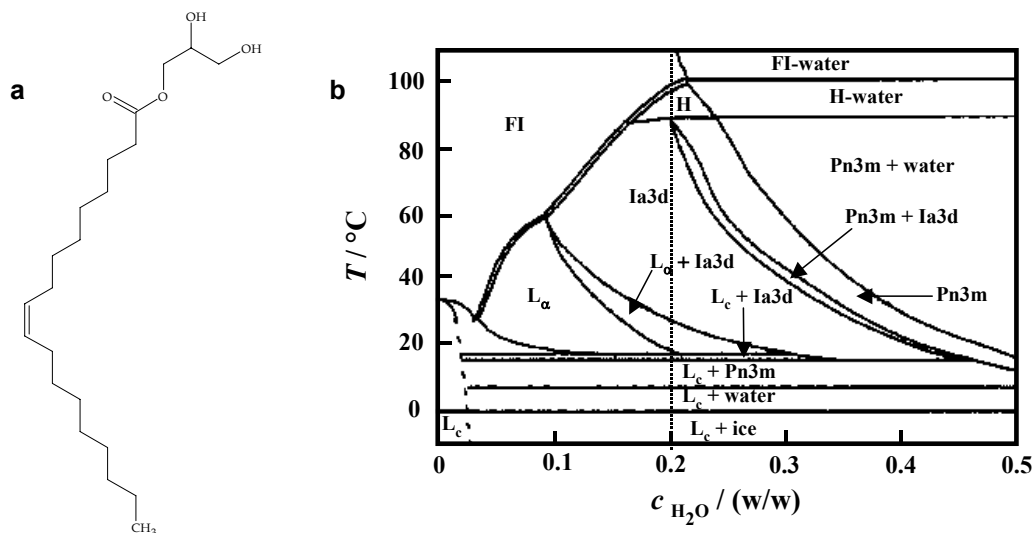
#### 5.1.1 Das Lipid Monoolein

Das Lipid Monoolein (MO) ist ein 1-Monoacylglycerid der 9-*cis*-Octadecen-Säure ( $C_{17}H_{33}CO_2CH_2-CH(OH)-CH_2OH$ ,  $M = 356.5 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 0.942 \text{ g/cm}^3$ ). Es ist ein neutrales Lipid, das wegen seiner chemischen Struktur (ungesättigte Alkylkette, kleine Kopfgruppe) in Wasser eine Tendenz zur Ausbildung von nicht-lamellaren Phasen hat. Durch Erhöhen des Wassergehalts geht die lamellare Phase zuerst in die kubische Ia3d Phase und dann in die kubische Pn3m Phase über. Ein detailliertes Phasendiagramm des MO-Wasser-Systems ist in Abbildung 40 dargestellt. Die MO/Wasser-Dispersionen stellen gute Modelle dar, an denen der Mechanismus der kubisch-lamellaren Phasenübergänge im Bezug auf Membranfusion studiert werden kann (s. Abschnitt 2.1.3, Kozlovsky 2002, Siegel 1997 und Ref. darin).

Kubische MO/Wasser-Phasen sind wegen ihrer Fähigkeit lipophile, amphiphile und hydrophile Moleküle gesteuert aufzunehmen und abzugeben sowie ihrer guten Biokompatibilität hervorragende Kandidaten für den Transport von Wirkstoffen, wie z. B. von Peptid-, Protein- und konventionellen Pharmazeutika (Shah 2001, Drummond 1999, Nielsen 1998). Sie stellen ein stabiles, optisch isotropes, viskoses Gel mit einer extrem großen Oberfläche (bis zu  $400 \text{ m}^2/\text{g}$ ) dar. Ein Vorteil der kubischen Phasen gegenüber Liposomen besteht in dem großen Verhältnis der Doppelschichtfläche zum Teilchenvolumen. Dieses ermöglicht eine hohe Beladung mit lipophilen und amphiphilen Wirkstoffen. Die Beladung kann entweder vor der Bildung der kubischen Phase durch direkte Zugabe zu den geschmolzenen Lipiden oder zur wässrigen Phase erfolgen, oder nach deren Bildung durch Diffusion in die Lipid-Wasser-Struktur. Die innere kubische Struktur kann allerdings durch ungünstige Wechselwirkungen mit den gelösten Teilchen zerstört bzw. verändert werden, und somit die Diffusionskinetik, die die Freisetzung der Arznei bestimmt, beeinflusst werden. Im Falle von Proteinen bleibt die native Konformation und Bioaktivität meistens erhalten, allerdings fehlen noch systematische Untersuchungen auf diesem Gebiet.

Die Monoolein/Wasser-Matrix wird bei einer neuen Methode der Kristallisation von Proteinen *in cubo* angewendet (Rummel 1998, Pebay-Peyroula 1997). Dabei lassen sich Proteine kristallisieren und charakterisieren, die aus Lösungen keine Kristalle bilden. Als treibende Kraft wird hier die eingeschränkte bzw. vorgegebene laterale Diffusion in den Wasserschichten diskutiert. Das chemische Potential der Proteine nimmt in den Kanälen zu,

ihre Löslichkeit wird herabgesetzt und die Kristallisation an den Defekten der kubischen Struktur ermöglicht (Monte-Carlo Simulation, Tanaka 2004). Interessanterweise funktioniert diese Methode auch bei Proteinen, die nach geometrischen Überlegungen nicht in die Wasserkanäle der kubischen Phase passen aber andererseits eine Abhängigkeit der Kristallsymmetrie von den Parametern der kubischen Phase aufweisen. Wahrscheinlich bauen sich die Proteine zum Teil in die hydrophoben Bereiche ein, die seine Mobilität einschränken, eine Orientierung vorgeben und den Kristallisationsprozess erleichtern (Nollert 2001, Landau 1996). Die Kristallisation kann allerdings auch mit der lokalen Veränderung der Lipid-Struktur einhergehen (Tanaka 2004, Misquitta 2003). Die detaillierte physikalische Erklärung des Mechanismus steht allerdings noch aus.



**Abbildung 40:** (a) Molekulare Struktur von MO. (b)  $T,c$ -Phasendiagramm von Monoolein-H<sub>2</sub>O (Briggs 1996).

### 5.1.2 Phasenverhalten von MO/Wasser - SAXS Untersuchungen

Zunächst wird das reine MO/20 Gew.% Wasser System charakterisiert, das für alle nachfolgenden Untersuchungen als ein Referenz-System dient. Bei dieser Wasser-Konzentration ist die kubische Ia3d Phase in einem großen Temperaturbereich stabil und bietet somit genügend Spielraum für die druckabhängigen Untersuchungen. Die temperaturabhängigen SAXS Experimente wurden in einem Temperaturbereich von 10 bis ~80 °C durchgeführt. Die druckabhängigen Messungen fanden in einem Bereich von 1 bis 4000 bar bei 35 und 50 °C statt.

In Abbildung 41 sind die Röntgendiffraktogramme von Monoolein/Wasser als Funktion der Temperatur (bei 1 bar) und des Druckes (bei 50 °C) dargestellt. Die Lage der Reflexe wird bestimmt und die vorliegenden Phasen indiziert (s. Kap. 2.1.4). Soweit nicht anders

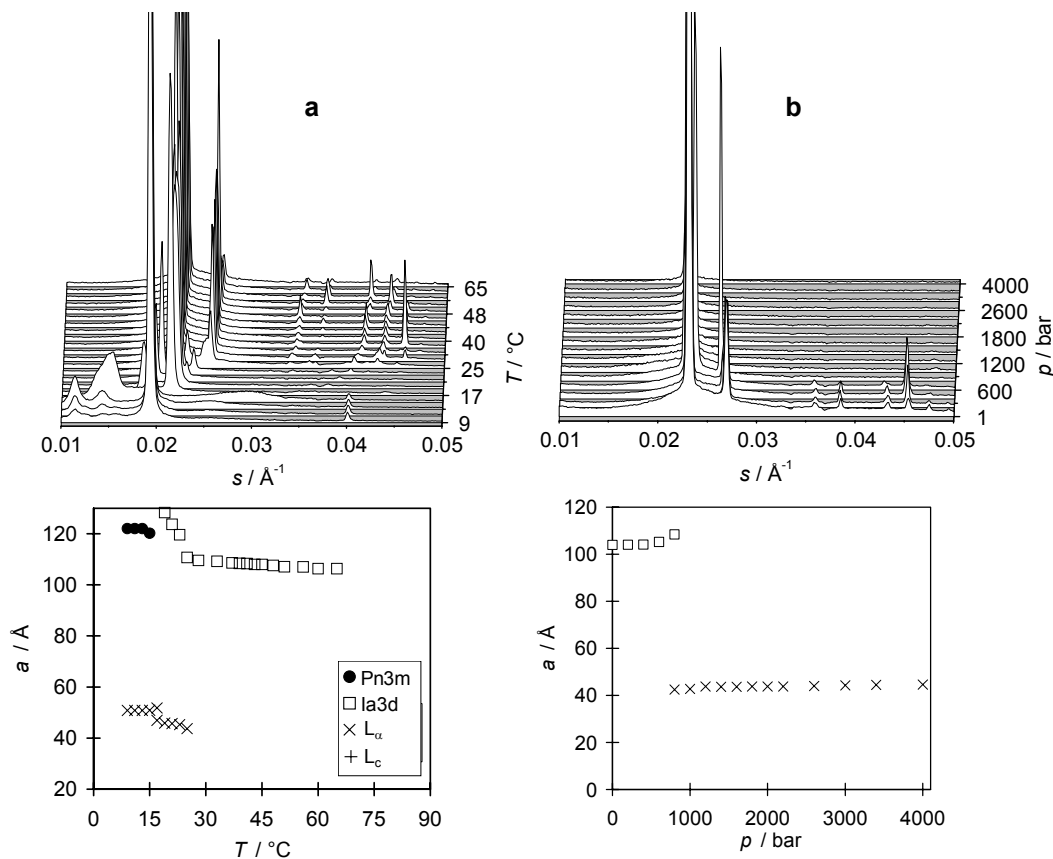
angegeben, beträgt der Fehler in der Bestimmung der kubischen Gitterkonstante  $\pm 1 \text{ \AA}$  und der lamellaren  $\pm 0.5 \text{ \AA}$ . Die Berechnung von Strukturparametern erfolgt wie im Abschnitt 2.1.4 beschrieben.

Beginnend bei niedrigen Temperaturen erkennt man im Kleinwinkelbereich die (110) und (111) Bragg-Reflexe der kubischen  $Pn3m$  Phase und die (001) und (011) Reflexe der kristallinen lamellaren  $L_c$  Phase. Oberhalb von  $17 \text{ }^\circ\text{C}$  werden die ersten beiden Ordnungen der flüssig-kristallinen  $L_\alpha$  Phase sichtbar neben den (211), (220), (321), (400), (420), (332), (422) Reflexen der kubischen  $Ia3d$  Phase. Die  $L_\alpha$  und  $Ia3d$  Phasen koexistieren bis  $\sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , danach liegt ausschließlich die  $Ia3d$  Phase vor. Die Temperaturabhängigkeit der Gitterkonstanten ist in Abbildung 41a (unteren) wiedergegeben. Die  $L_c$  Phase besitzt eine lamellare Gitterkonstante von  $50.8 \text{ \AA}$  und wird bei  $\sim 17 \text{ }^\circ\text{C}$  in die  $L_\alpha$  Phase mit kleinerer Gitterkonstante ( $a = 46 \text{ \AA}$ ) umgewandelt. Beim „Schmelzen“ der Lipidketten bilden sich zunehmend mehr *gauche* Konformere, was dann die Doppelschichtdicke und somit auch die Gitterkonstante verringert. Die  $Ia3d$  Phase entsteht mit einer anfänglich großen Gitterkonstante von  $131 \text{ \AA}$ , die bis  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  nichtlinear abnimmt. Oberhalb dieser Temperatur ist die  $L_\alpha \rightarrow Ia3d$  Phasenumwandlung abgeschlossen und die Gitterkonstante von  $Ia3d$  nimmt linear ab ( $-0.1 \text{ \AA}/^\circ\text{C}$ ). Die Gitterkonstante beträgt  $110 \text{ \AA}$  bei  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , was einer Lipidlänge von  $16.8 \text{ \AA}$  und dem Wasserkanal-Radius von  $10.4 \text{ \AA}$  entspricht. Bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  erreicht die Gitterkonstante  $107 \text{ \AA}$  und die Strukturparameter werden erwartungsgemäß etwas kleiner:  $l = 16.3 \text{ \AA}$  und  $r_w = 10.1 \text{ \AA}$ . Die Querschnittsfläche der Kopfgruppen steigt dabei von  $26.9 \text{ \AA}^2$  auf  $27.6 \text{ \AA}^2$ . Da die Lipid-Moleküle beweglicher werden und die Alkylketten mehr Platzbedarf haben, vergrößert sich der Abstand zwischen den Kopfgruppen.

Der Druckeffekt auf die  $Ia3d$  Phase wurde für zwei Temperaturen untersucht: bei  $35$  und  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Diffraktogramme und die berechneten Gitterkonstanten als Funktion des Druckes bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  sind in Abbildung 41b dargestellt. Im Druckbereich von  $1$  bis  $800 \text{ bar}$  erkennt man die Bragg-Reflexe der kubischen  $Ia3d$  Phase. Bei  $800 \text{ bar}$  nimmt die kubische Gitterkonstante um  $4 \text{ \AA}$  zu, gleichzeitig vergrößern sich die Lipidlänge und der Wasserkanal-Radius um  $\sim 4 \%$ . Oberhalb von  $800 \text{ bar}$  relaxiert die steigende Krümmungsfrustration der kubischen Phase und es entsteht die lamellare  $L_\alpha$  Phase mit einer Gitterkonstante von  $42.5 \text{ \AA}$  und einer Lipidlänge von  $17.6 \text{ \AA}$ . Die Wasserschichtdicke beträgt dabei  $\sim 7 \text{ \AA}$ . Mit steigendem Druck nimmt die lamellare Gitterkonstante zu ( $44.6 \text{ \AA}$  bei  $4 \text{ kbar}$ ), und die Lipidlänge erreicht dabei  $18.4 \text{ \AA}$ . Die Querschnittsfläche der Kopfgruppen nimmt von  $\sim 28 \text{ \AA}^2$  in der gekrümmten  $Ia3d$  Phase auf  $\sim 35 \text{ \AA}^2$  in der  $L_\alpha$  Phase zu. In geordneten (druckinduzierten) Phasen führt der abnehmende Platzbedarf der Alkylketten zu einer Reduktion der Krümmung der Lipidmonoschicht und die

Querschnittsfläche der Kopfgruppen nimmt zu. In der lamellaren Phase haben die Lipidmoleküle dann eine annähernd zylindrische Geometrie und die Querschnittsfläche vergrößert sich nochmals.

Bei 35 °C wird das gleiche Phasenverhalten beobachtet (hier nicht abgebildet). Der Phasenübergang von der Ia3d Phase ( $a = 110 \text{ \AA}$  bei 1 bar) in die  $L_\alpha$  Phase ( $a = 44 \text{ \AA}$  bei 1.2 kbar) wird bei  $\sim 750 \text{ bar}$  beobachtet.



**Abbildung 41:** Röntgendiffraktogramme von Monoolein (20 Gew.% Wasser) als Funktion der Temperatur bei 1 bar (a) und des Druckes bei 50 °C (b). Unten sind die entsprechenden Gitterkonstanten der Phasen aufgetragen.

### 5.1.3 Kinetik der Phasenübergänge

Die Kinetik und der Mechanismus der Ausbildung der kubischen Lipidstruktur Ia3d aus der lamellaren Phase wurde mit Hilfe der Drucksprungtechnik untersucht (s. Kap. 3.4). Dazu wurde ein Drucksprung von 1500 auf 1 bar bei 35 und 50 °C angewendet, um den Phasenübergang von der  $L_\alpha$  in die Ia3d Phase zu induzieren (vgl. Abb. 41). Die effektive Zeitauflösung beträgt 12 ms, und die gesamte Belichtungszeit liegt bei 20 min. Der Drucksprung erfolgt zum Zeitpunkt  $t = 0$  mit innerhalb von 7 ms (Woenckhaus 2000). Die zeitaufgelösten Diffraktogramme sind in Abbildung 42 dargestellt. Die entsprechende

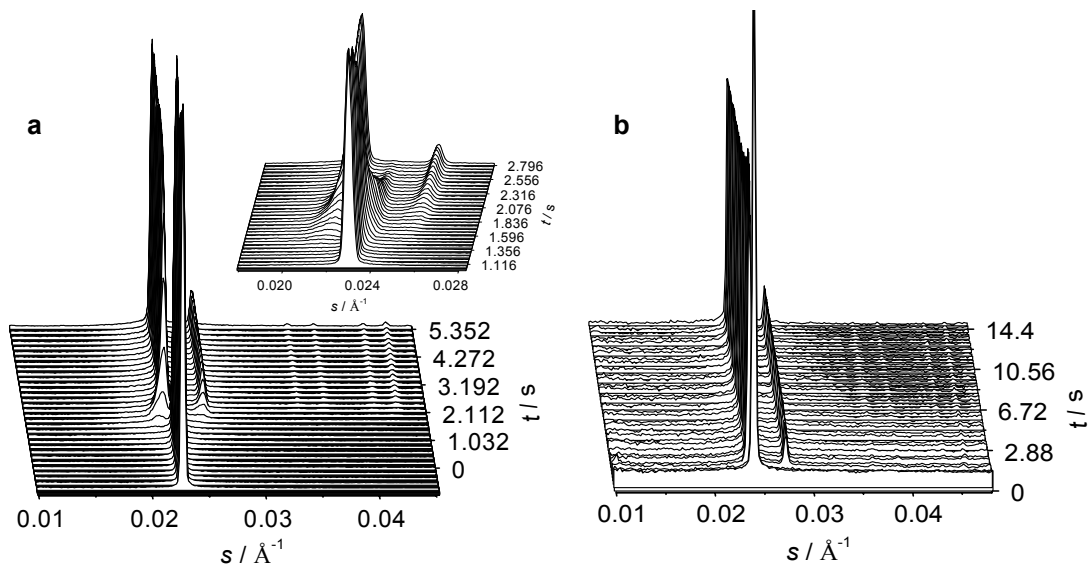
zeitabhängige Entwicklung der Gitterkonstanten und normierten Intensitäten bei 35 °C ist in Abbildung 43 wiedergegeben.

Bei 1500 bar und 35 °C liegt das System im Gleichgewicht in der lamellaren  $L_\alpha$  Phase mit der Gitterkonstante  $a = 44 \text{ \AA}$  vor. Die Lipidlänge beträgt  $17.9 \text{ \AA}$ , und die Querschnittsfläche der Kopfgruppen liegt bei  $35.9 \text{ \AA}^2$ . Die Wasserschichtdicke zwischen den Lipiddoppelschichten beträgt  $8.3 \text{ \AA}$ . Nach dem Drucksprung auf 1 bar nimmt die Intensität der  $L_\alpha$  Phase anfänglich langsam, später aber, wenn die Ia3d Phase entsteht, sehr schnell ab. Die ersten breiten Reflexe der Ia3d Struktur erscheinen 1.49 s nach dem Drucksprung, während die Reflexe der lamellaren Phase nach 2.47 s verschwinden. Im Zeitfenster der Koexistenz beider Phasen fällt die lamellare Gitterkonstante von  $43.4$  auf  $42.3 \text{ \AA}$  mit einer Rate von  $1.1 \text{ \AA/s}$  und die kubische Gitterkonstante nimmt exponentiell von  $114.2 \text{ \AA}$  auf  $109.6 \text{ \AA}$  ab. Dabei werden die Peaks der kubischen Phase zunehmend schmaler und intensiver. Der Phasenübergang ist innerhalb von  $\sim 980 \text{ ms}$  vollzogen. Nach dem Übergang beobachtet man eine weitere (allerdings sehr langsame) Abnahme der kubischen Gitterkonstante mit einer Rate von  $0.2 \text{ \AA/s}$ , die anschließend einen Gleichgewichtswert von  $109.1 \text{ \AA}$  erreicht. Das entspricht einer Lipidlänge  $l = 16.3 \text{ \AA}$ , einem mittleren Wasserkanalradius  $r_w = 10.7 \text{ \AA}$ , und einer Lipid-Querschnittsfläche  $A_0 = 28.4 \text{ \AA}^2$ . Die geringe Abnahme der kubischen Gitterkonstante nach dem Phasenübergang spiegelt die Relaxation der Lipidstruktur nach der Druckerniedrigung wieder.

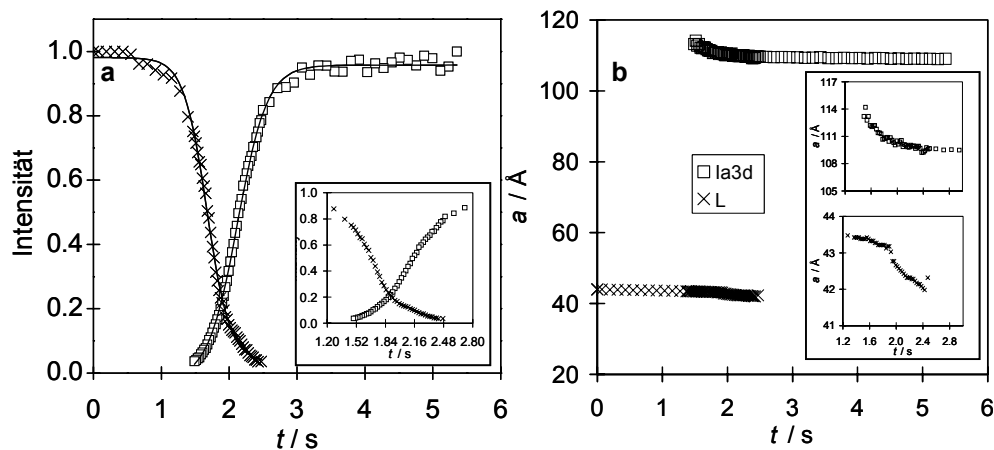
Eine Temperaturerhöhung auf 50 °C führt zu einer drastischen Beschleunigung des Phasenübergangs. Die Ia3d Phase bildet sich innerhalb von  $\sim 200 \text{ ms}$  nach dem Drucksprung (Abb. 42b).

Die  $L_\alpha \rightarrow \text{Ia3d}$  Umwandlung verläuft ohne geordnete Zwischenstufen, was zur Annahme eines Zweizustands-Modells führt. Untersuchungen am DLPC/LA (1:2) System haben gezeigt, dass auf dem Weg der  $L_\alpha \rightarrow \text{Ia3d}$  Umwandlung eine weitere metastabile kubische Phase (Pn3m) gebildet wird, die dann in die kubische Ia3d Phase umgewandelt wird (Squires 2002, Seddon 2003). Offensichtlich kann, wie hier gezeigt, die kubische Ia3d Phase auch ohne Intermediate gebildet werden, wenn der Wassergehalt gering ist und kein *bulk*-Wasser im System vorhanden ist. Die Ia3d Phase entsteht mit einer viel größeren Gitterkonstante, was darauf hindeutet, dass die kubische Phase am Anfang mehr hydratisiert ist und eine kleinere Oberflächenkrümmung aufweist. Die anfängliche Verbreiterung der Reflexe lässt darauf schließen, dass das System noch wenig Fernordnung hat und es viele relaxierende Domänen mit derselben Symmetrie (und Topologie) gibt. Diese Ergebnisse unterstützen das Modell der Membranfusion über ein kombiniertes *stalk/TMC*-Intermediat, wie es von Kozlovsky et al.

vorgeschlagen wurde (s. Kap. 2.1.3, Kozlovsky 2002, Siegel 1997). Die Fusion erfolgt dabei über eine gleichzeitige Krümmung der (ursprünglich lamellaren) Membran-Oberfläche und Spreizung der Lipidketten (Abb. 6).



**Abbildung 42:** Zeitabhängige Röntgendiffraktogramme von MO/Wasser (20 Gew.% Wasser) nach einem Drucksprung von 1500 bar auf 1 bar bei 35 °C (a) und 50 °C (b). Die nominale Zeitauflösung beträgt 0.012 s. Es sind nur ausgewählten Diffraktogramme gezeigt. Eine größere Auflösung ist in dem Ausschnitt oben gezeigt.



**Abbildung 43:** Zeitabhängigkeit der lamellaren und kubischen Gitterkonstanten (a) und Intensitäten der ersten Bragg-Reflexe (b) nach dem Drucksprung von 1500 auf 1 bar bei 35 °C.

#### 5.1.4 Lipidkonformation in MO/Wasser - FT-IR Untersuchungen

Die Struktureigenschaften von MO/Wasser Systemen, wie Konformation und Orientierungsordnung der Alkylketten sowie Hydratation und Konformationsänderungen der Kopfgruppen, wurden FT-IR-spektroskopisch untersucht. Die temperaturabhängigen Messungen wurden zwischen 10 und 80 °C und die druckabhängigen Experimente von 1 bis

~10000 bar bei 50°C durchgeführt. Die Analyse der verschiedenen spektralen Bereiche der aufgenommenen Spektren geben Aufschluss über die molekularen Eigenschaften des Lipids.

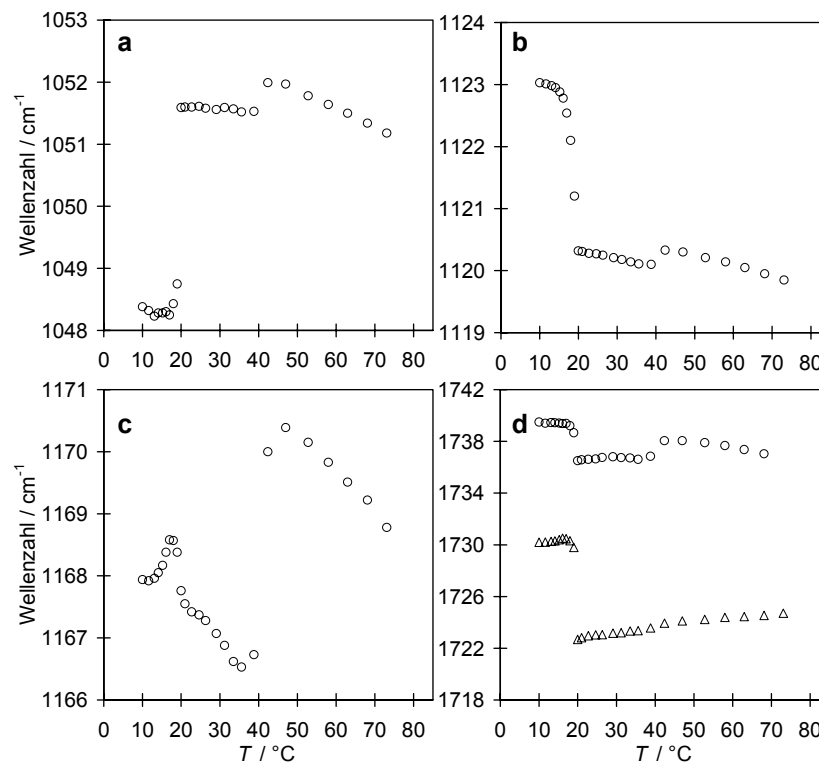
#### *Hydrophile Region*

Die hydrophile Region des Lipids setzt sich aus drei funktionellen Gruppen zusammen: zwei Hydroxyl-Gruppen (*sn2* und *sn3*) und einer Ester-Gruppe (*sn1*).

*Hydroxyl-Gruppen.* Die symmetrische Streckschwingung der terminalen Hydroxyl-Gruppe (*sn3*) liegt im Bereich von  $1050\text{ cm}^{-1}$ . Die Schwingungsfrequenz hängt von der Konformation der Kopfgruppen ab. In Abbildung 44a ist der temperaturabhängige Verlauf der Wellenzahl aufgetragen. Bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  beobachtet man eine drastische Verschiebung des Wellenzahlmaximums von  $1048$  auf  $1051.5\text{ cm}^{-1}$ ; bei  $\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$  nimmt die Schwingungsfrequenz nochmals etwas zu. Die Verschiebungen spiegeln Konformationsänderungen der *sn-3* C-OH Gruppe bei den Phasenübergängen  $L_c/Pn3m \rightarrow L_\alpha/Ia3d$  und  $L_\alpha/Ia3d \rightarrow Ia3d$  wider (vgl. Abschnitt 5.1.2). Der erste Übergang entspricht dem "schmelzen" der kristallinen  $L_c$  Phase. Die steigende Rotationsbeweglichkeit der außenstehenden Hydroxyl-Gruppe in der flüssig-kristallinen  $L_\alpha$  Phase führt zu einer Zunahme der repulsiven Wechselwirkungen und folglich einer Erhöhung der Schwingungswellenzahl um  $\sim 3\text{ cm}^{-1}$ . Da diese Gruppe aus der Kopfgruppenregion in Richtung Wasser hinausragt, gewinnt sie beim Übergang aus der geordneten  $L_c$  Phase in die ungeordnete  $L_\alpha$  Phase (und später in die  $Ia3d$  Phase) an Bewegungsfreiheit. Mit weiter ansteigender Temperatur nimmt die Schwingungsfrequenz linear ab, was auf eine Zunahme der Querschnittsfläche der Kopfgruppen zurückzuführen ist.

Beim temperaturabhängigen Verhalten der *sn2* Hydroxyl-Gruppe bei  $\sim 1120\text{ cm}^{-1}$  stellt man fest, dass die Wellenzahl dieser symmetrischen Streckschwingung von  $1123\text{ cm}^{-1}$  in der  $L_c/Pn3m$  auf  $1120\text{ cm}^{-1}$  in der  $L_\alpha/Ia3d$  Phase fällt und anschließend in der  $Ia3d$  Phase wieder leicht ansteigt (Abb. 44b). Die *sn2* Gruppe liegt in der Mitte der Kopfgruppenregion und reagiert deswegen anders auf eine strukturelle Umorganisation als die terminale *sn3* Gruppe. In der kubischen  $Ia3d$  Phase wird das freie Volumen der Hydroxyl-Gruppe durch die Krümmung der Oberfläche eingeschränkt. Dadurch steigt die Polarität der Umgebung und die Schwingungsfrequenz nimmt ab. Ein anderer, oder zusätzlicher Effekt ist die Wasserpenetration in die Kopfgruppen-Region der Lipidschicht. Während in der kristallinen  $L_c$  Phase die Penetration ehe eingeschränkt ist, ist dieser Vorgang in dem „geschmolzenen“ Lipid erleichtert. Die Hydratisierung der *sn2* C-OH Gruppe kann ebenfalls eine Abnahme der Schwingungsfrequenz zu Folge haben.

*Estergruppe.* Die antisymmetrische Streckschwingung der Ester-Gruppe liegt bei  $\sim 1170 \text{ cm}^{-1}$  und ist für Konformationsänderungen in der polar-apolar Grenzregion sensitiv. Die temperaturabhängige Verschiebung des Wellenzahlmaximums der *sn1* CO-O Bande ist in Abbildung 44c dargestellt. Bis  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  steigt die Schwingungsfrequenz leicht an, fällt dann um  $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$  und nimmt bei  $\sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$  wieder um  $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$  zu. Diese Unstetigkeiten spiegeln die Phasenübergänge  $L_\alpha/\text{Pn3m}$ - $L_\alpha/\text{Ia3d}$  und  $L_\alpha/\text{Ia3d}$ - $\text{Ia3d}$  wider. Die Verschiebung zu größeren Wellenzahlen bei der Ausbildung der  $\text{Ia3d}$ -Phase deutet auf Konformationsänderungen in der Nähe der Ester-Gruppe hin, die eine Abweichung des Dihedralwinkels in C-CO-O-C von  $180^\circ$  hervorrufen. Ein Grund kann die Ausbildung von *gauche*-Konformeren in der Nachbarschaft der Gruppe sein. In dem  $L_\alpha/\text{Ia3d}$  Koexistenzbereich würde man ebenfalls eine Zunahme der Schwingungsfrequenz erwarten. Die Frequenz nimmt jedoch ab, was durch eine mögliche Stabilisierung der  $180^\circ$ -Konformation in der  $L_\alpha$  Phase erklärt werden kann.

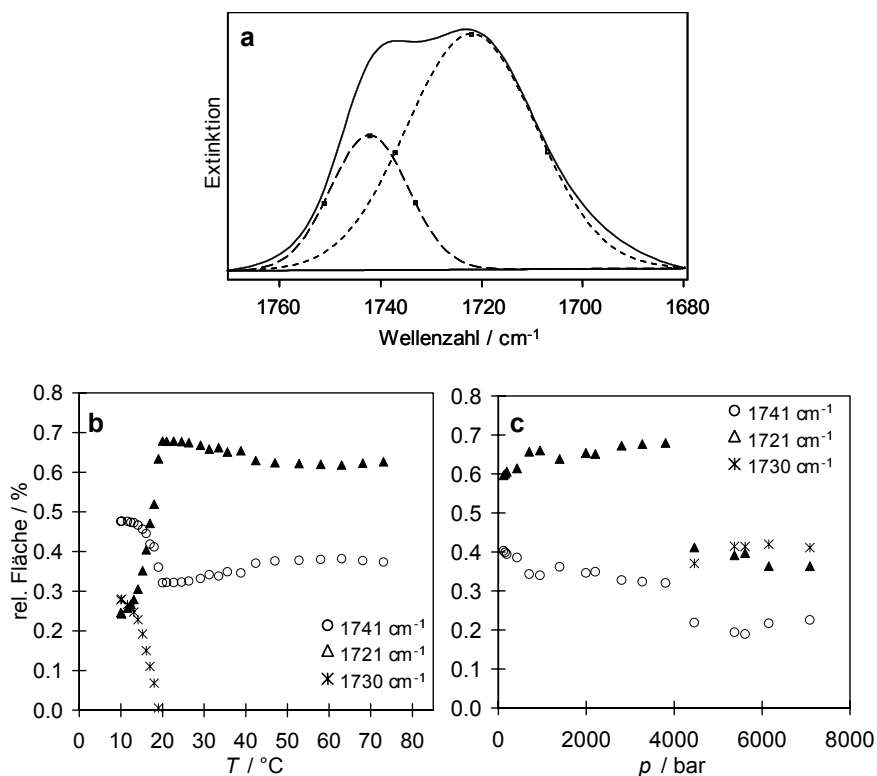


**Abbildung 44:** Temperaturabhängige Verschiebung der Wellenzahl der Schwingungen in der Kopfgruppenregion von MO/Wasser: (a)  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$ , (b)  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ , (c)  $\nu_{as}(\text{CO-O})$ , (d)  $\nu(\text{C=O})$ .

Die temperaturabhängige Verschiebung der C=O Bande ist in Abbildung 44d dargestellt. Die Rot-Verschiebung der beiden Banden bei  $\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$  deutet darauf hin, dass die Kopfgruppen stärker hydratisiert werden. Die Analyse der Carbonyl-Bande wird herangezogen, um die Hydratisierung der Carbonyl-Gruppen zu untersuchen. Die Streck-Schwingung der C=O

Gruppe, die nicht wasserstoffgebunden ist, liegt bei  $\sim 1740$  (s. g. freie C=O Gruppe) und die der wasserstoffgebunden Gruppe liegt  $\sim 1721$   $\text{cm}^{-1}$  (hydratisierte C=O Gruppe). Im kristallinen Bereich tritt zusätzlich eine Feld-Aufspaltung auf, die auf intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den C=O Gruppen zurückzuführen ist. Die freie C=O Bande wird in zwei Banden (bei  $\sim 1730$  und  $\sim 1739$   $\text{cm}^{-1}$ ) aufgespalten.

Die C=O Bande wird mit zwei (oberhalb von  $20$  °C) bzw. drei (unterhalb von  $20$  °C) Gauß-Lorenz-Funktionen im Bereich von  $1770$  bis  $1680$   $\text{cm}^{-1}$  angepasst (Abb. 45a). Der Flächenanteil der hydratisierten Carbonyl-Gruppen nimmt in der kristallinen Phase ( $10 - 20$  °C) kontinuierlich von  $25$  auf  $68$  % zu, in der  $L_\alpha$ /Ia3d Phase ( $20 - 40$  °C) liegt die relative Hydratisierung bei  $68$  %. Das Verschwinden der  $L_\alpha$  Phase führt zu einem Rückgang der Hydratisierung um ca.  $5$  % (Abb. 45b). Im flüssigkristallinen Zustand wird die Wasser-Penetration durch die gestiegene Querschnittsfläche der Kopfgruppen erleichtert. Fast zwei drittel der C=O Gruppen sind nun durch Wasserstoffbrücken gebunden. In der Ia3d Phase führt die in Richtung Wasser gerichtete Krümmung der Lipid-Oberfläche zur Verkleinerung der Querschnittsfläche der hydrophilen Region um  $\sim 20$  % und in Folge dessen verringert sich die Hydratisierung der Kopfgruppen etwas.



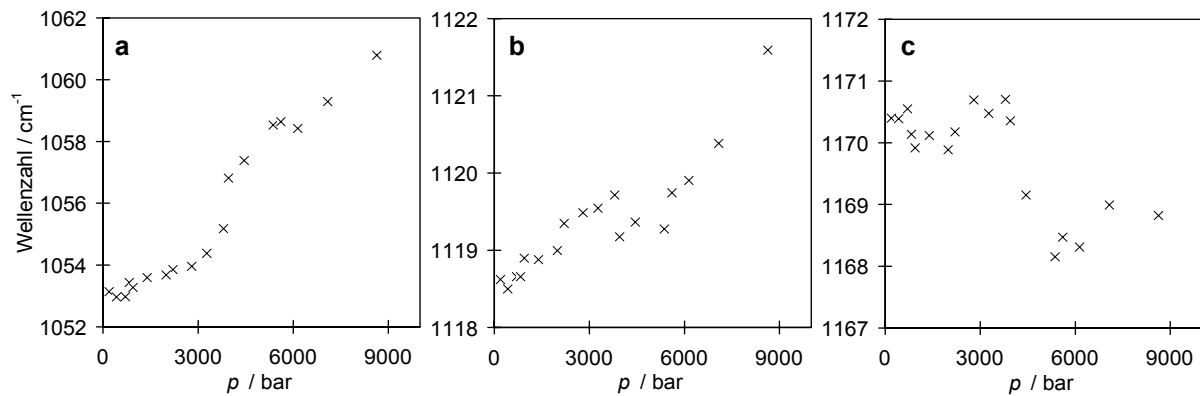
**Abbildung 45:** Analyse der Carbonyl-Bande von MO. (a) Anpassung der C=O Bande mit zwei Gauß-Lorentz Funktionen (MO/20 % Wasser,  $35$  °C). Flächenanteile hydratisierter ( $1721$   $\text{cm}^{-1}$ ) und freier ( $1741$ ,  $1730$   $\text{cm}^{-1}$ ) C=O Gruppen als Funktion der Temperatur (b) und des Druckes (c).

Die Druckabhängigkeit der C-OH Streckschwingung ist in Abbildung 46a (*sn3*) und 46b (*sn2*) dargestellt. Die Absorptionsbande der terminalen C-OH Gruppe liegt bei 50 °C und 1 bar bei  $\sim 1053 \text{ cm}^{-1}$ . Der Phasenübergang  $\text{Ia3d} \rightarrow \text{L}_\alpha$  bei  $\sim 800$  bar hat keinen signifikanten Einfluss auf die Schwingungsfrequenz der C-OH Gruppe. Die Strukturänderungen innerhalb der flüssigkristallinen Phasen sind relativ gering und werden hier durch die druckinduzierte (elastische) lineare Blau-Verschiebung der Wellenzahl überdeckt. Mit zunehmendem Druck steigen die repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Lipidmolekülen kontinuierlich an, daher verhält sich die Blauverschiebung linear. Oberhalb von 4 kbar nimmt die Wellenzahl um  $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$  zu, was auf die Bildung einer geordneten Phase (wahrscheinlich  $\text{L}_c$  Phase) hindeutet.

Bei der mittleren C-OH Gruppe beobachtet man ebenfalls eine Unstetigkeit im Kurvenverlauf bei  $\sim 4$  kbar, die wahrscheinlich durch den Phasenübergang  $\text{L}_\alpha \rightarrow \text{L}_c$  verursacht wird und einen druckinduzierten Anstieg der Schwingungsfrequenz infolge zunehmender repulsiven Wechselwirkungen hat.

Die druckabhängige Wellenzahl-Verschiebung der CO-O-Bande von MO ist in Abbildung 46c dargestellt. Im Druckbereich von 1 bis 800 bar ( $\text{Ia3d}$  Phase) liegt die Wellenzahl bei  $1170.5 \text{ cm}^{-1}$ . Bei  $\sim 800$  bar nimmt die Schwingungsfrequenz um  $\sim 0.5 \text{ cm}^{-1}$  ab, und bei 4 kbar um  $\sim 3 \text{ cm}^{-1}$  (Phasenübergang  $\text{L}_\alpha \rightarrow \text{L}_c$ ). Die Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen bei der Ausbildung der kristallinen  $\text{L}_c$  Phase wird durch die Abnahme der *gauche*-Konformere in der Nähe der Ester-Gruppe verursacht.

Die ermittelten Anteile hydratisierter und freier C=O Gruppen der Carbonyl-Absorptionsbande von Monoolein sind in Abbildung 45c als Funktion des Druckes aufgetragen. Oberhalb von  $\sim 4$  kbar tritt die Feld-Aufspaltung auf (ein weiterer Hinweis darauf, dass eine kristalline Phase gebildet wird) bei der die freie C=O Bande in zwei Komponenten aufgespalten wird, wie bereits bei der kälteinduzierten  $\text{L}_c$  Phase beobachtet. In der druckinduzierten kristallinen Phase ( $\text{L}_c$ ) nimmt die Hydratisierung drastisch ab und erreicht 36 %. Zum Vergleich weist die Kopfgruppenregion von MO in der kälteinduzierten  $\text{L}_c$  Phase (unterhalb von 20 °C) eine wesentlich geringere Hydratisierung auf ( $\sim 20$  %).



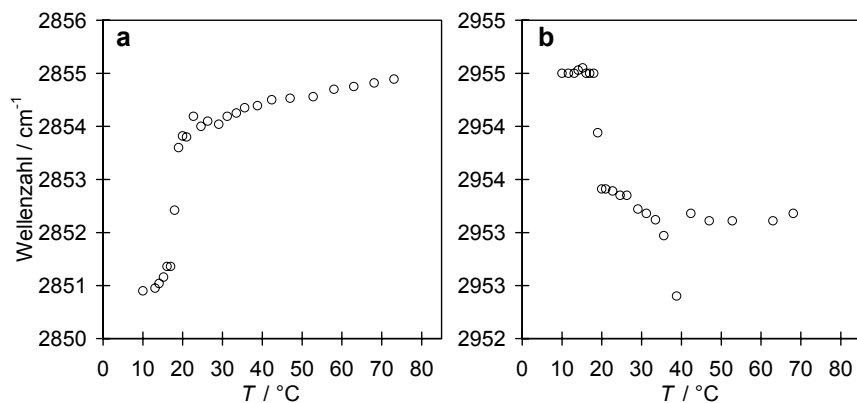
**Abbildung 46:** Druckabhängige Verschiebung der Wellenzahl der Schwingungen in der Kopfgruppenregion von MO/Wasser: a)  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$ , b)  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ , c)  $\nu_{as}(\text{CO-O})$ .

### Hydrophobe Region

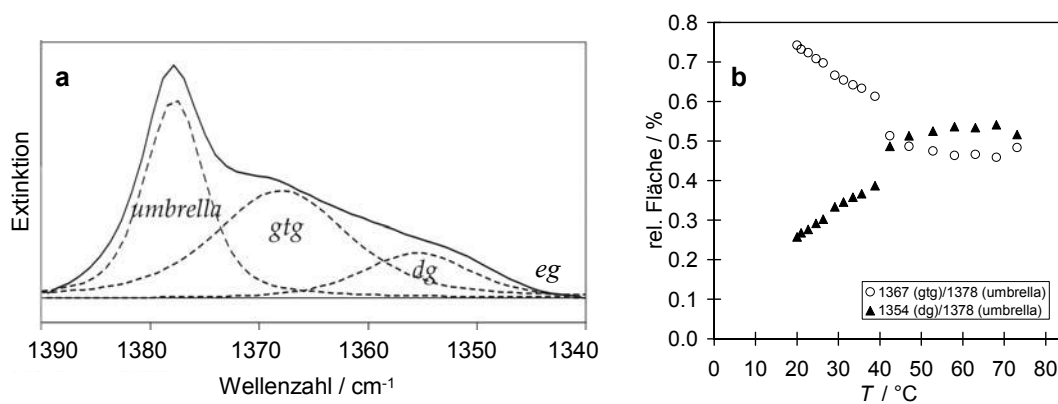
**Methylengruppe.** Diese Region von Monoolein besteht aus einer einfach ungesättigten Kohlenwasserstoffkette. Die Streck- und Deformationsschwingungen der  $\text{CH}_2$ -Segmente sind stark von der Konformation der Ketten abhängig. Die symmetrische Methylen-Streckschwingung,  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , liegt bei  $\sim 2852 \text{ cm}^{-1}$  und spiegelt die Ordnung und Packung der Lipidketten wider. In Abbildung 47a ist die temperaturabhängige Verschiebung der Bande aufgetragen. Unterhalb von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  liegt die Wellenzahl bei  $\sim 2851 \text{ cm}^{-1}$ . Sie steigt bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $\sim 2854 \text{ cm}^{-1}$  und verschiebt sich dann linear mit steigender Temperatur zu größeren Wellenzahlen. Die Blau-Verschiebung wird durch die steigenden repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Ketten beim Übergang von der geordneten  $L_c$  Phase in die ungeordnete  $L_\alpha/\text{Ia}3d$  Phase hervorgerufen. Die Anzahl der *gauche*-Konformere steigt beim Übergang von der kristallinen in die flüssigkristalline Phase und die Abstoßung der Ketten wird zunehmend stärker. Der zweite Phasenübergang  $L_\alpha/\text{Ia}3d \rightarrow \text{Ia}3d$  beeinflusst die Schwingungsfrequenz nicht, da die Ketten in diesen Phasen bereits „geschmolzen“ sind.

Eine quantitative Betrachtung der Ketten-Konformation wird durch Analyse der Methylen-Kippschwingung,  $\omega(\text{CH}_2)$ , ermöglicht. In der geordneten Phase (*all-trans* Ketten) ist die Schwingung in mehrere Moden im Bereich von  $1380$  bis  $1100 \text{ cm}^{-1}$  aufgespalten (Feld-Aufspaltung). Diese Aufspaltung ist in den ungeordneten Phasen aufgehoben, und es können Moden bei  $1367$ ,  $1354$  und  $1341 \text{ cm}^{-1}$  detektiert werden, die den *kink (gtg)*, *double-gauche (dg)* und *end-gauche* Konformeren zugeordnet werden. Diese Banden werden mit vier gemischten Gauß-Lorenz Funktionen simuliert und die Flächenanteile werden ermittelt (Abb. 48a). Zur Normierung wird die Intensität der konformationsunabhängigen *umbrella*  $\delta(\text{CH}_3)$ -Schwingung bei  $1378 \text{ cm}^{-1}$  verwendet. In Abbildung 48b sind die normierten Flächen-Anteile

aufgetragen. Die Intensität der *end-gauche* Schwingung beträgt dabei null. In der ungeordneten Phase (oberhalb von 20 °C) liegt der relative Anteil der *gtg* Konformere bei ~75 %. Diese Konformation um die *cis*-Doppelbindung von Monoolein ermöglicht eine lineare Anordnung der Ketten und erhöht gleichzeitig den Packungs-Parameter. Mit steigender Temperatur nimmt der Anteil der *gtg* Konformere ab, während der Anteil der *dg* Konformere von 25 % bei 20 °C auf 52 % bei 50 °C steigt.



**Abbildung 47:** Temperaturabhängige Verschiebung der Wellenzahl der Schwingungen in der Kettenregion von MO/Wasser: (a)  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , (b)  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ .

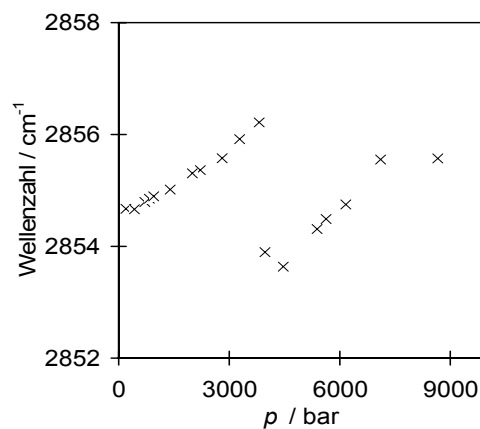


**Abbildung 48:** Analyse der  $\omega(\text{CH}_2)$  Absorptionsbande von MO. (a) Die Bande wird mit vier Gauß-Lorentz Funktionen angepasst: 1378  $\text{cm}^{-1}$  (*umbrella*), 1367  $\text{cm}^{-1}$  (*kink*, *gtg*), 1354  $\text{cm}^{-1}$  (*double gauche*, *dg*), 1341  $\text{cm}^{-1}$  (*end-gauche*, *eg*). Die Intensität der *end-gauche* Schwingung beträgt hier null. (b) Anteile (integrale Intensitäten) der *gtg* und *dg* Konformere in Abhängigkeit der Temperatur.

*Methylgruppe.* Die Orientierungsordnung der Ketten in Lipid-Doppelschichten beeinflusst das Kraftfeld der  $\text{CH}_3$ -Gruppe am Ende der Alkyl-Kette und somit die Schwingungsfrequenz der C-H Bindung. In Abbildung 47b ist der temperaturabhängige Verlauf der Wellenzahl der  $\nu_{as}(\text{CH}_3)$  Schwingung aufgetragen. Unterhalb von 20  $^{\circ}\text{C}$  liegt das Bandenmaximum bei ~2955  $\text{cm}^{-1}$ . Am Phasenübergang  $L_{\alpha}/\text{Pn}3m \rightarrow L_{\alpha}/\text{Ia}3d$  beobachtet man eine Rot-Verschiebung um ~1

$\text{cm}^{-1}$ . Bei  $40\text{ }^\circ\text{C}$  zeigt der Kurvenverlauf eine Unstetigkeit ( $\sim 0.5\text{ cm}^{-1}$ ). In der  $L_c$  Phase sind die Lipidketten verhältnismäßig geordnet und gestreckt, wodurch die  $\text{CH}_3$ -Gruppen, die in der Mitte der Lipiddoppelschicht liegen, repulsiven Wechselwirkungen ausgesetzt sind. In der flüssig-kristallinen Phase ist die Doppelschichtdicke aufgrund der Zunahme der  $dg$  Konformere kleiner und die Ketten sind nicht mehr dicht gepackt. Dadurch haben die terminalen Methylgruppen ein größeres freies Volumen und sind nicht mehr parallel zueinander orientiert. Folglich nehmen hier die repulsiven Wechselwirkungen ab und die Schwingungsfrequenz sinkt. Das Verschwinden der  $L_\alpha$  Phase bei  $40\text{ }^\circ\text{C}$  wird durch Umorganisationsprozesse im Lipid-System begleitet und spiegelt sich in der Unstetigkeit des Wellenzahl-Verlaufs wider.

Die Druckabhängigkeit der Wellenzahl der  $\nu_s(\text{CH}_2)$  Schwingung von MO bei  $50\text{ }^\circ\text{C}$  ist in Abbildung 49 gezeigt. Unterhalb von  $700\text{ bar}$  liegt die Wellenzahl bei  $2854.5\text{ cm}^{-1}$  und nimmt mit steigendem Druck linear zu bis bei  $\sim 4\text{ kbar}$  eine sprunghafte Änderung im Kurvenverlauf auftritt. Die Wellenzahl nimmt dabei um  $3\text{ cm}^{-1}$  ab und steigt dann wieder linear an. Dieses Verhalten deutet auf die Abnahme der  $dg$  Konformere in der Alkylkette hin, was typisch für eine geordnete kristalline Phase ist.



**Abbildung 49:** Druckabhängige Wellenzahl-Verschiebung der  $\nu_s(\text{CH}_2)$  Schwingung von MO (20 Gew.% Wasser, pH 7).

## 6 Protein-Einbau in kubische Phasen

### 6.1 Einbau von Insulin

Die Protein-Stabilität und Aggregation in eingeschränkten Geometrien ist ein noch wenig erforschtes Gebiet. Die meisten Untersuchungen finden in wässrigen Lösungen statt. Allerdings sind Proteine unter physiologischen Bedingungen von einer Vielzahl von Membran-Oberflächen umgeben. Komplexen Wechselwirkungen können dazu führen, dass die Struktur und das Verhalten eines Proteins in Lösung und in der Zelle verschieden sind. Hier wird das Modellprotein Insulin, dessen Aggregationsverhalten in Lösung in Kap. 4.3 untersucht wurde, in die engen Wasserkanäle von kubischen MO/Wasser-Phasen eingebaut.

Kubische Phasen werden häufig als Transportmittel für Wirkstoffe verwendet, die im kubischen Gel gelöst sind und von dort kontrolliert durch Diffusion abgegeben werden (s. Abschn. 5.1.1). Auch Insulin kann in die kubischen Phasen ohne Verlust der biologischen Aktivität eingebaut werden (Shaha 1999, Sadhale 2001). Andererseits kann die Aggregation und somit die Deaktivierung von Insulin durch eine hydrophobe Umgebung oder Lipid-Wasser Oberfläche katalysiert werden (s. Ref. in Abschn. 5.1.1).

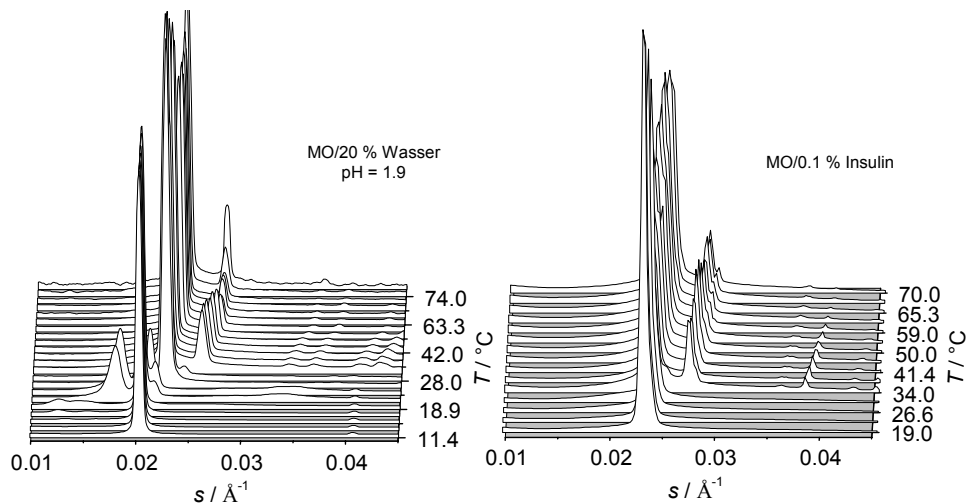
Der Einfluss von Insulin auf die Lipid-Matrix und *vice versa* wurde mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie und Röntgen-Kleinwinkelstreuung untersucht. Die Struktur und das Phasenverhalten der Lipid-Matrix als auch die Sekundärstruktur des Insulins wurden an MO/Insulin Systemen bei pD 1.9 und einer Insulin Konzentration von 0 bis 4 Gew.% temperatur- und zeitabhängig untersucht. Die Hydratisierung beträgt dabei 20 Gew.% (~82 mol% Wasser). Das Verhalten von reinem Insulin in Wasser bei pD 1.9 wurde in Kap. 5.1.2 beschrieben und wird im Folgenden als Referenz benutzt.

#### 6.1.1 Phasenverhalten von MO/Insulin Systemen - SAXS Untersuchungen

Die temperaturabhängigen SAXS Messungen wurden im Bereich von 10 bis 70 °C mit einer Heizrate von 20°C/h durchgeführt. Die zeitabhängigen Experimente fanden bei 70 °C statt, wobei die typische Aufheizzeit 30 min betrug. Zusätzlich wird das Phasenverhalten des reinen MO/Wasser Systems bei pH = 1.9 untersucht und mit dem bei pH = 7 verglichen. Soweit nicht anders angegeben, beträgt die Abweichung der kubischen Gitterkonstante  $\pm 1 \text{ \AA}$  und der lamellaren  $\pm 0.5 \text{ \AA}$ .

In Abbildung 50 (links) sind die Röntgendiffraktogramme von MO/Wasser bei pH 1.9 als Funktion der Temperatur dargestellt. Zwei Phasenübergänge können detektiert werden. Der

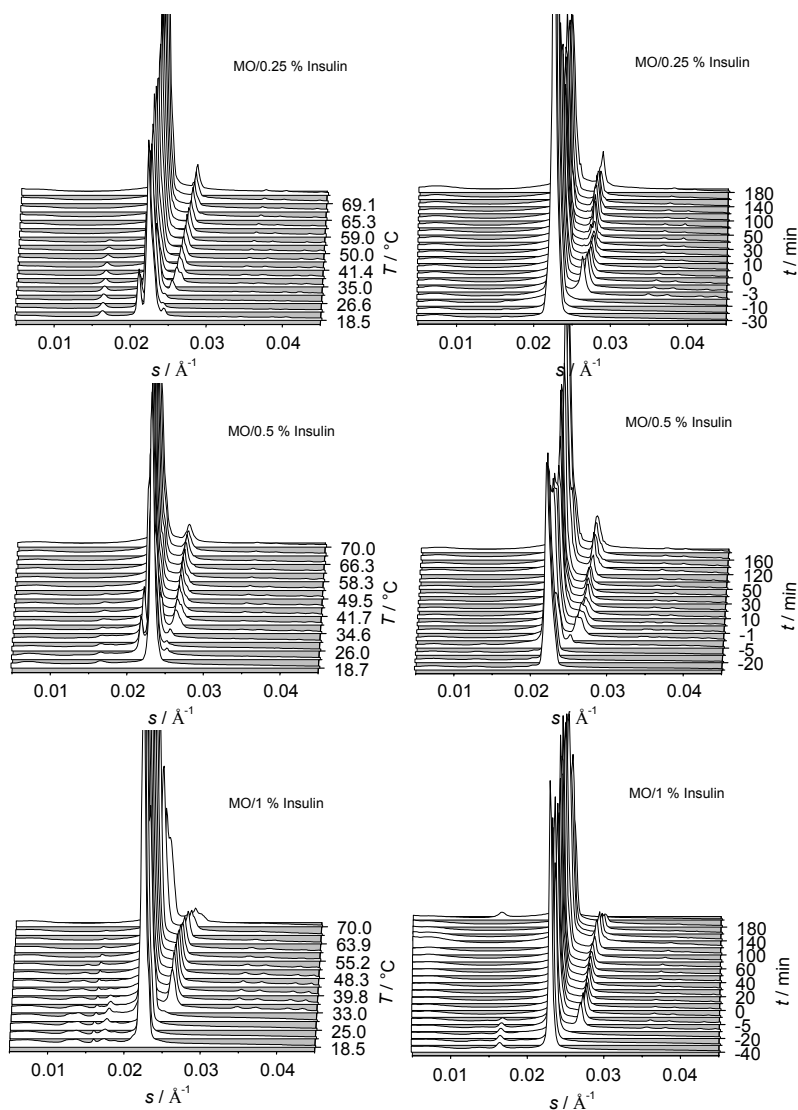
erste Phasenübergang tritt zwischen der lamellaren  $L_c$  Phase mit der Gitterkonstante  $a = 49.3$  Å und der lamellaren  $L_\alpha$  Phase ( $a = 43.7$  Å bei  $25$  °C) bei  $\sim 22$  °C auf, der zweite zwischen der kubischen Pn3m und kubischen Ia3d Phase bei  $\sim 20$  °C. Die  $L_\alpha$  Phase verschwindet oberhalb von  $\sim 30$  °C und die reine Ia3d Phase bleibt stabil bis  $\sim 80$  °C ( $a = 108.5$  Å bei  $36$  °C,  $da/dT = -0.2$  Å/°C). Das Phasenverhalten und die Gitterkonstanten von MO/Wasser bei pH 1.9 sind in guter Übereinstimmung mit denen von MO/Wasser bei pH 7.0 (s. Abschnitt 5.1.2). Wie erwartet, wird das Phasenverhalten von MO durch das saure Milieu nicht beeinflusst.



**Abbildung 50:** Röntgendiffraktogramme von MO/Wasser und MO/0.1 % Insulin bei pH 1.9 als Funktion der Temperatur.

**Tabelle 18:** Charakterisierung der untersuchten Systeme: Molare Konzentration des monomeren Insulins (für das Dimer durch zwei dividieren), Gitterkonstante der Ia3d Phase ( $\pm 1$  Å), Wasserkanal-Radius ( $\pm 0.5$  Å) und die abgeschätzte Anzahl der Insulin-Monomere pro Ia3d Einheitszelle bei  $36$  °C (unter der Annahme einer statistischen Verteilung innerhalb der Ia3d Phase).

MO/Insulin (20 Gew.% Wasser)	c(Monomer) / mM	$a_{Ia3d}$ / Å	$r_w$ / Å	Monomer/Einheitszelle
0 % Ins.	0	108.5	10.3	0.00
0.1 % Ins.	0.17	105.9	9.6	0.02
0.25 % Ins.	0.44	109.3	10.5	0.06
0.5 % Ins.	0.87	108.3	10.1	0.11
1 % Ins.	1.74	107.7	10.2	0.22
2 % Ins.	3.49	107.5	9.9	0.42
4 % Ins.	6.98	104.0	9.2	0.71

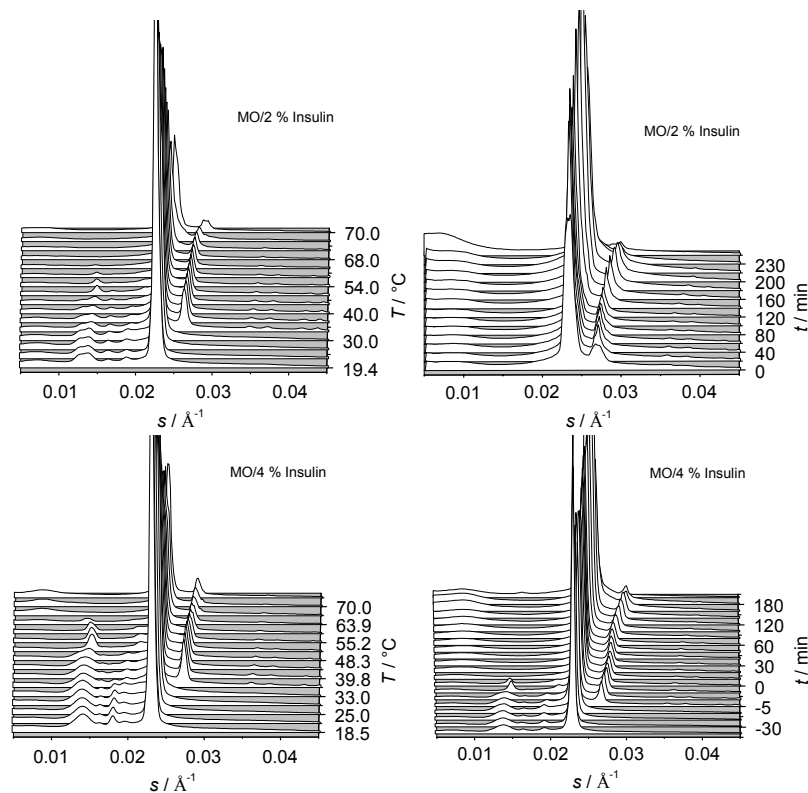


**Abbildung 51:** Röntgendiffraktogramme von MO/Insulin Systemen mit 0.25, 0.5 und 1 Gew.% Insulin bei  $\text{pH} = 1.9$  als Funktion der Temperatur (links) und der Zeit bei  $70 \text{ °C}$  (rechts).

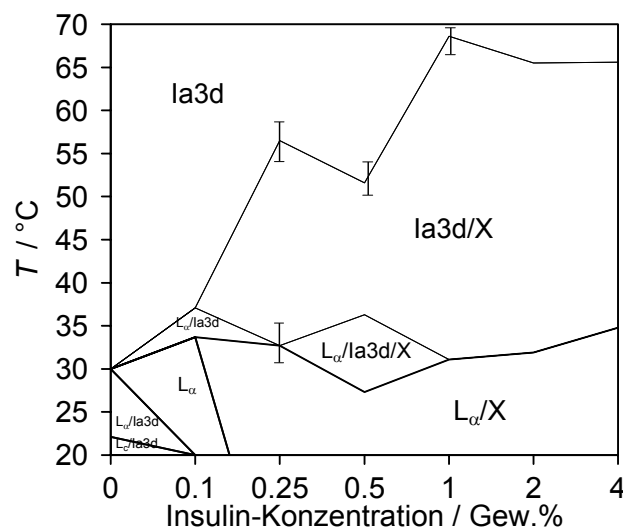
Der Einbau von bereits 0.1 Gew.% Insulin beeinflusst signifikant das Phasenverhalten von MO (Abb. 50, rechts). Unterhalb von  $33 \text{ °C}$  sind die (001) und (002) Reflexe der lamellaren Phase sichtbar, während oberhalb von  $33 \text{ °C}$  die (211), (220), (321), (400), (420) und (332) Reflexe der kubischen  $\text{Ia}3\text{d}$  Phase erscheinen. Die Gitterkonstante der lamellaren (wahrscheinlich  $L_\alpha$ ) Phase beträgt  $42.5 \text{ \AA}$  bei  $25 \text{ °C}$ , und die der kubischen Phase liegt bei  $105.9 \text{ \AA}$  (bei  $36 \text{ °C}$ ). Mit steigender Temperatur nimmt die Gitterkonstante etwas ab ( $a = 101.4 \text{ \AA}$  bei  $70 \text{ °C}$ ,  $da/dT = -0.1 \text{ \AA/°C}$ ). Ähnliche Phasenreihenfolgen und Gitterkonstanten beobachtet man auch bei den Systemen mit höheren Protein-Konzentrationen (0.25, 0.5, 1, 2, 4 Gew.% Insulin) (Abb. 51, 52, links). Die Systeme weisen anfangs eine lamellare Phase mit dem Reflex bei  $s \approx 0.022 \text{ \AA}^{-1}$  auf, die bei höheren Temperaturen in die kubische  $\text{Ia}3\text{d}$  Phase

umgewandelt wird. Die Gitterkonstante der Ia3d Phase wird dabei kaum beeinflusst. Die mittlere Gitterkonstante  $a$  aller proteinhaltigen Systeme liegt bei  $107.1 \pm 1.4 \text{ \AA}$  bei  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  (zum Vergleich: In reinem MO/Wasser System ist  $a_{\text{Ia3d}} = 108.5 \pm 1 \text{ \AA}$ ). Offensichtlich wird die flüssigkristalline  $L_\alpha$  Phase durch den Einbau von Insulin stabilisiert und liegt statt der  $L_c$  und Pn3m Phase vor (vgl. reines System in Abb. 50). Sie ist bis  $31\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$  stabil und wird erst dann in die kubische Phase umgewandelt. Im reinen MO/Wasser System bildet sich die Ia3d Phase bereits bei  $\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$  und koexistiert mit der  $L_\alpha$  Phase bis  $\sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die kubische Ia3d Phase kann durch Dehydratisierung in die lamellare  $L_\alpha$  Phase umgewandelt werden (s. Phasendiagramm von MO, Abb. 40). Möglicherweise führt der Einbau von Insulin zu einer Dehydratisierung der Probe und stabilisiert dadurch die lamellare Struktur. Andererseits entspricht der berechnete Volumenanteil von Wasser ( $\phi_w$ ) in der Ia3d Phase dem nominalen Wasser Gehalt in der Probe ( $\phi_{w,\text{total}} = 0.17$ ). Der Volumenanteil von Wasser wird aus der Lipidlänge  $l$  und der Gitterkonstante der Ia3d Phase, unter der Annahme zurückgerechnet (Gl. 18), dass die Temperaturabhängigkeit der Lipidlänge im ternären System der im binären System entspricht. Eine weitere Annahme ist, dass das Protein aus der Ia3d Phase ausgeschlossen ist.

Ein weiterer Unterschied zu dem reinen MO/Wasser System besteht in neuen diffusen Reflexen im Kleinwinkelbereich ( $51 < d < 72 \text{ \AA}$ ), die ab 0.25 Gew.% Insulin neben der  $L_\alpha$  und Ia3d Phase detektierbar sind. Die Intensität der Reflexe nimmt mit steigender Proteinkonzentration zu, bleibt aber relativ gering verglichen mit denen der  $L_\alpha$  oder Ia3d Phase ( $\sim 1:21$ ). Während man bei 0.25 % Insulin nur einen Reflex bei  $s = 0.0165 \text{ \AA}^{-1}$  detektiert, sind bei dem System mit 4 % Insulin mehr Reflexe sichtbar (bei  $s = 0.0141, 0.0164, 0.0182, 0.0198 \text{ \AA}^{-1}$ ). Die Peakpositionen stehen in keinem bekannten Verhältnis zueinander und können daher auch nicht indiziert werden. Wahrscheinlich handelt es sich um zwei kubische, wahrscheinlich Pn3m, Phasen, die keine ausgeprägte Fernordnung haben bzw. in relativ geringen Mengen im System vorliegen. Die Reflexe verschwinden oberhalb von  $\sim 57 \text{ }^\circ\text{C}$  im Fall von MO/0.25 % Insulin, und oberhalb von  $\sim 66 \text{ }^\circ\text{C}$  für die Systeme mit 1, 2 und 4 % Insulin. Bei diesen Temperaturen fängt Insulin an sich zu entfalten (s. Kap. 4.3). Das  $(T, c_{\text{inc}})$ -Phasendiagramm für alle untersuchten MO/Insulin Systeme ist in Abbildung 53 dargestellt.



**Abbildung 52:** Röntgendiffraktogramme von MO/Insulin Systemen mit 2 und 4 Gew.% Insulin bei pH 1.9 als Funktion der Temperatur (links) und der Zeit bei  $70^\circ\text{C}$  (rechts).

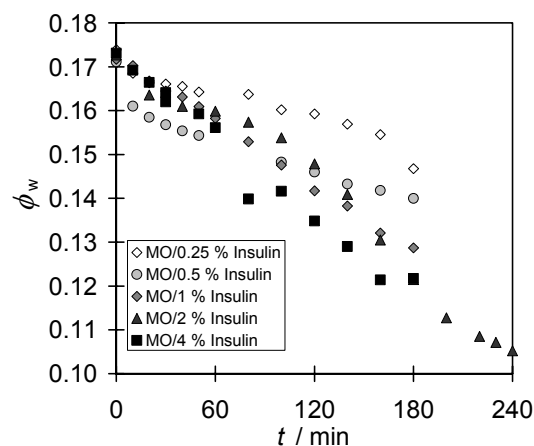


**Abbildung 53:**  $(T, c_{\text{ins}})$ -Phasendiagramm von MO/Insulin (20 Gew.% Wasser, pD 1.9).

Offensichtlich wird beim Protein-Einbau die lamellare Struktur stabilisiert, in der sich Domänen der neuen Phase befinden, die das Protein einschließen. Da oberhalb von  $\sim 66^\circ\text{C}$  nur die kubische  $Ia3d$  Phase vorliegt, muss das Protein innerhalb dieser Phase eingebettet sein. Insulin kann nicht in die hydrophobe Region von MO eingebaut werden, da es bei pD 1.9 hydrophil ist (überwiegend dimer, Ladung +6 (Nettleton 2000)). Das dimere Insulin hat

einen Gyration-Radius  $R_g$  von 14.9 Å, und das Monomer ein  $R_g$  von 11.6 Å (Nielsen 2001). Die Kristallstruktur liefert einen Monomer-Radius von  $\sim 11.4$  Å. Der mittlere Wasserkanal-Radius  $r_w$  der Ia3d Phase liegt bei  $\sim 10 \pm 0.5$  Å für alle Systeme (s. auch Tabelle 18) und ist damit mit der Größe eines Insulin-Monomers kompatibel. Es ist möglich, dass Dimere bei höheren Temperaturen dissoziieren (FT-IR Ergebnisse, Kap. 4.3) und Monomere in den Kanälen der kubischen Phase eingeschlossen werden, wahrscheinlich in den Knotenpunkten (3-fache Verbindungen zwischen den Labyrinthen) der Ia3d Phase wo die Wasserkanäle aufeinander treffen und der Wasserkanal-Radius am größten ist.

Die zeitabhängigen Röntgendiffraktogramme der MO/Insulin Systeme mit 0.25 - 4 % Insulin bei 70 °C sind in den Abbildungen 51 und 52 (rechts) dargestellt. Die kubische Ia3d Phase bleibt in allen Systemen erhalten, allerdings beobachtet man eine Abnahme der kubischen Gitterkonstante mit der Zeit. Dieser Effekt wird mit steigender Protein-Konzentration ausgeprägter, erkennbar an der Verschiebung der Bragg-Reflexe zu größeren Winkeln. Die entsprechende Änderung des Volumenanteils von Wasser in der Ia3d Phase ist in Abbildung 54 gezeigt. Offensichtlich wird die Lipid-Matrix in Laufe der Insulin-Aggregation stark dehydratisiert. Während der Volumenanteil von Wasser im System mit 0.25 % Insulin nach 3 h um  $\sim 10$  % abnimmt, reduziert sich das Wassergehalt im System mit 4 % Insulin um  $\sim 30$  %.

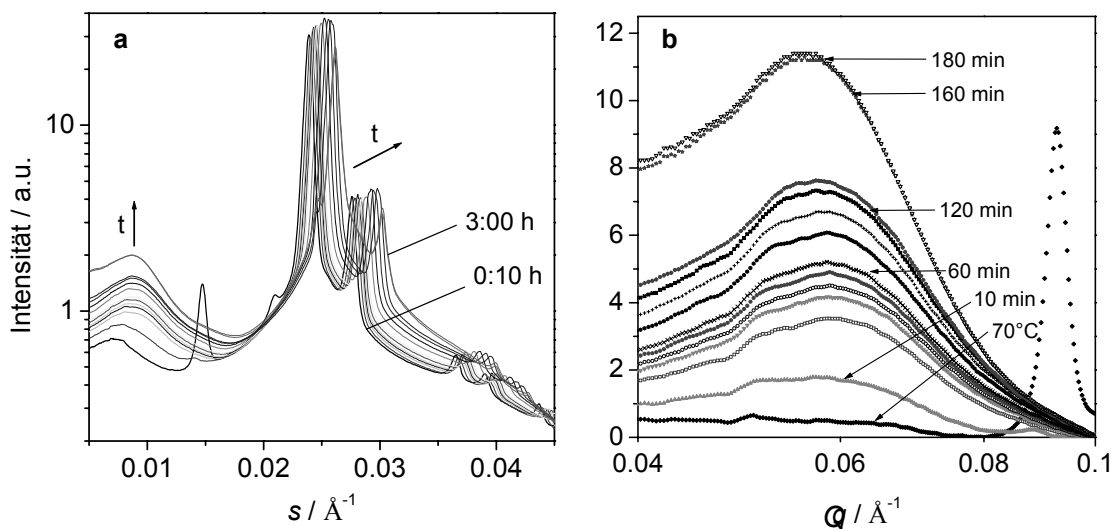


**Abbildung 54:** Volumenanteil von Wasser in der kubischen Ia3d Phase von MO/Insulin als Funktion der Insulin-Konzentration und Zeit (bei 70 °C).

In Abbildung 55a erkennt man eine stetig zunehmende diffuse Streuung im Kleinwinkelbereich unterhalb von  $s = 0.015 \text{ \AA}^{-1}$ , die von Insulin induziert wird. Um das Verhalten von Insulin in den Lipid-Kanälen zu untersuchen, werden die Hintergrundkorrigierten Streukurven von Insulin als Funktion der Zeit aufgetragen (MO/4 % Insulin, Abbildung 55b). Nach 10 min bei 70 °C ist die erste breite Streuung bei  $Q = 2\pi \cdot s = 0.058 \text{ \AA}^{-1}$

sichtbar. Die Streukurven können nicht nach dem Guinier Modell ausgewertet werden, da die Protein-Teilchen polydispers sind und die Guinier Methode bei dichten Systemen wegen den intermolekularen Wechselwirkungen nicht anwendbar ist. Mit der Zeit verschiebt sich das Streumaximum ein wenig zu kleineren Winkeln, während die Intensität der Streuung stark zunimmt. Möglicherweise wird die Streuung von kleinen Insulin-Aggregaten induziert, die auf relativ kurzen Abständen miteinander wechselwirken. Der mittlere Abstand zwischen den Partikeln ( $D$ ) kann nach der Näherung  $D \approx 7.7/Q$  berechnet werden. Man erhält so einen Abstand  $D = 132 \text{ \AA}$  nach 20 min,  $134 \text{ \AA}$  nach 100 min und  $138 \text{ \AA}$  nach 180 min bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nach dem Abkühlen der Probe ändert sich die Struktur nicht.

Offensichtlich entfalten die Insulin-Moleküle oberhalb von  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  (FT-IR Ergebnisse) und fangen an, nach 10 min bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  zu aggregieren. Die Zahl der an der Aggregation beteiligten Moleküle nimmt mit der Zeit zu (intensivere Streuung), während die Größe der Aggregate kaum ansteigt ( $\sim 5 \%$  nach 3 h). Dagegen bildet Insulin in der Lösung sehr große Agglomerate, deren Größe in Laufe der Zeit stark zunimmt (Nicolini 2004, unpublizierte Ergebnisse; Jansen 2005).

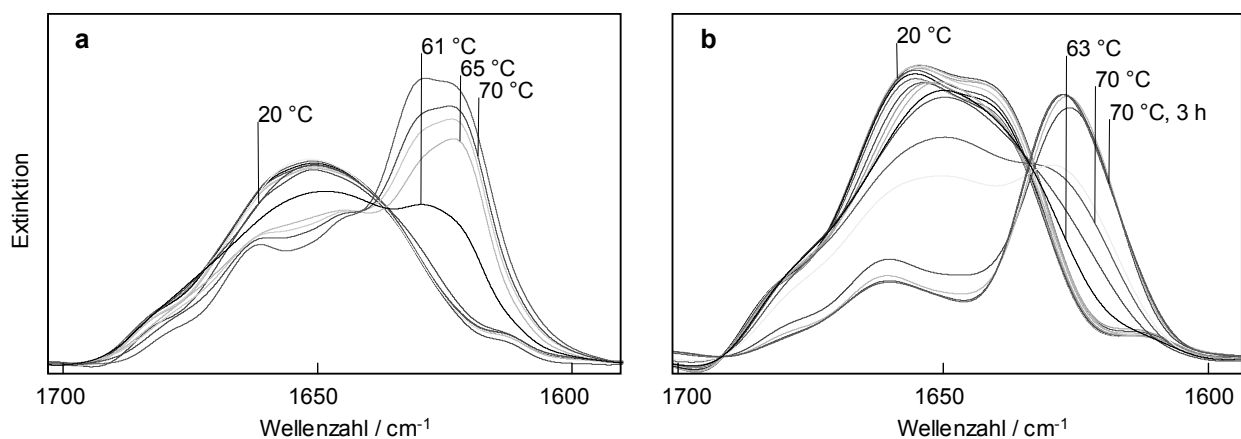


**Abbildung 55:** (a) Zeitabhängige Röntgendiffraktogramme von MO/4 % Insulin bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $\text{pD } 1.9$  (logarithmische Auftragung). (b) Streukurven von Insulin als Funktion der Zeit (MO/Wasser-Referenz wurde abgezogen).

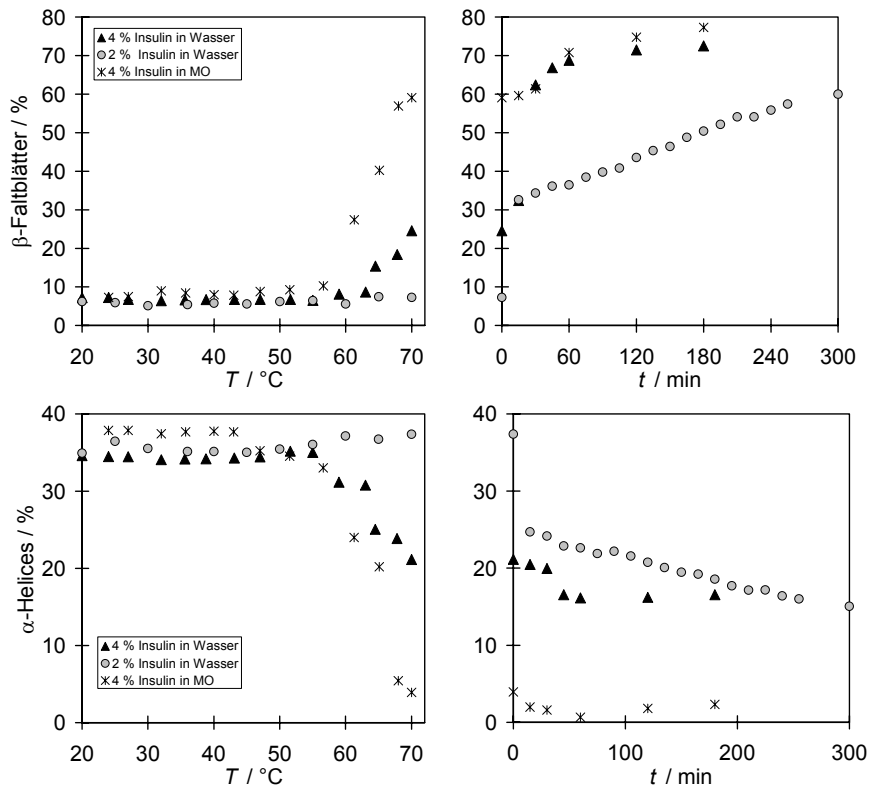
### 6.1.2 Sekundärstruktur von Insulin in MO/Wasser

Die Entfaltung und Aggregation von Insulin in MO/Wasser wird im Temperaturintervall von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  bis  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  und anschließend 3 h bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  untersucht. Die Änderungen der Amid I'-Bande werden nur für das MO/4 % Insulin System analysiert. Wegen der Überlappung der Amid I'-Bande mit der C=O Bande von MO ist die Analyse für die Systeme mit niedrigen Protein-Konzentrationen nicht möglich. Um die Sekundärstrukturanteile zu bestimmen,

werden die Spektren mit einer MO/D<sub>2</sub>O Referenz korrigiert und im Bereich von 1705 bis 1580 cm<sup>-1</sup> mit einer Halbwertsbreite von 15 cm<sup>-1</sup>, einem Verstärkungsfaktor von 1.2 entfaltet und mit sechs (natives Insulin) bzw. sieben (aggregiertes Insulin) Gauß-Lorentz-Funktionen angepasst, wie im Kapitel 4.3.2 für das Insulin in Lösung beschrieben wurde (vgl. Abb. 36 und Tabelle 17). Die FSD-Spektren von 4 % Insulin in MO/Wasser und in Lösung sind in Abbildung 56 dargestellt. Die ermittelten Sekundärstrukturanteile von Insulin in MO/Wasser sind ähnlich den Anteilen von Insulin in Lösung. Das Insulin in MO/Wasser besteht demnach aus 16.8 % Schleifen, 37.8 %  $\alpha$ -Helices, 38.1 % ungeordneten Strukturen und 7.3 % antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mit  $\pm 2$  % Abweichung. Abbildung 57 zeigt die temperatur- und zeitabhängige Veränderung der intermolekularen  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -helikalen Strukturen von Insulin in MO und in Lösung. Die Aggregation von 4 % Insulin in MO beginnt bei  $59 \pm 2$  °C, unmittelbar nach dem H/D-Austausch. Bei 70 °C liegt der Anteil der parallelen  $\beta$ -Faltblätter bei  $\sim 59$  %, und nach 60 min bei  $\sim 71$  %. Die Aggregation von 4 % Insulin in Lösung beginnt bei  $64 \pm 2$  °C und ist nach  $\sim 100$  min bei 70 °C beendet. Der Anteil der parallelen  $\beta$ -Faltblätter beträgt dann  $\sim 72$  %. Während der Aggregation verliert das Protein in MO etwas mehr  $\alpha$ -Helices ( $\sim 2$  % im aggregierten Zustand) als Insulin in Lösung ( $\sim 16$  % im aggregierten Zustand). Die Insulin-Aggregation erfolgt, unabhängig von dem Medium, über die Bildung von parallelen  $\beta$ -Faltblättern auf Kosten von  $\alpha$ -helikalen und ungeordneten Strukturen. Allerdings wird dieser Prozess durch den Einbau in MO etwas beschleunigt.



**Abbildung 56:** Amid I'-Bande von 4 Gew.% Insulin in MO (a) und in Lösung (b) als Funktion der Temperatur bei pD 1.9 (FSD-Spektren).



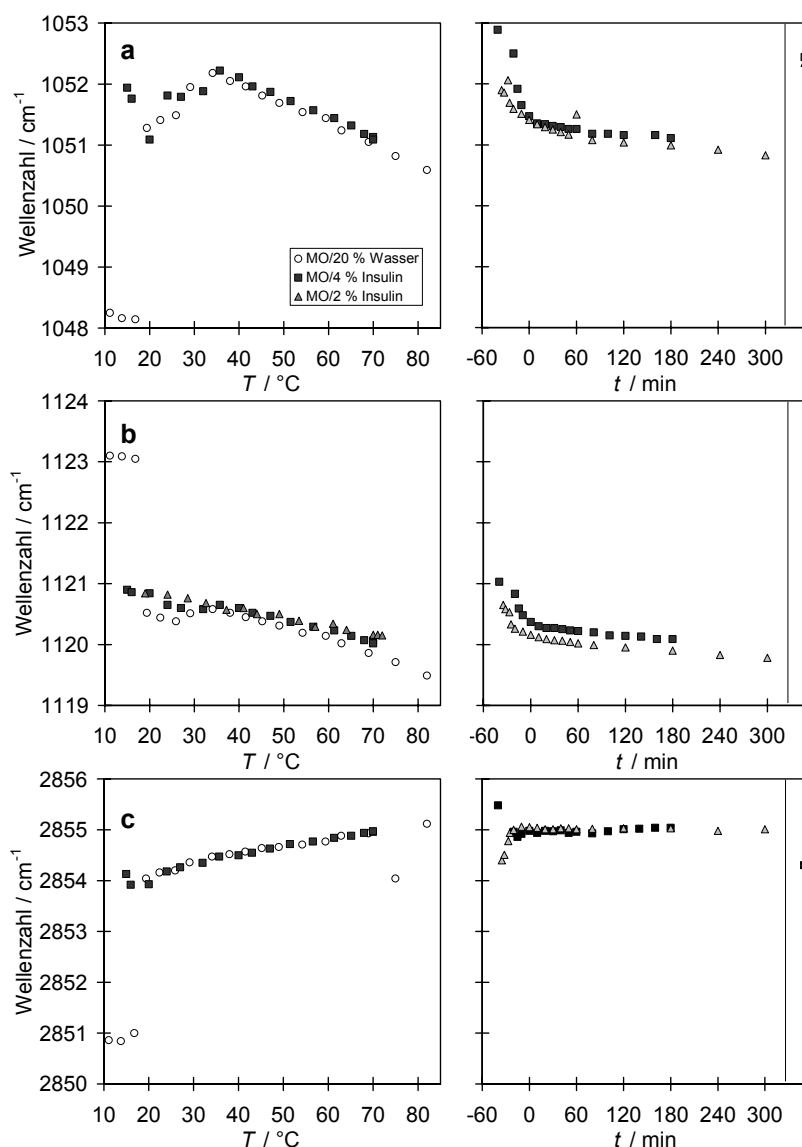
**Abbildung 57:** Vergleich der relativen Anteile der intermolekularen  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -helikalen Strukturen von Insulin in Lösung und in MO/Wasser als Funktion der Temperatur und der Zeit bei  $70^\circ\text{C}$  (Heizrate  $20^\circ\text{C/h}$ , pD 1.9).

### 6.1.3 Lipidkonformation in MO/Insulin Systemen - FT-IR Untersuchungen

Der Einfluss von Insulin auf die Struktureigenschaften von MO wird für Systeme mit 2 und 4 Gew.% Insulin untersucht und mit dem reinen MO/Wasser System verglichen. Die temperatur- und zeitabhängige Verschiebung der Wellenzahl der  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$ ,  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$  und  $\nu_s(\text{CH}_2)$  Schwingungen von MO sind in Abbildung 58 gezeigt. Die Wellenzahl der terminalen C-OH Gruppe liegt bereits bei tiefen Temperaturen bei  $1051.8 \text{ cm}^{-1}$ , also um fast  $4 \text{ cm}^{-1}$  höher als im reinen MO/Wasser System. Das liegt daran, dass das MO/4 % Insulin System unterhalb von  $\sim 35^\circ\text{C}$  in der ungeordneten  $L_\alpha$  Phase vorliegt, bei der die Rotationsfreiheit der C-OH Gruppe und somit die Schwingungsfrequenz größer ist als in der  $L_c$  Phase. Oberhalb von  $\sim 36^\circ\text{C}$ , wenn die  $Ia3d$  Phase gebildet wird, erhöht sich die Wellenzahl um  $\sim 0.4 \text{ cm}^{-1}$  und nimmt dann mit steigender Temperatur linear ab. Die Schwingungsfrequenz und deren Temperaturabhängigkeit in der kubischen  $Ia3d$  Phase werden durch Insulin nicht beeinflusst. Wird die Probe auf  $70^\circ\text{C}$  erhitzt und dann zeitabhängig gemessen, stellt man fest, dass die Wellenzahl der C-OH Gruppe in den beiden Systemen in Laufe der Zeit etwas abnimmt, was auf die Abnahme der repulsiven

Wechselwirkungen innerhalb der Kopfgruppenregion von MO zurückzuführen ist. Diese Änderungen sind reversibel.

Wenn man das temperaturabhängige Verhalten der mittleren Hydroxyl-Gruppe von MO betrachtet, stellt man fest, dass die Wellenzahl der symmetrischen C-O-Streckschwingung bereits bei 15 °C bei  $1120.9 \text{ cm}^{-1}$  liegt, unabhängig von der Insulin-Konzentration in der Probe (Abb. 58b). Der  $L_{\alpha} \rightarrow I_{a3d}$  Phasenübergang ist nicht mehr detektierbar. In der  $I_{a3d}$  Phase (ab  $\sim 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wird die Schwingungsfrequenz und deren Temperaturabhängigkeit durch das Insulin nicht beeinflusst.



**Abbildung 58:** Insulin-Einfluss auf die hydrophile und hydrophobe Region von MO/Wasser. Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Wellenzahl der Schwingungen: (a)  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$ , (b)  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ , (c)  $\nu_s(\text{CH}_2)$ . Bei den zeitabhängigen Messungen bei  $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  wird eine Equilibrierungszeit von 30 - 40 min berücksichtigt („negative“ Zeit). Die Messpunkte ganz rechts wurden nach dem Abkühlen der Probe aufgenommen (nach 12 h bei  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Die Wellenzahl der symmetrischen Methylen-Streckschwingung  $\nu_s(\text{CH}_2)$  liegt bei  $\sim 2852 \text{ cm}^{-1}$  und spiegelt die Ordnung und Packung der Lipidketten wieder. In Abbildung 58c ist die temperatur- und zeitabhängige Verschiebung der Bande aufgetragen. Anders als im reinen System, liegt die Wellenzahl bereits bei  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  bei  $\sim 2854 \text{ cm}^{-1}$ . Ab  $\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$  unterscheidet sich die Ordnung und die Packung der Systeme mit und ohne Insulin nicht mehr. Der  $L_\alpha \rightarrow \text{Ia3d}$  Phasenübergang beeinflusst die Schwingungsfrequenz nicht, da die Ketten in diesen Phasen bereits „geschmolzen“ sind.

Das Verhalten der beiden Hydroxyl-Gruppen zeigt, dass durch den Einbau von Insulin das System bereits bei tiefen Temperaturen in einer ungeordneten flüssig-kristallinen Phase vorliegt, die eine ähnliche Anzahl an *gauche*-Konformeren und eine ähnliche Kopfgruppen-Konformation hat wie das reine MO/Wasser System in der  $L_\alpha/\text{Ia3d}$  Phase. Die molekularen Eigenschaften der Lipid-Matrix in der  $\text{Ia3d}$  Phase werden durch Insulin nicht beeinflusst.

#### 6.1.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der Lipid-Umgebung auf die Struktur und Stabilität von Insulin untersucht. Insulin wurde in die kubischen Kanäle von MO/Wasser eingebaut und seine Sekundärstruktur und Aggregationskinetik wurden studiert und mit dem Insulin in Lösung verglichen. Darüber hinaus wurde sein Einfluss auf das Phasenverhalten und molekulare Eigenschaften von MO systematisch untersucht. Der Einbau von Insulin dehydratisiert das Lipid und induziert eine lamellare Phase, in der sich Domänen einer neuen, möglicherweise kubischen  $\text{Pn3m}$  Struktur befinden, die das Protein einschließen. Es ist möglich, dass dimeres Insulin bei höheren Temperaturen dissoziiert und Monomere in den Kanälen der kubischen  $\text{Ia3d}$  Phase eingeschlossen werden, wahrscheinlich in den Knotenpunkten (3-fache Verbindungen zwischen den Labyrinthen) der  $\text{Ia3d}$  Phase, wo die Gauss'sche Krümmung minimal ist und die Kanäle am weitesten sind. Das MO/Insulin System ist im ganzen Temperaturbereich ungeordnet, allerdings mit einer ähnlichen Anzahl von *gauche*-Konformeren und einer ähnlichen Kopfgruppen-Konformation wie im reinen MO/Wasser System in der  $L_\alpha$  bzw.  $\text{Ia3d}$  Phase. Offensichtlich wechselwirkt die Protein-Oberfläche kaum mit der Kopfgruppenregion von MO. Oberhalb von  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  entfalten die Insulin-Moleküle und fangen an nach 10 min bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  zu aggregieren. Die Zahl der an der Aggregation beteiligten Moleküle nimmt mit der Zeit zu, während die Größe der Aggregate kaum ansteigt. Das unterscheidet sich von der Aggregation von Insulin in *bulk*-Lösung, bei der Insulin sehr große ungeordnete Agglomerate bildet, deren Größe in Laufe der Zeit stark zunimmt. Der Mechanismus der Aggregation (Bildung von parallelen  $\beta$ -Faltblättern auf

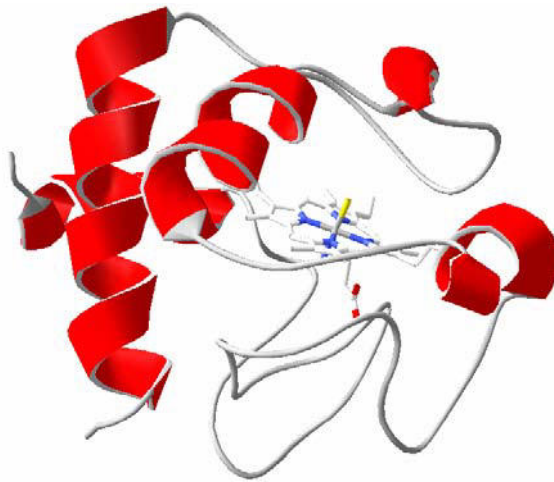
Kosten von  $\alpha$ -helikalen und ungeordneten Strukturen) wird aber durch die Lipid-Umgebung nicht beeinflusst. Allerdings wird diese Umwandlung durch den Einbau in MO/Wasser etwas beschleunigt. Die konformativen Eigenschaften von MO werden durch Insulin nur wenig beeinflusst.

## 6.2 Einbau von Cytochrom c

Im Folgenden wird der Einfluss von eingebautem Membranprotein Cytochrom c auf die Lipid-Matrix und *vice versa* systematisch mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie und Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) untersucht. Das Phasenverhalten und die Struktureigenschaften von MO/cyt c Systemen mit einem Protein-Gehalt von 0.02 bis 10 Gew.% werden temperatur- und druckabhängig untersucht. Die Hydratisierung wird bei 20 Gew.% (~82 mol% Wasser) konstant gehalten. Die Kinetik der Phasenübergänge wird mit Hilfe der zeitaufgelösten Röntgen-Kleinwinkelstreuung (TR-SAXS) studiert. Das Verhalten vom reinen MO/Wasser System wurde in Kap. 5.1 beschrieben und wird im Folgenden als Referenz benutzt.

### 6.2.1 Das Membranprotein Cytochrom c

Cytochrom c (cyt c) ist ein Hämprotein, das zum Elektronentransport in der Atmungskette dient. Es enthält als prosthetische Gruppe das Häm sowie einen Porphyrinring mit einem zentralen Eisenatom, das durch Elektronenabgabe und -aufnahme reversibel oxidiert und reduziert werden kann. Mit 104 Aminosäureresten ist es ein relativ kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 12.5 kDa. Die räumliche Struktur ähnelt einer ellipsoiden Form mit Abmessungen von 30 Å×34 Å×34 Å. Die Röntgenkristallstruktur von cyt c ist in Abbildung 59 dargestellt. Die Sekundärstruktur besteht aus ~41 %  $\alpha$ -Helices, ~35 % Schleifen und ~24 % ungeordneten Strukturen (Bushnell 1990). Cyt c ist ein kationisches Protein mit pI = 10.1. Das sechsfach koordinierte low-spin-Fe-Kation der *Häm c* Gruppe, die über Cys14- und Cys17-Reste über eine Thioether-Bindung kovalent an das Protein gebunden ist, ist über vier Stickstoffatome des Porphyrin-Ringes koordiniert; die fünfte und sechste axiale Positionen sind durch eine relativ schwache Fe-S-Bindung zwischen dem Eisen und dem Met60-Rest und eine stärkere Bindung zwischen Fe und N<sub>3</sub> von His18 besetzt. Bei der Entfaltung von cyt c wird die schwächere Fe-Met60 Bindung gebrochen. Die thermische Entfaltung von cyt c findet bei ~70 °C statt, wobei die *Häm*-Gruppe intakt bleibt (Filosa 1999, 2000). Bei ~54 °C findet eine lokale Entfaltung im Bereich der Met60-Schleife statt, bei der der Met60-Ligand durch einen stärkeren ersetzt wird. Es ist bis jetzt unbekannt, welcher Ligand bei dieser Isomerisierung eine Rolle spielt, möglicherweise sind das Lys72 und Lys79.



**Abbildung 59:** Röntgen-Kristallstruktur von Cytochrom c von Pferd (Bushnell 1990, PDB-Eintrag: 1hrc).

### 6.2.2 Sekundärstruktur von Cytochrom c in Lösung und in MO

Die Sekundärstruktur und Stabilität von cyt c in Lösung und in kubischen Kanälen von MO wird FT-IR-spektroskopisch untersucht und verglichen. Dazu werden die charakteristischen Schwingungsbanden im Amid I'-Bereich analysiert, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben wurde. Die Spektren von cyt c in Lösung werden im Bereich von  $1696$  bis  $1595\text{ cm}^{-1}$  mit einer Halbwertsbreite von  $15\text{ cm}^{-1}$  und einem Verstärkungsfaktor von 1.2 entfaltet und mit sechs Gauß-Lorentz Funktionen angepasst. Da die Amid I'-Bande von cyt c in MO mit der C=O Bande von MO überlagert ist, werden hier beide Banden gemeinsam angepasst. Die genaue Zuordnung der Wellenzahlen in der Amid I'-Bande ist in Tabelle 19 aufgelistet. Die ermittelten Strukturanteile beruhen dabei auf den gemessenen relativen Intensitäten und stellen nur die Intensitätsanteile dar. Natives cyt c in Lösung enthält demnach  $\sim 46\%$   $\alpha$ -Helices,  $\sim 18\%$  Schleifen und  $\sim 36\%$  ungeordnete Strukturen, was gut mit der Röntgenkristallstruktur von cyt c übereinstimmt (Bushnell 1990). Wird das Protein in MO eingebaut, verändert sich seine native Sekundärstruktur im Rahmen der Messgenauigkeit nicht (vgl. Tabelle 19).

Die temperaturabhängigen Messungen werden im Bereich von  $10$  bis  $90\text{ }^\circ\text{C}$  vorgenommen. Die Spektren von cyt c in Lösung (5 Gew.% in  $\text{D}_2\text{O}$ ) sind in Abbildung 60a als Funktion der Temperatur dargestellt. Der Verlauf der relativen Intensitäten ist in Abbildung 60b dargestellt. Die entsprechenden Graphiken für eingebautes cyt c (5 Gew.% in MO/ $\text{D}_2\text{O}$ ) sind in den Abbildungen 60a und 60b gezeigt.

Natives cyt c zeigt ein Bandenmaximum bei  $\sim 1652\text{ cm}^{-1}$ , typisch für Proteine mit einem hohem Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturen. Die Entfaltung zeichnet sich durch das Auftreten

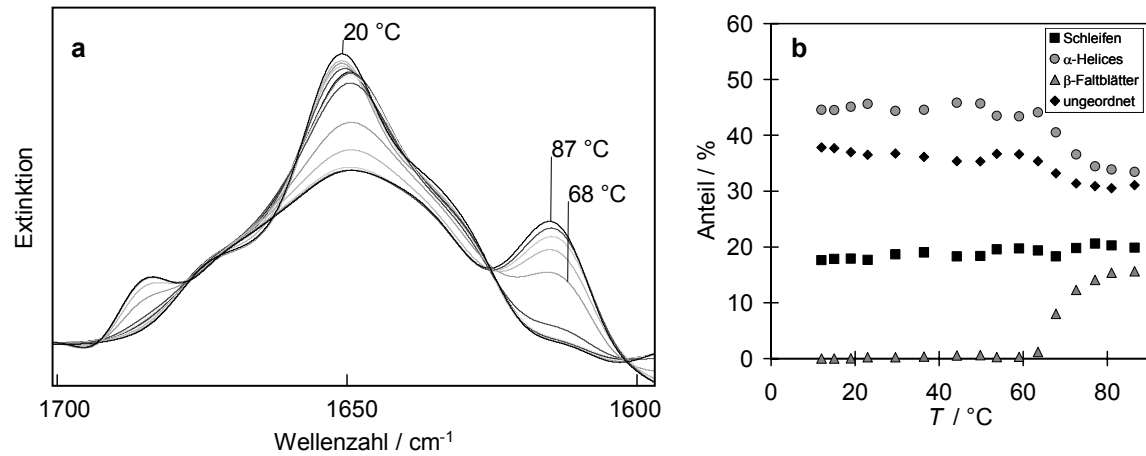
von zwei Banden bei 1613 and 1684  $\text{cm}^{-1}$ , die typisch für intermolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblatt Strukturen sind und ein Indiz für Proteinaggregation sind. Die Entfaltungstemperatur  $T_{1/2}$  liegt bei 70 °C. Der Anteil an  $\alpha$ -Helices nimmt dabei von ~46 % bei 25 °C auf ~34 % bei 80 °C ab. Der Anteil an ungeordneten Strukturen nimmt von ~37 % bei 25 °C auf ~31 % bei 80 °C ab. Gleichzeitig bilden sich intermolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblätter (~15 %). Diese Umwandlung ist irreversibel.

Bei cyt c *in cubo* zeigt sich, dass die Entfaltungstemperatur durch den Einbau in MO/Wasser etwas herabgesetzt wird und bei  $T_{1/2} = 65$  °C liegt. Allerdings verläuft die Entfaltung nach demselben Muster wie im Fall von cyt c in Lösung und mit einer ähnlichen Veränderung der Sekundärstruktur sowie einem ähnlichen Endzustand mit 17.6 % antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und 32.4 %  $\alpha$ -helikalen Strukturen (Tabelle 19).

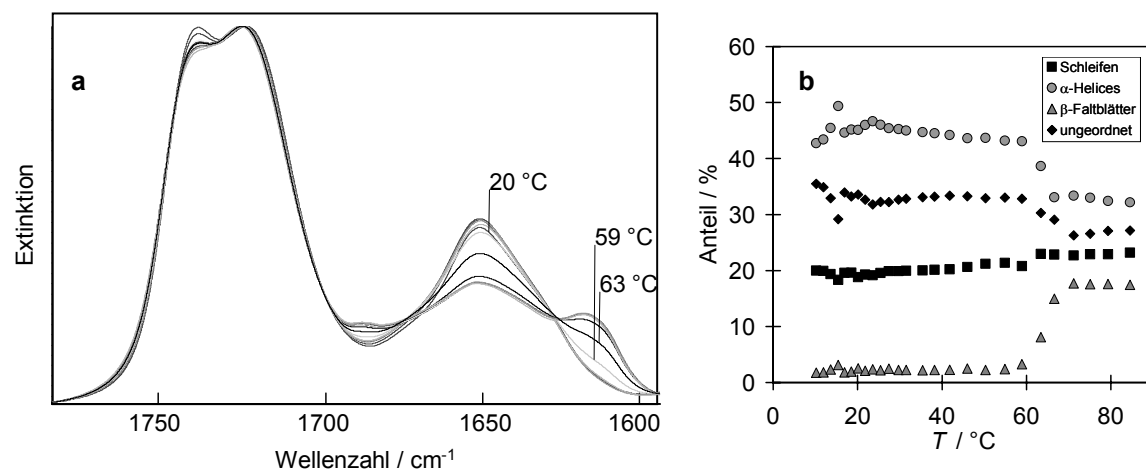
Die Stabilität von cyt c unter Druck wurde im Bereich von 1 bar bis ~16 kbar bei 50 und 55 °C untersucht. Es konnten keine signifikanten Änderungen in der Sekundärstruktur festgestellt werden. Das Protein bleibt in diesem Druckbereich, sowohl in der Lösung als auch in MO/Wasser, stabil.

**Tabelle 19:** Sekundärstrukturanalyse von cyt c. Bandenlagen ( $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ ) und relative Bandenflächen ( $\pm 2 \%$ ) der Sekundärstrukturelemente von cyt c in Lösung und in MO/Wasser bei 25 und 80 °C (5 Gew.%, pH 7.0).

Struktur-Element	cyt c in Lösung (25 °C)		cyt c in Lösung (80 °C)	
	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	Anteil / %	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	Anteil / %
Schleifen	1671	17.7	1671	20.3
$\alpha$ -Helices	1653	45.6	1651	33.8
ungeordnete Strukturen	1641, 1630	36.5	1641, 1630	30.5
antiparallele $\beta$ -Faltblätter	1613, 1684	0.2	1616, 1683	15.4
Struktur-Element	cyt c in MO (25 °C)		cyt c in MO (80 °C)	
	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	Anteil / %	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	Anteil / %
Schleifen	1671	19.6	1671	22.9
$\alpha$ -Helices	1653	46.0	1651	32.4
ungeordnete Strukturen	1641, 1630	32.2	1641, 1630	27.1
antiparallele $\beta$ -Faltblätter	1613, 1684	2.2	1616, 1683	17.6



**Abbildung 60:** Temperaturinduzierte Entfaltung von cyt c in Lösung (5 Gew.%, pD 7.0). (a) FT-IR Spektren von cyt c im Bereich von 1700 bis 1595  $\text{cm}^{-1}$  als Funktion der Temperatur (Heizrate 20°/h). (b) Flächenanteile (integrale Intensitäten) der Sekundärstrukturelemente im Amid I'-Bereich.



**Abbildung 61:** Temperaturinduzierte Entfaltung von cyt c in MO (MO/5 Gew.% cyt c, pD 7.0). (a) FT-IR Spektren von cyt c (Amid I'-Bande) und MO (C=O Bande) im Bereich von 1790 bis 1595  $\text{cm}^{-1}$  als Funktion der Temperatur (Heizrate 20°/h). (b) Flächenanteile (integrale Intensitäten) der Sekundärstrukturelemente von cyt c im Amid I'-Bereich.

### 6.2.3 Phasenverhalten von MO/cyt c Systemen - SAXS Untersuchungen

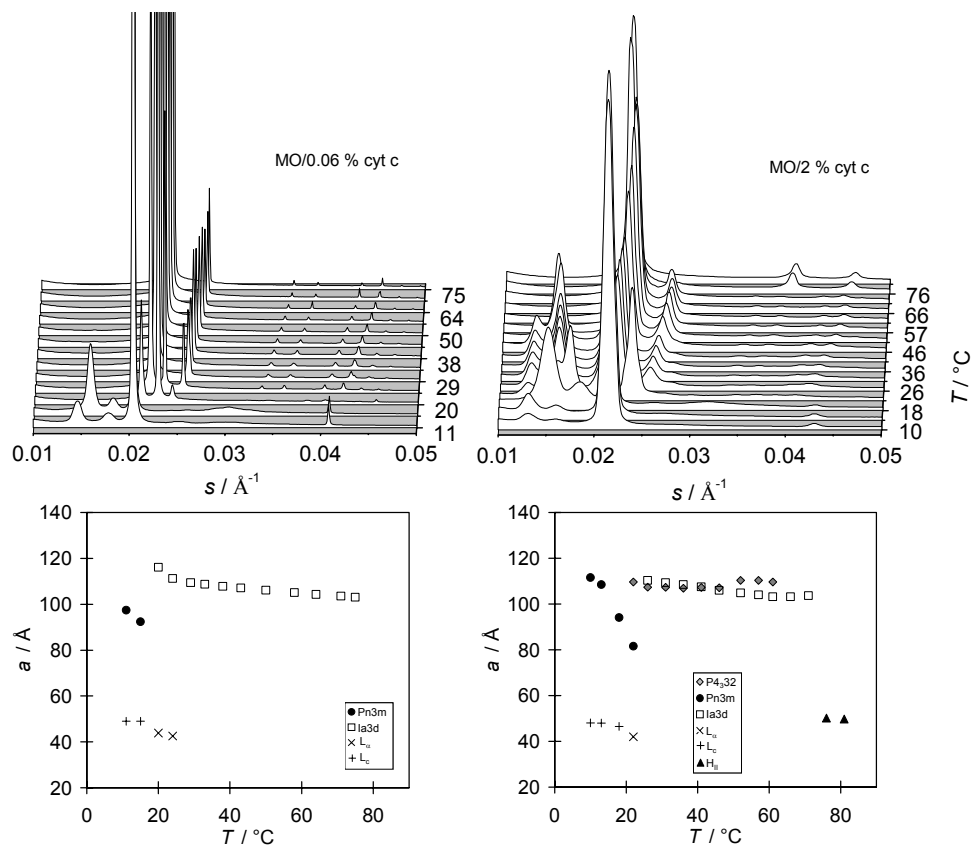
Die temperaturabhängigen SAXS Messungen wurden im Bereich von 10 bis ~80 °C mit einer Heizrate von 20°C/h durchgeführt. Die druckabhängigen Experimente fanden im Bereich von 1 bis 4000 bar bei 50 °C statt (~2 kbar/h). Soweit nicht anders angegeben, beträgt die Abweichung der kubischen Gitterkonstante  $\pm 1 \text{ \AA}$  und der lamellaren  $\pm 0.5 \text{ \AA}$ . Es wurden MO/cyt c Systeme mit 0.06, 0.2, 0.7, 2, 5, 7, 10 Gew.% Protein untersucht und mit dem reinen System verglichen. Im Folgenden werden nur ausgewählte charakteristische

Diffraktogramme gezeigt. Die Gitterkonstanten aller Systeme bei 25, 35 und 50 °C sind in Tabelle 20 aufgelistet. Alle Ergebnisse sind in entsprechenden Phasendiagrammen zusammengefasst.

In Abbildung 62 (links) sind die Röntgendiffraktogramme von MO/0.06 % cyt c als Funktion der Temperatur dargestellt. Ähnlich wie in dem reinen System können hier zwei Phasenübergänge beobachtet werden: Zum einen zwischen der lamellaren  $L_c$  Phase und der lamellaren  $L_\alpha$  Phase bei  $\sim 18$  °C und zum anderen zwischen der kubischen Pn3m und kubischen Ia3d Phase bei  $\sim 18$  °C. Die  $L_\alpha$  Phase verschwindet bei  $\sim 27$  °C und die reine Ia3d Phase bleibt bis  $\sim 80$  °C stabil.

Der Einbau von bereits 0.2 Gew.% cyt c beeinflusst signifikant das Phasenverhalten von MO/Wasser. Mehrere neue Bragg-Reflexe werden im Kleinwinkelbereich beobachtet. Die Intensität dieser Reflexe nimmt mit steigendem Protein-Gehalt in der Probe zu, während die Intensität der Ia3d Reflexe abnimmt. In Abbildung 62 (rechts) sind die Diffraktogramme von MO/2 % cyt c exemplarisch dargestellt. Unterhalb von  $\sim 20$  °C erkennt man die (110) und (111) Reflexe der kubischen Pn3m Phase bei  $s = 0.0127$  und  $0.0155 \text{ \AA}^{-1}$  und die ersten zwei Ordnungen der lamellaren  $L_c$  Phase bei  $s = 0.0208$  und  $0.0417 \text{ \AA}^{-1}$ . Die  $L_c$  Phase wandelt sich in die  $L_\alpha$  Phase um, die anschließend zusammen mit der Pn3m Phase bei  $\sim 24$  °C verschwindet. Die neuen Reflexe bei  $s = 0.0133$ ,  $0.0161$  und  $0.0208 \text{ \AA}^{-1}$  entstehen oberhalb von 20 °C neben den (211), (220), (321), (400), (420) und (332) Reflexen der kubischen Ia3d Phase. In den Systemen mit höheren cyt c-Konzentrationen können auch Reflexe höherer Ordnung detektiert werden, die mit den millerschen Indizes (110), (111), (210), (211), (220), (221), (321), (410), (420) indiziert werden können. Es liegt hier die kubisch-mizellare  $Q^{212}$  Phase vor, deren Struktur mit der Raumgruppe  $P4_332$  beschrieben werden kann (Mariani 1988). Diese Phase wird offensichtlich von cyt c induziert und auf Kosten der kubischen Ia3d Phase gebildet. Die Protein-Moleküle sind dabei in den inversen Mizellen lokalisiert. Die  $P4_332$  Phase koexistiert mit der Ia3d Phase bis  $64 \pm 3$  °C (über alle Systeme gerechnet). Interessanterweise ist das die Entfaltungstemperatur von cyt c (FT-IR Ergebnisse). Wahrscheinlich können die Mizellen die Protein-Moleküle nicht mehr halten, da der Protein-Radius bei der Entfaltung zunimmt. Während die  $P4_332$  Phase in Systemen mit 0.2 bis 5 % cyt c erst ab  $\sim 20$  °C und fast gleichzeitig mit dem Pn3m  $\rightarrow$  Ia3d Phasenübergang gebildet wird, liegt diese Phase in Systemen mit 7 und 10 % cyt c bereits bei tiefen Temperaturen vor. Der Pn3m  $\rightarrow$  Ia3d Phasenübergang wird hier zu höheren Temperaturen verschoben. Möglicherweise befindet sich das Protein auch in der kubischen Pn3m Phase bei hohen cyt c-Konzentration. Die Gitterkonstanten der  $L_\alpha$  und Ia3d Phasen werden durch den Einbau von

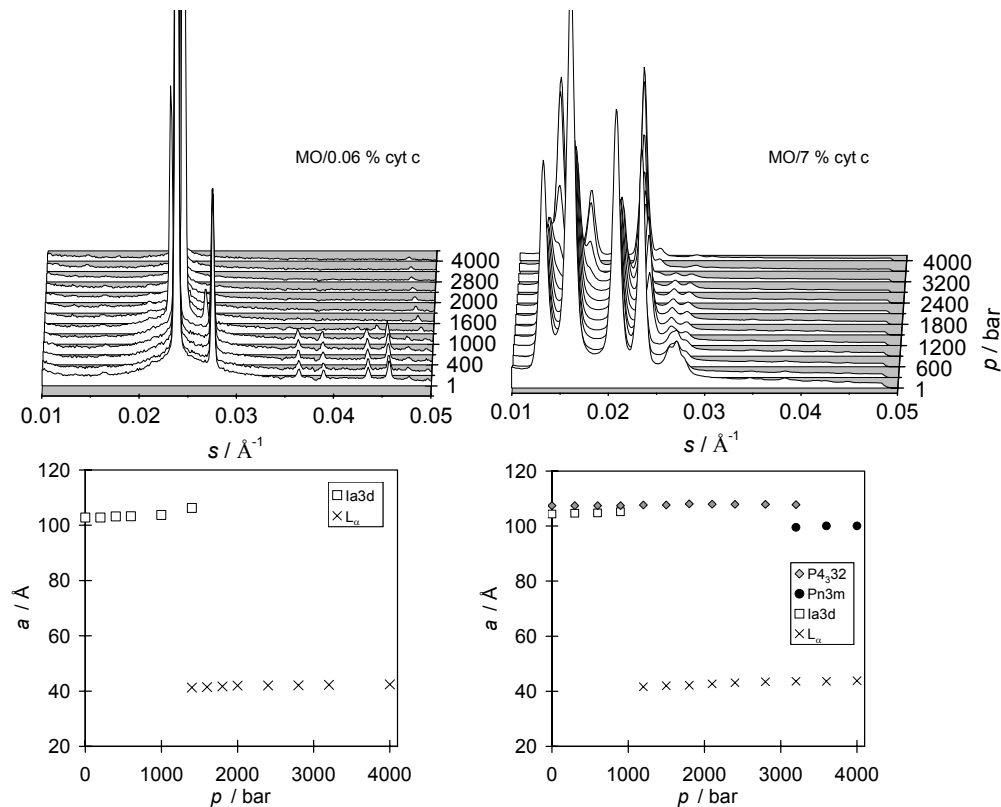
cyt c nicht beeinflusst (vgl. Tabelle 20), was ein Hinweis darauf ist, dass das Protein nicht in den Kanälen der Ia3d Phase lokalisiert ist. Das komplette  $(T, c_{\text{cyt}})$ -Phasendiagramm ist in Abbildung 64a dargestellt.



**Abbildung 62:** Röntgendiffraktogramme (oben) und Gitterkonstanten der verschiedenen Strukturen (unten) von MO/0.06 % cyt c und MO/2 % cyt c als Funktion der Temperatur (pD 7.0, 20 Gew.% Wasser).

**Tabelle 20:** Kubische und lamellare Gitterkonstanten der MO/cyt c Systeme bei 25, 35 und 50 °C.

System	25 °C				35 °C			50 °C	
	$L_{\alpha}$	Pn3m	Ia3d	P4 <sub>3</sub> 32	Pn3m	Ia3d	P4 <sub>3</sub> 32	Ia3d	P4 <sub>3</sub> 32
MO/Wasser	43.7		110.8			108.6		107.1	
MO/0.06 % cyt c	42.6		111.2			107.8		106.1	
MO/0.2 % cyt c	49.0		109.2			109.3	109.2	106.6	109.2
MO/0.7 % cyt c	43.1		114.1	111.9		109.9	110.3	107.5	110.5
MO/2 % cyt c	42.0		110.3	107.4		108.5	106.9	104.8	110.3
MO/5 % cyt c	43.7	103.3		112.3		110.5	110.7	107.7	109.2
MO/7 % cyt c	43.5	102.8		111.8	101.7	109.5	110.1	106.6	109.3
MO/10 % cyt c	40.8	97.2		107.9	97.1	109.0	106.0	101.7	104.6

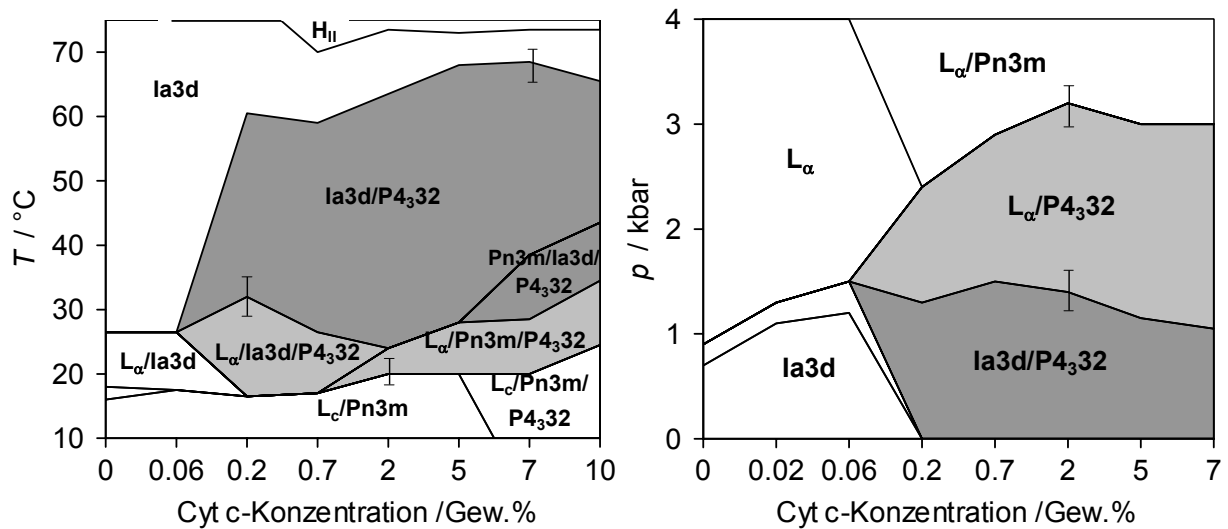


**Abbildung 63:** Röntgendiffraktogramme (oben) und Gitterkonstanten der Phasen (unten) von MO/0.06 % cyt c und MO/7 % cyt c als Funktion des Druckes bei 50 °C (pD 7.0, 20 Gew.% Wasser).

In Abbildung 63 sind die Diffraktogramme von MO/0.06 % cyt c und MO/7 % cyt c als Funktion des Druckes bei 50 °C dargestellt. Das komplette  $(p, c_{\text{cyt}})$ -Phasendiagramm ist in Abbildung 64b gezeigt. Die Anwesenheit von geringen cyt c-Konzentrationen (0.02 und 0.06 %) hat einen stabilisierenden Effekt auf die  $Ia3d$  Phase: Der  $Ia3d \rightarrow L_\alpha$  Phasenübergang verschiebt sich von 800 bar in reinem MO/Wasser System auf 1400 bar in MO/0.06 % cyt c. Die Strukturparameter der  $Ia3d$  Phase, wie Lipidlänge, Querschnittsfläche der Kopfgruppen und der Kanalradius, werden hier durch das Protein nicht beeinflusst.

Drastische Änderungen in der Druck-Stabilität werden ab 0.2 % cyt c beobachtet, wenn die proteininduzierte  $P4_332$  Phase neben der  $Ia3d$  Phase vorliegt. Neben der  $Ia3d \rightarrow L_\alpha$  Umwandlung findet ein weiterer Phasenübergang bei höheren Drücken statt. Die kubisch-mizellare  $P4_332$  Phase wandelt sich in die kubische  $Pn3m$  Phase um. Die Stabilität der  $P4_332$  Phase nimmt mit steigender cyt c-Konzentration zu, von ~2.3 kbar für 0.2 % cyt c auf ~3 kbar für 7 Gew.% cyt c. Die Packungsfrustration der Lipidketten in der mizellaren Struktur von

P4<sub>3</sub>32 relaxiert hier und es entsteht die Pn3m Phase mit einem kleineren partiellen Volumen. Wahrscheinlich befindet sich das Protein in den Kanälen der kubischen Pn3m Phase und stabilisiert sie unter Druck. Im reinen MO/Wasser System wird keine druckinduzierte Bildung der Pn3m Phase beobachtet.



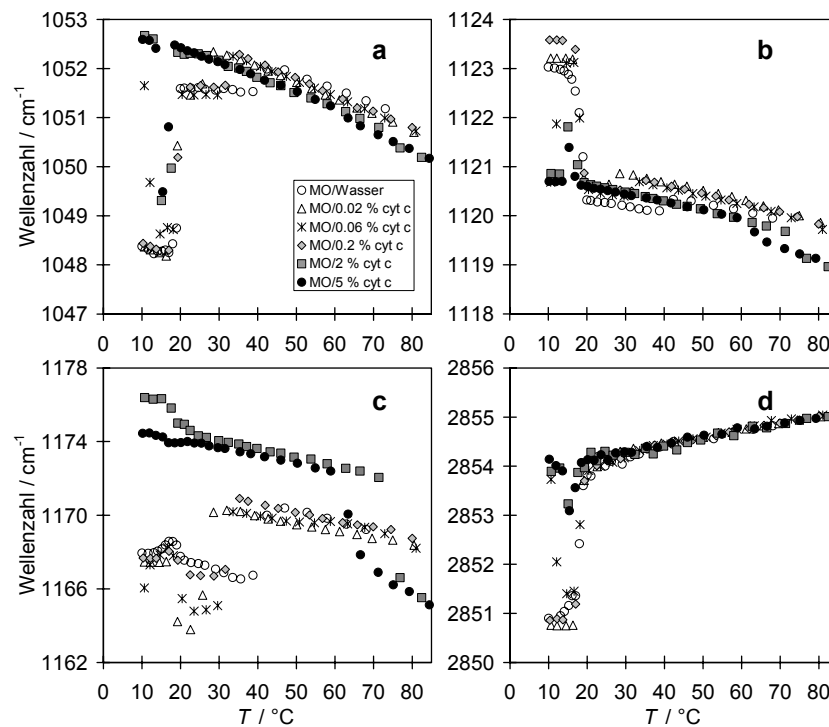
**Abbildung 64:** ( $T, c_{\text{cyt}}$ )-Phasendiagramm bei 1 bar (links) und ( $p, c_{\text{cyt}}$ )-Phasendiagramm bei 50 °C (rechts) von MO/cyt c (pD = 7.0, 20 Gew.% Wasser).

#### 6.2.4 Lipidkonformation in MO/cyt c Systemen - FT-IR Untersuchungen

Der Einfluss von cyt c auf die Struktureigenschaften von MO wird für Systeme mit 0.02, 0.06, 0.2, 2 und 5 Gew.% cyt c untersucht und mit dem reinen MO/Wasser System verglichen. Temperaturabhängige Verschiebung der Wellenzahlen der  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$ ,  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ ,  $\nu_{as}(\text{CO-O})$  und  $\nu_s(\text{CH}_2)$  Schwingungen von MO sind in Abbildung 65 gezeigt.

Die Anwesenheit von geringen Protein-Konzentrationen (bis 0.2 Gew.%) beeinflusst nicht die Schwingungsfrequenz der terminalen *sn-3* C-OH Gruppe. Ähnlich wie im reinen MO/Wasser System können beide Phasenumwandlungen ( $L_c/\text{Pn3m} \rightarrow L_\alpha/\text{Ia3d}$  und  $L_\alpha/\text{Ia3d} \rightarrow \text{Ia3d}$ ) detektiert werden (vgl. Abschnitt 5.1.4). Drastische Änderungen werden erst bei höheren Protein-Konzentrationen in MO/Wasser beobachtet. Bei 2 und 5 Gew.% cyt c liegt die Hydroxyl-Bande bereits bei 10 °C bei  $1052.5 \text{ cm}^{-1}$ , mit einer Blau-Verschiebung von  $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$  verglichen mit dem reinen System, was ein Indiz dafür ist, dass das System schon bei tiefen Temperaturen hauptsächlich in der flüssig-kristallinen Phase vorliegt. Am Phasenübergang  $L_c/\text{Pn3m} \rightarrow L_\alpha/\text{Ia3d}/\text{P4}_332$  bei  $\sim 18 \text{ °C}$  (vgl. SAXS Ergebnisse) detektiert man eine Rot-Verschiebung der Wellenzahl um  $\sim 3 \text{ cm}^{-1}$ , die auf eine starke Umstrukturierung des Systems hindeutet. Dabei wird die Beweglichkeit dieser Gruppe eingeschränkt. Die

Schwingungsfrequenz der C-OH Gruppe in der Ia3d/P4<sub>3</sub>32 Phase von MO/cyt c (ab ~30 °C) unterscheidet sich nicht signifikant von der Schwingungsfrequenz der Gruppe in der Ia3d Phase von MO/Wasser. Offensichtlich hat die Kopfgruppenregion von MO in der proteininduzierten kubisch-mizellaren P4<sub>3</sub>32 Phase eine ähnliche Konformation wie in der kubischen Ia3d Phase. Das läßt sich damit erklären, dass die beiden flüssig-kristallinen Phasen eine zum Wasser bzw. zum Protein/Wasser hin gekrümmte Oberfläche mit ähnlichen Querschnittsflächen der Kopfgruppen haben.



**Abbildung 65:** Cyt c-Einfluss auf die hydrophile und hydrophobe Region von MO. Temperaturabhängige Verschiebung der Wellenzahl der Schwingungen: (a)  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$ , (b)  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ , (c)  $\nu_{as}(\text{CO-O})$ , (d)  $\nu_s(\text{CH}_2)$ .

Ein ähnliches Verhalten wird im Fall der *sn-2* C-OH Gruppen ( $\sim 1120 \text{ cm}^{-1}$ ) beobachtet. Bei hohen Temperaturen ( $\sim 70 \text{ °C}$  bei 2 % cyt c und  $\sim 60 \text{ °C}$  bei 5 % cyt c) erkennt man eine Rot-Verschiebung der Wellenzahl um  $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$ . In diesem Temperaturbereich entfaltet cyt c und die P4<sub>3</sub>32 Phase verschwindet. Vermutlich kommt es bei der Entfaltung des Lysin-reichen Proteins zu Wechselwirkungen zwischen den Lysin-Resten und den Hydroxyl-Gruppen (C-OH $\cdots$ NH<sub>2</sub>), was zu einer Abnahme der C-OH Schwingungsfrequenz führt.

Die antisymmetrische *sn-1* CO-C Streckschwingung wird ebenfalls erst bei höherer Proteinkonzentrationen stark beeinflusst. Für 2 und 5 % cyt c beobachtet man eine größere Veränderung des Kurvenverlaufs. Die Phasenübergänge haben dann keinen deutlichen Einfluss auf die Konformation der Ester-Gruppe und es wird eine drastische Blau-

Verschiebung der Schwingungsfrequenz sowohl bei tiefen als auch bei hohen Temperaturen beobachtet. Die Wellenzahl nimmt dabei von  $\sim 1170 \text{ cm}^{-1}$  in reinem MO über  $\sim 1171 \text{ cm}^{-1}$  in MO mit 0.2 % Protein auf  $\sim 1174 \text{ cm}^{-1}$  in MO mit 2 und 5 % Protein zu (bei  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Offensichtlich unterscheidet sich die Konformation der CO-O-C Gruppe in der P4<sub>3</sub>32 Phase von der in der Ia3d Phase. Möglicherweise durch eine höhere Anzahl der *dg* Konformere in der Nähe der Kopfgruppen. Oberhalb von  $\sim 60$  (MO/2 % cyt c) bzw.  $\sim 70 \text{ }^\circ\text{C}$  (MO/5 % cyt c) nimmt die Schwingungsfrequenz stark ab. Das ist konsistent mit dem Verhalten der *sn-2* C-OH Gruppe und deutet auf Änderungen der Lipid-Konformation an der polar/apolar Grenzfläche nach der Protein-Entfaltung und das Verschwinden der P4<sub>3</sub>32 Phase hin.

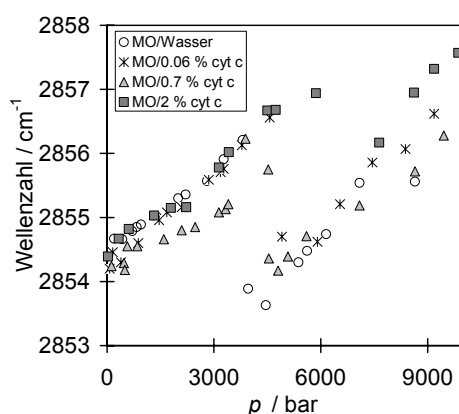
Die symmetrische Methylen-Streckschwingung  $\nu_s(\text{CH}_2)$  liegt bei  $\sim 2852 \text{ cm}^{-1}$  und spiegelt die Ordnung und Packung der Lipidketten wider. Die Systeme mit cyt c-Konzentrationen unterhalb von 0.2 % zeigen ein ähnliches Verhalten wie das reine MO/Wasser System. Bei  $\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$  wird eine Blau-Verschiebung von  $\sim 2851$  auf  $\sim 2854 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet, die den Phasenübergang  $L_c/\text{Pn}3m \rightarrow L_\alpha/\text{Ia}3d$  widerspiegelt. Bei höheren Protein-Konzentrationen liegt die Wellenzahl der Schwingung bereits bei  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  bei  $\sim 2854 \text{ cm}^{-1}$ , was auf einen erhöhten Anteil der *dg*-Konformere in der Alkylkette, verglichen mit dem reinen System bei tiefen Temperaturen, hinweist. Bei  $17 \text{ }^\circ\text{C}$  erkennt man, ähnlich wie bei den Kopfgruppen beobachtet wurde, eine Unstetigkeit im Kurvenverlauf, die auf die Entstehung der P4<sub>3</sub>32 Phase hinweist.

Eine quantitative Betrachtung der Ketten-Konformation wird durch Analyse der Methylen-Kippschwingung  $\omega(\text{CH}_2)$  ermöglicht (vgl. Abschnitt 5.1.4). In der flüssig-kristallinen Phase werden Schwingungsmoden bei  $1367$ ,  $1354$  und  $1341 \text{ cm}^{-1}$  detektiert, die den *kink (gtg)*, *double gauche* und *end gauche* Konformeren zugeordnet werden können. Diese Banden werden mit vier gemischten Gauß-Lorenz-Funktionen simuliert und die Flächenanteile ermittelt. Zur Normierung wird die Intensität der konformationsunabhängigen *umbrella*  $\delta(\text{CH}_3)$ -Schwingung bei  $1378 \text{ cm}^{-1}$  verwendet. In Tabelle 21 sind die Anteile der *dg* Konformere in der Lipidkette für MO/cyt c Systeme mit 0.02, 0.2, 2 und 5 % Protein aufgelistet. Der Anteil der *dg* Konformere und somit die Unordnung nimmt bei 2 und 5 % cyt c im ganzen Temperaturbereich zu. Das ist konsistent mit der Annahme, dass das Protein die kubisch-mizellare Phase P4<sub>3</sub>32 induziert. Die Alkylketten in den inversen Mizellen müssen eine höhere konformationelle Unordnung haben als die in der kubischen Ia3d Phase.

**Tabelle 21:** Cyt c-Einfluss auf die hydrophobe Region von MO. Anteil der *dg* Konformere in der Alkylkette von MO in verschiedenen MO/cyt c Systemen.

System	<i>dg</i> -Anteil bei 20 °C	<i>dg</i> -Anteil bei 50 °C
MO/Wasser	26 %	52 %
MO/0.02 % cyt c	28 %	50 %
MO/0.2 % cyt c	28 %	51 %
MO/2 % cyt c	39 %	53 %
MO/5 % cyt c	43 %	68 %

Die Druckabhängigkeit der Wellenzahl der  $\nu_s(\text{CH}_2)$  Schwingung in verschiedenen MO/cyt c Systemen bei 50 °C ist in Abbildung 66 dargestellt. Die lineare (druckinduzierte) Zunahme der Schwingungsfrequenz ist von einer starken Rot-Verschiebung bei mittleren Drücken überlagert, die ein Indiz für den Übergang von der flüssig-kristallinen in die kristalline Phase ist. Es wird eine geordnete kristalline Phase gebildet (vermutlich eine lamellare  $L_c$  Phase), in der die Alkylketten hauptsächlich in der *all-trans* Konformation vorliegen und einen kleinen Packungsparameter besitzen. Der Phasenübergang verschiebt sich mit zunehmendem Proteingehalt zu höheren Drücken, von ~4 kbar in MO/Wasser über ~5 kbar in MO/0.7 % cyt c auf ~7 kbar in MO/2 % cyt c. In MO/Wasser handelt es sich um den  $L_\alpha \rightarrow L_c$  Phasenübergang, in den MO/cyt c Systemen beobachtet man den  $L_\alpha/\text{Pn}3\text{m} \rightarrow L_c$  Übergang. Nach der Umwandlung tritt die Feld-Aufspaltung der IR-Banden ein, die ein Hinweis darauf ist, dass hier tatsächlich eine lamellare  $L_c$  Phase vorliegt (Czeslik 1998). Der Einbau von cyt c wirkt offensichtlich dem ordnenden Einfluss des Druckes entgegen und erhöht zugleich die Druckstabilität der Lipid-Matrix.



**Abbildung 66:** Druckabhängige Verschiebung der Wellenzahl der  $\nu_s(\text{CH}_2)$  Schwingung in verschiedenen MO/cyt c Systemen (bei 50 °C).

### 6.2.5 Kinetik der Phasenübergänge - SAXS Drucksprunguntersuchungen

Die Kinetik und Mechanismen der Phasenübergänge wurden für die Systeme MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c untersucht und mit dem reinen MO/Wasser System verglichen (Abschnitt 5.1.3). Es wurden Drucksprünge unterschiedlicher Amplituden angewendet, um gezielt Phasenübergänge zu induzieren (vgl. Phasendiagramm in Abb. 64). Der Einfluss des Proteins auf den  $L_\alpha \rightarrow Ia3d$  Übergang und die Entstehung bzw. Umwandlung der proteininduzierten  $P4_332$  Phase sind hier von besonderem Interesse.

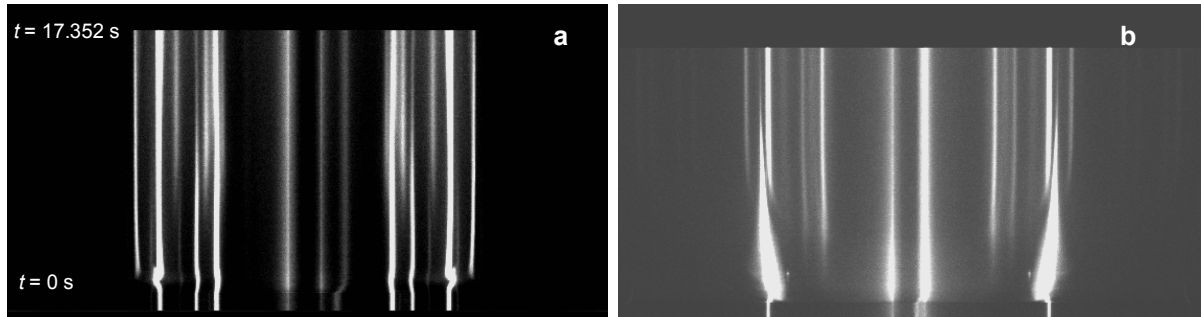
#### $L_\alpha/Pn3m \rightarrow Ia3d/P4_332$

Ein Drucksprung von 4000 auf 1 bar bei 50 °C wird genutzt, um den komplexen  $L_\alpha/Pn3m \rightarrow Ia3d/P4_332$  Phasenübergang zu untersuchen. In Abbildung 67a sind CCD-Aufnahmen vor und nach dem Sprung gezeigt. Die Bilder sind in dem 'streak-camera'-Modus aufgenommen (Phillips 2002). Jede horizontale Linie entspricht einem Zeitabschnitt von 12 ms. Die entsprechenden Diffraktogramme für das MO/5 % cyt c System sind in Abbildung 68a dargestellt. Die Änderungen der Gitterkonstanten und normalisierten Streuintensitäten der Phasen in beiden untersuchten Systemen sind in Abbildung 69 gezeigt. Soweit nicht anders angegeben, beträgt die Abweichung der kubischen Gitterkonstante  $\pm 2 \text{ \AA}$ , und der lamellaren  $\pm 1 \text{ \AA}$ .

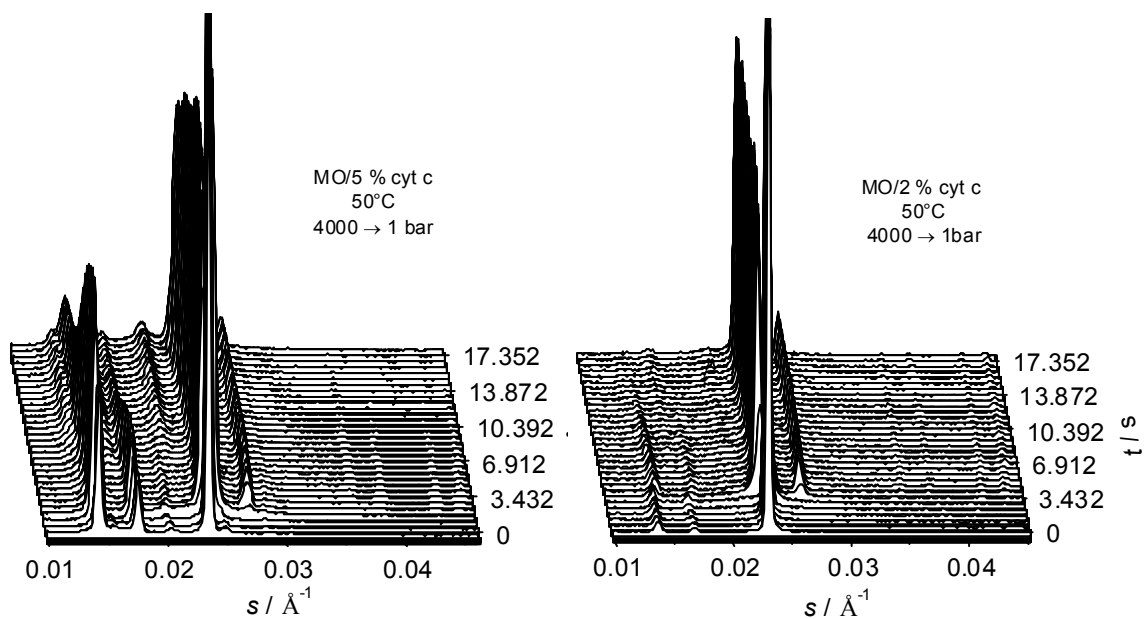
Vor dem Drucksprung (4 kbar, 50 °C) befindet sich das MO/5 % cyt c System im Gleichgewichtszustand. Die lamellare  $L_\alpha$  Phase ( $a = 42.5 \text{ \AA}$ ) koexistiert mit der kubischen  $Pn3m$  Phase ( $a = 98.5 \text{ \AA}$ ). Unmittelbar nach dem Drucksprung nimmt die Intensität der  $Pn3m$  Phase um  $\sim 38 \%$  ab. Die Intensität der  $L_\alpha$  Phase nimmt ebenfalls ab und verschwindet nach  $\sim 1.57 \text{ s}$  nach dem Sprung. Nach  $\sim 2.5 \text{ s}$  erreicht die Intensität der Bragg-Reflexe der  $Pn3m$  Phase das Maximum und nimmt dann zunächst schnell (bis 10 s), und dann langsam (bis 18 s) ab. Die  $Ia3d$  Phase mit der Gitterkonstante  $a = 105 \text{ \AA}$  entsteht aus der  $L_\alpha$  Phase nach  $\sim 1.09 \text{ s}$  nach dem Sprung, und bildet sich sehr schnell innerhalb von  $\sim 1 \text{ s}$  und erreicht das Plateau nach  $\sim 4 \text{ s}$ . Mit der Zeit beginnt die Intensität der  $Pn3m$  Phase zu sinken. Wenn die  $Pn3m$  Phase um  $\sim 23 \%$  abgebaut ist, werden die ersten Reflexe der kubisch-mizellaren  $P4_332$  Phase mit der Gitterkonstante  $a = 106.4 \text{ \AA}$  sichtbar (6.25 s nach dem Sprung). Diese bildet sich anfänglich (bis  $\sim 10 \text{ s}$ ) schnell, und dann sehr langsam aus der  $Pn3m$  Phase. Auch 17.35 s nach dem Sprung ist die Umwandlung noch nicht abgeschlossen.

Ein analoges Szenario wird für das MO/2 % cyt c System beobachtet. Bei dem ersten Phasenübergang,  $L_\alpha \rightarrow Ia3d$ , nimmt die Intensität der  $L_\alpha$  Phase sofort nach dem Drucksprung ab und verschwindet bei 3.31 s, während die  $Ia3d$  Phase ausgebildet wird. Der Übergang ist hier also um den Faktor zwei verlangsamt im Vergleich zu dem System mit 5 % cyt c. Nach

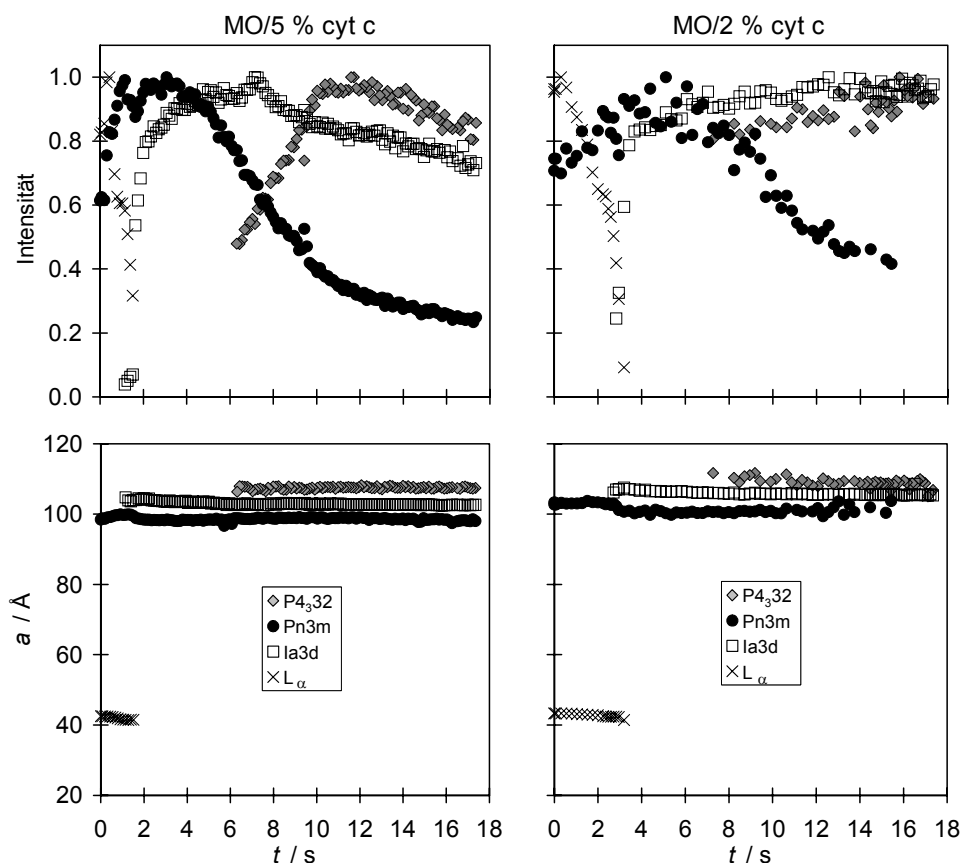
~5 s erreicht die Intensität der Pn3m Phase ein Maximum und nach ~7.3 s werden die ersten Reflexe der P4<sub>3</sub>32 Phase sichtbar (Abb. 68b). Auch hier erfolgt die Bildung der P4<sub>3</sub>32 Phase sehr langsam und ist nach 17.53 s noch nicht abgeschlossen.



**Abbildung 67:** CCD-Aufnahmen („streak-camera“-Modus) von MO/5 % cyt c nach dem Drucksprung von 4000 auf 1 bar bei 50 °C (a) und 35 °C (b).



**Abbildung 68:** Röntgendiffraktogramme von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c nach dem Drucksprung von 4000 auf 1 bar (links) bei 50 °C (pD 7.0, 20 Gew.% Wasser). Nur jedes 25te Diffraktogramm ist gezeigt.



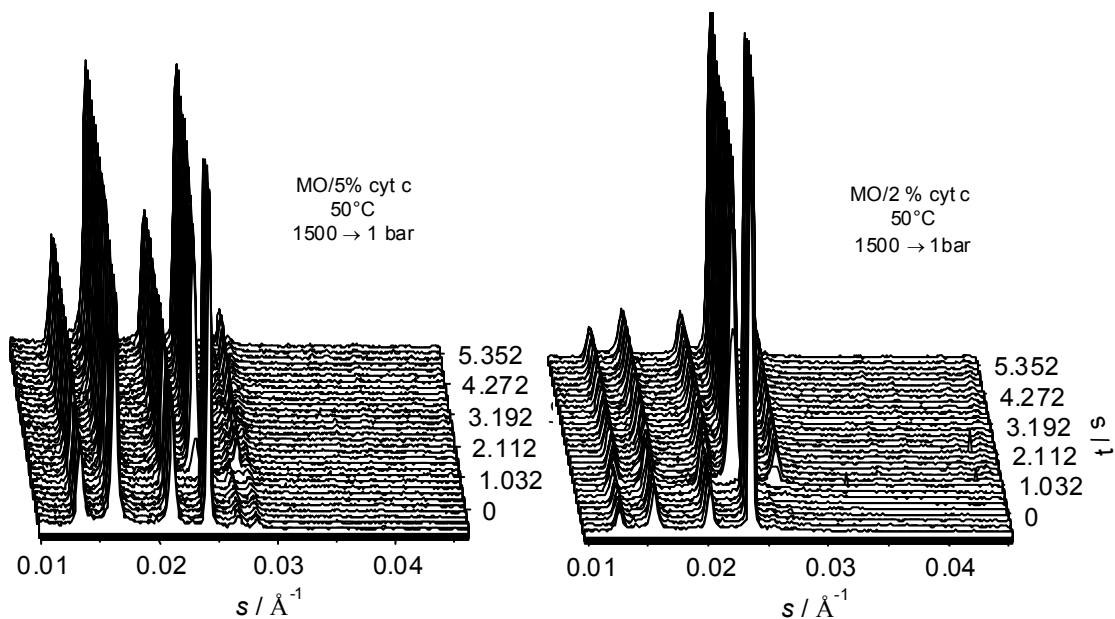
**Abbildung 69:** Zeitabhängiger Verlauf der normierten Intensitäten (oben) und der Gitterkonstanten (unten) der P<sub>4</sub><sub>32</sub>, Pn<sub>3m</sub>, Ia<sub>3d</sub> und L<sub>α</sub> Phasen von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c nach dem Drucksprung von 4000 auf 1 bar bei 50 °C.

### $L_{\alpha}/P_{432} \rightarrow Ia_{3d}/P_{432}$ Übergang

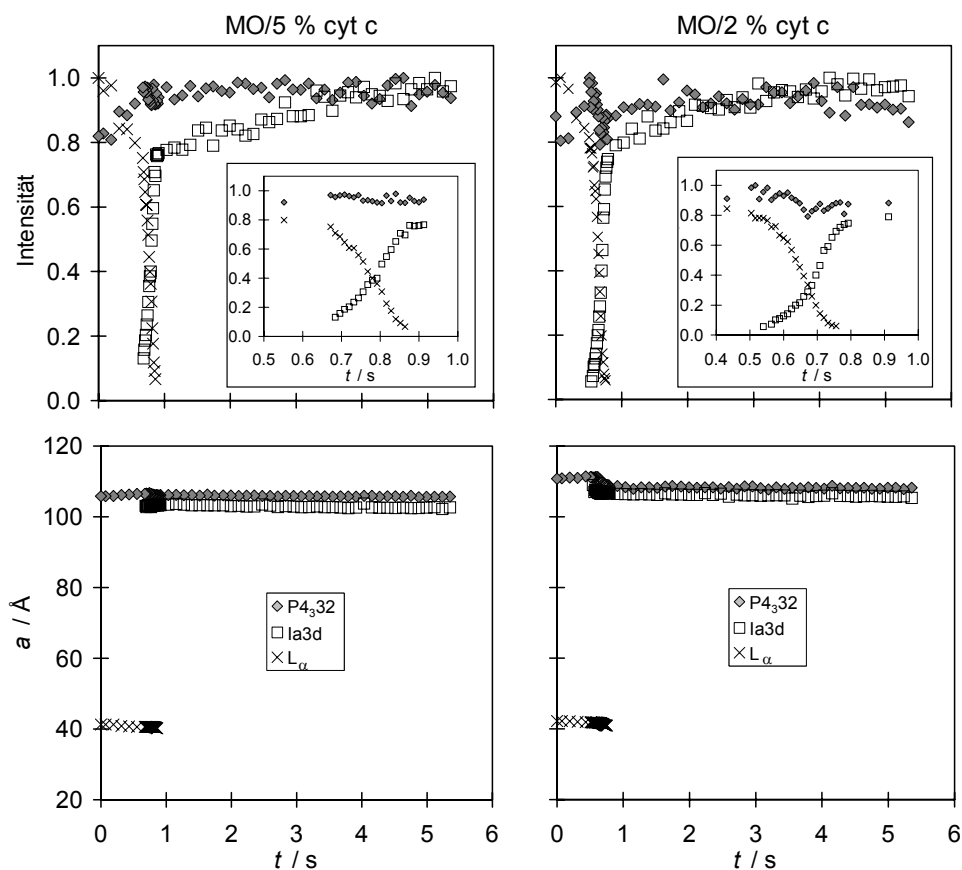
Durch einen Drucksprung von 1500 auf 1 bar bei 50 °C wird der L<sub>α</sub> → Ia<sub>3d</sub> Phasenübergang neben der koexistierenden kubisch-mizellaren P<sub>4</sub><sub>32</sub> Phase induziert. In Abbildung 70a sind die zeitaufgelösten Diffraktogramme für das System MO/5 % cyt c nach dem Sprung ( $t = 0$ ) dargestellt. Vor dem Sprung befindet sich das System im Gleichgewicht. Man detektiert den (001) Reflex der lamellaren L<sub>α</sub> Phase bei  $s = 0.0243 \text{ \AA}^{-1}$  und Reflexe bei  $s = 0.0134, 0.0163, 0.0212$  und  $0.0268 \text{ \AA}^{-1}$ , die im Verhältnis  $\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{5}:\sqrt{8}$  zueinander stehen und das Verhältnis der Intensitäten wie 4:10:6:1 haben, was charakteristisch für die P<sub>4</sub><sub>32</sub> Phase ist. Nach dem Drucksprung entstehen neben den Reflexen der P<sub>4</sub><sub>32</sub> Phase weitere Reflexe mit dem Verhältnis der Positionen  $\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{14}:\sqrt{16}:\sqrt{20}$ , die von der kubischen Ia<sub>3d</sub> Phase stammen. In Abbildung 71 (links) sind die normalisierten Streuintensitäten und die Gitterkonstanten der Phasen L<sub>α</sub>, P<sub>4</sub><sub>32</sub> und Ia<sub>3d</sub> als Funktion der Zeit dargestellt. Vor dem Phasenübergang liegt die L<sub>α</sub> Phase mit der Gitterkonstante  $a = 41.2 \text{ \AA}$  und die P<sub>4</sub><sub>32</sub> Phase ( $a = 105.8 \text{ \AA}$ ) vor. Nach dem Sprung auf 1 bar nimmt die Intensität der lamellaren Struktur kontinuierlich ab, und mit

der Zeit (nach 0.6 s) erscheint die kubische Ia3d Phase mit der Gitterkonstante  $a = 109 \text{ \AA}$ . Die Intensität der Ia3d Phase erreicht ihr Maximum innerhalb von  $\sim 0.2 \text{ s}$ , und nach 0.87 s nach dem Sprung ist die  $L_\alpha \rightarrow \text{Ia3d}$  Umwandlung vollendet. Dabei erreicht die Gitterkonstante einen Gleichgewichtswert von  $106.5 \text{ \AA}$ . Die koexistierende P4<sub>3</sub>32 Phase scheint von dem Phasenübergang nicht beeinflusst zu werden.

Im System mit einer kleineren Protein-Konzentration (MO/2 % cyt c) wird ein ähnlicher Mechanismus der Phasenumwandlung beobachtet wie im Fall von MO/5 % cyt c, allerdings mit einer etwas anderen Kinetik. Die kubische Ia3d Phase entsteht aus der  $L_\alpha$  Phase  $\sim 0.5 \text{ s}$  nach dem Sprung mit einer Gitterkonstante  $a = 109.0 \text{ \AA}$  und wird innerhalb von  $0.23 \text{ s}$  ausgebildet (Abb. 71b). Die  $L_\alpha$  Phase verschwindet nach  $0.76 \text{ s}$  nach dem Sprung. Das ist 13 % schneller, als im MO/5 % cyt c System. Auch hier werden keine signifikanten Änderungen der P4<sub>3</sub>32 Phase beobachtet.



**Abbildung 70:** Röntgendiffraktogramme von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c nach dem Drucksprung von 1500 auf 1 bar (rechts) bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  (pD 7.0, 20 Gew.% Wasser). Nur jedes 25te Diffraktogramm ist gezeigt.

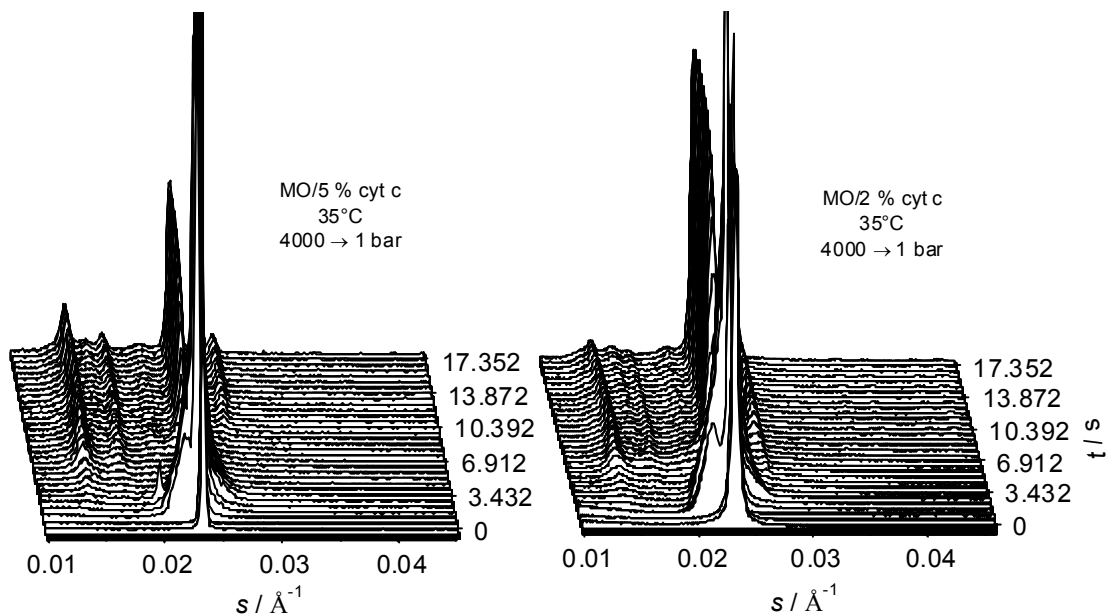


**Abbildung 71:** Zeitabhängiger Verlauf der normierten Intensitäten (oben) und der Gitterkonstanten (unten) der P $4_3$ 32, Ia3d und L $\alpha$  Phasen von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c nach dem Drucksprung von 1500 auf 1 bar bei 50 °C.

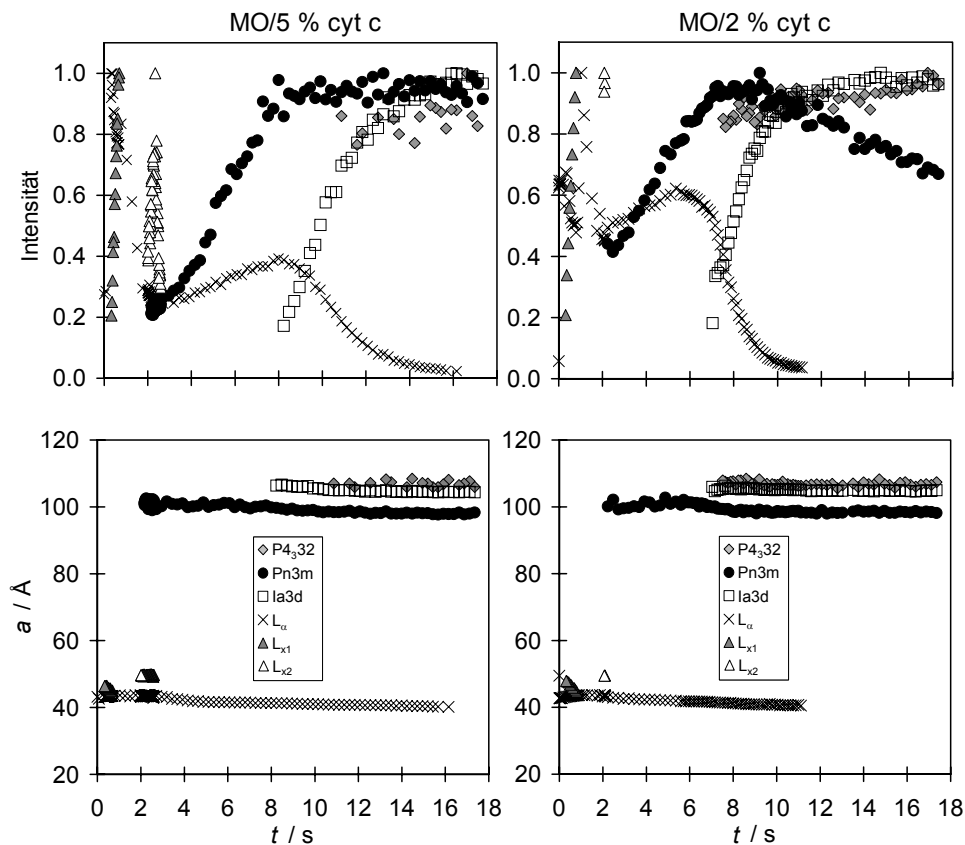
### $L_\alpha \rightarrow Ia3d/P4_332$ Übergang

Durch einen Drucksprung von 4000 auf 1 bar bei 35 °C wird der Übergang von der reinen L $\alpha$  Phase in die kubische Ia3d und P $4_3$ 32 Phase induziert. Der Mechanismus der Bildung der proteininduzierten P $4_3$ 32 Phase kann somit im Detail studiert werden. In Abbildung 72 sind die Diffraktogramme von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c als Funktion der Zeit nach dem Sprung dargestellt. Bei 4 kbar und 35 °C (Gleichgewicht) ist das MO/5 % cyt c System in der lamellaren L $\alpha$  Phase mit der Gitterkonstante  $a = 43.2$  Å. Die Wasserschichtdicke beträgt dabei 9.1 Å. Die Lipidlänge ist 17 Å bei einer Querschnittsfläche der Kopfgruppen von 37.6 Å $^2$ . In Abbildung 73 (links) sind die normierten Streuintensitäten und die Gitterkonstanten der beteiligten Strukturen als Funktion der Zeit dargestellt. Nach dem Sprung nimmt die Intensität der L $\alpha$  Phase ab, begleitet durch eine starke Verbreiterung des (001) Reflexes. Nach 0.23 s wird zusätzlich ein Reflex bei  $s = 0.02155$  Å $^{-1}$  als breite Schulter detektiert. Unter Annahme einer lamellaren Struktur kann die Gitterkonstante  $a_{x1} = 46.4$  Å berechnet werden. Die Intensität des Peaks nimmt mit der Zeit zu und seine Position verschiebt sich zu größeren  $s$ -

Werten. Ca. 0.5 s nach dem Sprung verschwindet diese Struktur unter dem (001) Reflex der  $L_\alpha$  Phase. Wenn die  $L_\alpha$  Intensität um  $\sim 70\%$  abgenommen hat, erscheint ein weiterer intermediärer Bragg-Reflex bei  $s = 0.0202 \text{ \AA}^{-1}$  in einem Zeitfenster von 2.00 bis 2.59 s nach dem Sprung. Vermutlich hat dieses Intermediat ebenfalls eine lamellare Struktur ( $L_{\alpha 2}$ ), für die die Gitterkonstante  $a = 49.7 \text{ \AA}$  berechnet werden kann. Offensichtlich ist die intermediäre lamellare Phase stärker hydratisiert als die ursprüngliche  $L_\alpha$  Phase. Nach 2.15 s erscheinen die Reflexe der Pn3m Phase ( $a \approx 101 \text{ \AA}$ ). Diese kubische Struktur existiert nicht unter Gleichgewichtsbedingungen (1 bar,  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und ist als ein Intermediat aufzufassen. Nach 8.1 s erreicht die Intensität der Pn3m Phase ein Plateau und es entsteht die Ia3d Phase mit der Gitterkonstante  $a = 106.4 \text{ \AA}$ . Gleichzeitig mit der Bildung der Ia3d Phase nimmt die Intensität der  $L_\alpha$  Phase ab und verschwindet bei 16.27 s. Die kubische Ia3d Phase bildet sich also aus der  $L_\alpha$  Phase innerhalb von  $\sim 8.2$  s. Es wird keine Umwandlung aus der Pn3m in die Ia3d Phase beobachtet. Die P4<sub>3</sub>32 Phase entsteht  $\sim 10.9$  s nach dem Sprung ( $a = 107 \text{ \AA}$ ) und wird langsam aus der Pn3m Phase gebildet. Der Pn3m  $\rightarrow$  P4<sub>3</sub>32 Phasenübergang ist bei 17.35 s erst zu 8 % vollzogen.



**Abbildung 72:** Zeitaufgelöste Röntgendiffraktogramme von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c nach dem Drucksprung von 4000 auf 1 bar bei  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nur jedes 25te Diffraktogramm ist gezeigt.



**Abbildung 73:** Zeitabhängiger Verlauf der normierten Intensitäten (oben) und der Gitterkonstanten (unten) der P<sub>4</sub><sub>3</sub>32, Pn3m, Ia3d, L<sub>x</sub> und L<sub>α</sub> Phasen von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c nach dem Drucksprung von 4000 auf 1 bar bei 35 °C.

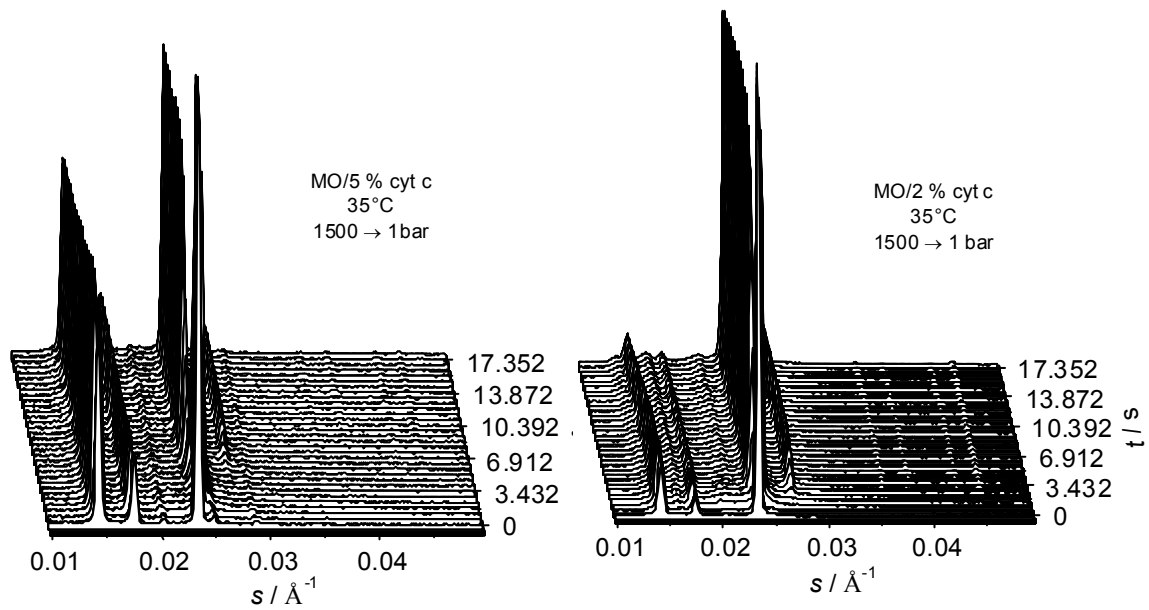
Der gleiche Mechanismus der Phasenumwandlung wird auch für das Lipid mit 2 % cyt c beobachtet. Die Kinetik der Übergänge ist allerdings etwas schneller (Abbildungen 72 und 73 rechts). Ähnlich wie in MO/5 % cyt c, nimmt die Intensität des (001) Reflexes der L<sub>α</sub> Phase unmittelbar nach dem Drucksprung ab, während seine Breite zunimmt. Nach 0.31 s erscheint ein Reflex bei  $s = 0.0209 \text{ \AA}^{-1}$ , der dem lamellaren Intermediat L<sub>x1</sub> zugeordnet werden kann ( $a = 47.9 \text{ \AA}$ ). Ab 0.82 s ist diese Struktur nicht mehr detektierbar. Das zweite Intermediat wird nach  $\sim 2.07 \text{ s}$  bei  $s = 0.0202 \text{ \AA}^{-1}$  sichtbar und existiert nur über eine kurze Zeit, bis die ersten Reflexe des nächsten Intermediates, der kubischen Pn3m Phase, bei  $\sim 2.2 \text{ s}$  erscheinen. Die L<sub>α</sub> → Ia3d Umwandlung beginnt bei 7.45 s wenn die Pn3m Intensität das Plateau erreicht und ist bei 11.11 s vollständig. Somit entsteht die Ia3d Phase aus der L<sub>α</sub> Phase innerhalb von  $\sim 3.7 \text{ s}$ . Die neue P<sub>4</sub><sub>3</sub>32 Phase erscheint erst 7.5 s nach dem Sprung mit einer Gitterkonstante  $a \approx 107 \text{ \AA}$ , und wird langsam aus der Pn3m Phase gebildet.

*L<sub>α</sub>/Pn3m → Ia3d/P4<sub>3</sub>32 Übergang*

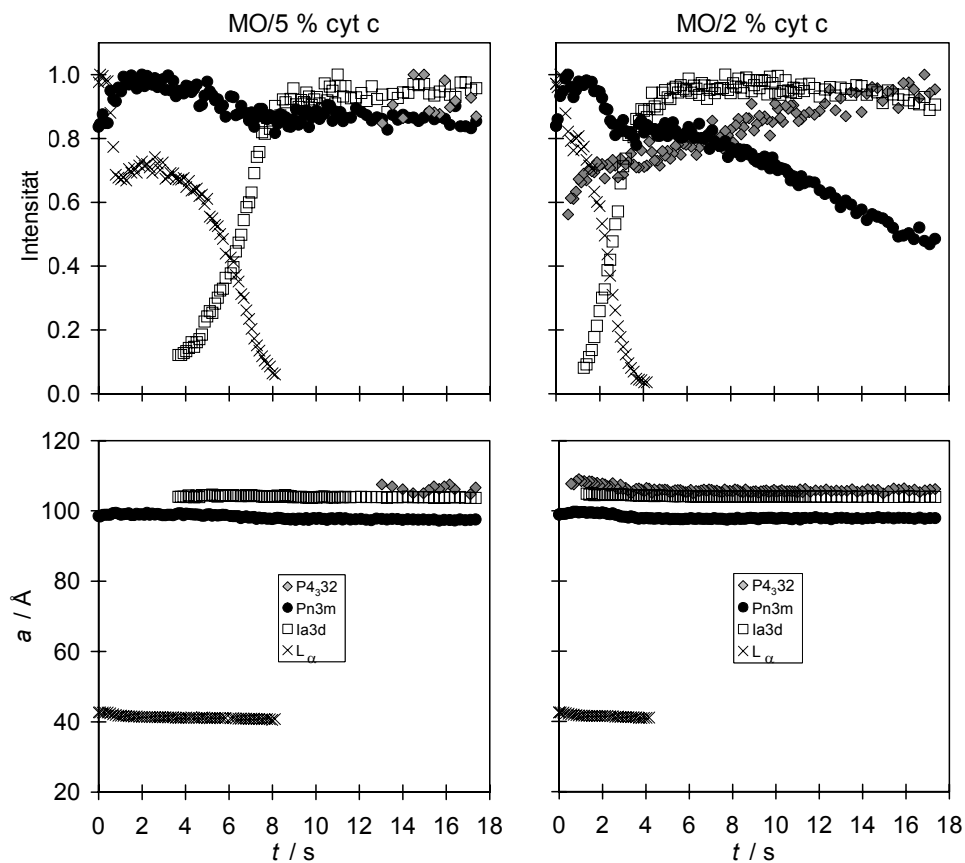
Das Drucksprungexperiment von 1500 auf 1 bar bei 35 °C wurde durchgeführt, um zwei Phasenübergänge, L<sub>α</sub> → Ia3d und Pn3m → P4<sub>3</sub>32, nebeneinander zu induzieren. Die zeitaufgelösten Röntgendiffraktogramme von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c sind in Abbildung 74 dargestellt. Die normierten Intensitäten und die Gitterkonstanten der beteiligten Phasen sind in Abbildung 75 gezeigt.

Vor dem Sprung liegt das MO/5 % cyt c System im Gleichgewicht (1500 bar, 35 °C) vor: Die kubische Pn3m Phase ( $a = 98.6 \text{ \AA}$ ) koexistiert hier mit der lamellaren L<sub>α</sub> Phase ( $a = 42.7 \text{ \AA}$ ). Unmittelbar nach dem Drucksprung nimmt die Intensität der Pn3m Phase etwas zu, während die Intensität der L<sub>α</sub> Phase abnimmt, was auf eine Reorganisierung der Phasendomänen im System hinweist. 3.61 s nach dem Sprung erscheinen die ersten Reflexe der kubischen Ia3d Phase ( $a = 104.1 \text{ \AA}$ ). Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Intensität der L<sub>α</sub> Phase wieder ab und verschwindet bei 8.17 s, während die Intensität der Ia3d Phase ein Maximum erreicht. Die Gitterkonstante der lamellaren Phase nimmt dabei um  $\sim 2 \text{ \AA}$  ab. Somit entsteht die Ia3d Phase aus der L<sub>α</sub> Phase innerhalb von  $\sim 4.56 \text{ s}$ , ca. fünfmal langsamer als nach dem Sprung von 4000 auf 1 bar bei 50 °C. Ca. 13 s nach dem Sprung erscheinen die Reflexe der P4<sub>3</sub>32 Phase ( $a = 107.5 \text{ \AA}$ ) mit einer sehr geringen Intensität. Auch hier ist der Pn3m → P4<sub>3</sub>32 Übergang sehr langsam, wahrscheinlich im Minuten-Bereich.

Das Verhalten des Systems mit 2 % cyt c ist sehr ähnlich, allerdings mit einer etwas schnelleren Kinetik der Phasenübergänge. Auch hier beginnt das System in der L<sub>α</sub>/Pn3m Phase mit der Gitterkonstanten  $a = 98.9 \text{ \AA}$  für die Pn3m und  $42.6 \text{ \AA}$  für die L<sub>α</sub> Struktur. Die Bildung der Ia3d Phase aus der lamellaren Phase beginnt 1.15 s nach dem Sprung und ist innerhalb von  $\sim 3.06 \text{ s}$  vollendet. Das ist fast doppelt so schnell wie im Fall von MO/5 % cyt c. Die ersten schwachen Reflexe der kubisch-mizellaren P4<sub>3</sub>32 Phase ( $a = 107.7 \text{ \AA}$ ) sind 0.5 s nach dem Sprung erkennbar. Der Pn3m → P4<sub>3</sub>32 Phasenübergang ist auch hier sehr langsam. Nach 17.35 s hat die Intensität der Pn3m Phase nur um  $\sim 52 \%$  abgenommen. Die Umwandlung verläuft allerdings schneller bei niedrigeren Protein-Konzentrationen. So hat sich im System mit 5 % cyt c nur 16 % der Pn3m Phase in die P4<sub>3</sub>32 Struktur nach 17.35 s umgewandelt.



**Abbildung 74:** Zeitaufgelöste Röntgendiffraktogramme von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c nach dem Drucksprung von 1500 auf 1 bar bei 35 °C.



**Abbildung 75:** Zeitabhängiger Verlauf der normierten Intensitäten (oben) und der Gitterkonstanten (unten) der P4<sub>3</sub>32, Pn3m, Ia3d und L<sub>α</sub> Phasen von MO/5 % cyt c und MO/2 % cyt c nach dem Drucksprung von 1500 auf 1 bar bei 35 °C.

### 6.2.6 Zusammenfassung

Das Modellsystem aus dem kleinen, positiv geladenen Protein cyt c und dem neutralen Lipid Monoolein wurde herangezogen, um die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den beiden Komponenten zu untersuchen. Das Protein wurde in die kubischen Kanäle von MO/Wasser eingebaut und das thermotrope und barotrope Phasenverhalten des Systems mit Hilfe von SAXS untersucht. Der Einfluss auf die Konformation des Lipids konnte mit Hilfe von FT-IR Spektroskopie studiert werden. Der Effekt der Lipid-Matrix auf die Sekundärstruktur und die Stabilität von cyt c wurde ebenfalls untersucht. Kinetische SAXS-Experimente liefern Informationen darüber, wo das Protein in dem Lipid-System lokalisiert ist. Kinetik und Mechanismus verschiedener lamellar  $\rightarrow$  kubischer Phasenübergänge wurden dabei untersucht und mit dem reinen MO/Wasser System verglichen.

Die Ia3d Struktur von MO/Wasser wird durch das Protein signifikant beeinflusst. Die Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen Protein-Oberfläche und den Lipid-Kopfgruppen führt zu einer Zunahme der Krümmung der Lipid-Schicht und Bildung einer neuen Struktur, der kubisch-mizellaren P<sub>4</sub>32 Phase (Q<sup>212</sup>). Die cyt c-Moleküle sind wahrscheinlich in den inversen Mizellen dieser Phase plaziert. Nimmt die cyt c-Konzentration im System zu, so steigt der Anteil der P<sub>4</sub>32 Phase auf Kosten der kubischen Ia3d Phase. Dagegen verschwindet die Phase, wenn das Protein oberhalb von 60 °C entfaltet. Unter Druck (bei 35 und 50 °C) wandelt sich die P<sub>4</sub>32 Phase in die kubische Pn3m Struktur um, während die Druckstabilität der P<sub>4</sub>32 Phase mit steigender cyt c-Konzentration zunimmt. Im reinen MO/Wasser System ist dagegen die Pn3m Phase oberhalb von ~20 °C nicht mehr stabil; sie wandelt sich in die Ia3d Phase um. Unter Druck wird die Pn3m Struktur weder bei 35 noch bei 50 °C beobachtet. Die Ia3d Phase wird oberhalb von ~800 bar direkt in die lamellare L<sub>α</sub> Phase umgewandelt.

Die Lipidkonformation wird durch den Einbau von Cyt c wesentlich verändert. Ein steigender Proteingehalt hat zur Folge, dass unabhängig von der Temperatur etwa 2/3 aller Carbonylgruppen über Wasserstoff-Brückenbindungen gebunden sind. Das freie Volumen der Hydroxylgruppen wird dabei nicht eingeschränkt. Die Anzahl an dg-Konformeren in der Nähe der Kopfgruppen nimmt zu, die Ordnung der Lipidketten an der polar/apolar-Grenzfläche nimmt somit ab. Die Sekundärstruktur des nativen Proteins wird durch den Einbau nicht beeinflusst. Allerdings nimmt die Entfaltungstemperatur von cyt c um ~4 °C ab, verglichen mit dem Protein in Lösung. Vermutlich kommt es bei der Entfaltung des Lysinreichen Proteins zu Wechselwirkungen zwischen den geladenen Lysin-Resten und der polaren Kopfgruppenregion des Lipids.

Die kinetischen Experimente wurden mit Hilfe der Drucksprung-Technik in Kombination mit der Röntgen-Kleinwinkelstreuung durchgeführt. Phasenübergänge im reinen MO/Wasser System und zwei proteinhaltigen Systemen mit 2 und 5 Gew.% cyt c wurden durch Sprünge von 1500 auf 1 bar und von 4000 auf 1 bar bei 35 und 50 °C im Detail studiert. Der  $L_\alpha$ /P4<sub>3</sub>32 → Ia3d/P4<sub>3</sub>32 Phasenübergang wird durch den Sprung von 1500 auf 1 bar (50 °C) induziert. In beiden MO/cyt c Systemen entsteht die kubische Ia3d Phase aus der lamellaren Phase innerhalb von ~1 s nach dem Sprung. Die koexistierende proteinhaltige P4<sub>3</sub>32 Phase bleibt dabei unbeeinflusst. Derselbe Sprung bei einer tieferen Temperatur (35 °C) induziert zwei Übergänge: Von der  $L_\alpha$  in die Ia3d Phase, und von der Pn3m in die P4<sub>3</sub>32 Phase. Die  $L_\alpha$  → Ia3d Umwandlung geschieht hier wesentlich langsamer (nach ~12 s bei MO/5 % cyt c und nach ~7 s bei MO/2 % cyt c) als bei 50 °C. Die Umwandlung im reinen Lipid-System bei 35 °C beträgt allerdings nur ~2.5 s, ist also wesentlich schneller wenn keine Lipid-Domänen mit eingebautem Protein neben der Ia3d Phase vorliegen. Faktoren, wie die Größe der Domänen und/oder Möglichkeiten der Keimbildung, können die Kinetik verlangsamen. Die P4<sub>3</sub>32 Phase entsteht sehr langsam aus der kubischen Pn3m Phase, wahrscheinlich auf einer Zeitskala von Minuten. Die Umorganisation und der Transport von Lipid und Wasser in der Dispersion während der Entstehung der neuen kubisch-mizellaren Struktur ist ein komplexer Prozess mit langen Relaxationszeiten, anders als die  $L_\alpha$  → Ia3d Umwandlung in den proteinfreien Domänen.

Die Übergänge  $L_\alpha$  → Ia3d und Pn3m → P4<sub>3</sub>32 wurden auch bei 50 °C mit Hilfe eines größeren Drucksprungs von 4000 auf 1 bar untersucht. Die kubische Ia3d Phase bildet sich, wie bereits beobachtet, aus der  $L_\alpha$  Phase. Die Kinetik bei 50 °C ist, wie erwartet, schneller als bei 35 °C. Der Übergang ist innerhalb von 2-4 s vollzogen. Die P4<sub>3</sub>32 Phase erscheint erst nach ~7 s, und bildet sich langsam aus der Pn3m Phase. Es erfolgt also keine direkte Bildung der kubisch-mizellaren Struktur aus der lamellaren  $L_\alpha$  Phase.

Ein sehr komplexes Phasenverhalten wird bei dem  $L_\alpha$  → Ia3d/P4<sub>3</sub>32 Übergang beobachtet (4000 → 1 bar bei 35 °C). Die P4<sub>3</sub>32 Phase entsteht nicht direkt aus der lamellaren Phase, sondern über mehrere Intermediate. Die planare Topologie der lamellaren Struktur kann hier nur über ein kubisches Intermediat (Pn3m) in die mizellare Struktur umgewandelt werden. Die Pn3m Phase wird nach ~2.2 s aus der  $L_\alpha$  Phase über zwei lamellare Intermediate ( $L_{x1}$ ,  $L_{x2}$ ) mit einer größeren Hydratisierung als die ursprüngliche  $L_\alpha$  Phase gebildet. Die P4<sub>3</sub>32 Phase entsteht langsam nach 7.5 s (2 % cyt c) und 10.9 s (5 % cyt c) aus der Pn3m Phase. Höhere cyt c-Konzentrationen verlangsamen diese Umwandlung. Der  $L_\alpha$  → Ia3d Übergang

---

erfolgt nach  $\sim 7-8$  s, wie bereits bei den anderen Sprüngen beobachtet, wird also nicht von den anderen Phasenumwandlungen im System beeinträchtigt.

### 6.3 Einbau von $\alpha$ -Chymotrypsin

Es wurde auch das Enzym  $\alpha$ -Chymotrypsin (chym) in die kubischen Kanäle von Monoolein (MO) eingebaut und sein Einfluss auf die Lipid-Struktur und das Phasenverhalten systematisch mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie und Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) untersucht. Der Einfluss der Lipid-Matrix auf die Sekundärstruktur von  $\alpha$ -Chymotrypsin wurde ebenfalls studiert. Es wurden MO/chym/Wasser Systeme mit 0.1, 2, 5, 7, 10 und 14 Gew.% Protein und einem konstanten Wassergehalt von 20 Gew.% (~82 mol%) untersucht. Das Verhalten von reinem MO/Wasser System wurde in Kapitel 5.1 beschrieben und wird im Folgenden als Referenz benutzt.

#### 6.3.1 Das Protein $\alpha$ -Chymotrypsin

$\alpha$ -Chymotrypsin ist ein Verdauungsenzym, das im Pankreas hergestellt wird. Es gehört zur Familie der Endopeptidasen, greift also im Inneren der Peptidkette an. Chymotrypsin trennt selektiv die Peptidbindung der L-Isomere von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan durch Hydrolyse. Es ist ein relativ großes wasserlösliches Protein (247 Reste, 25.8 kDa) mit den Abmessungen 51 Å×40 Å×40 Å. Die Sekundärstruktur von  $\alpha$ -Chymotrypsin besteht aus 50 %  $\beta$ -Faltblättern, 10 %  $\alpha$ -Helices und 40 % Schleifen und ungeordneten Strukturen (Dong 1990, Meersman 2005). Die Aktivität und die Sekundärstruktur von  $\alpha$ -Chymotrypsin kann durch Einbau in inverse Mizellen modifiziert werden (Meersman 2005, Celej 2004, Qinglong 1994, Portmann 1991, Köhling 2002).



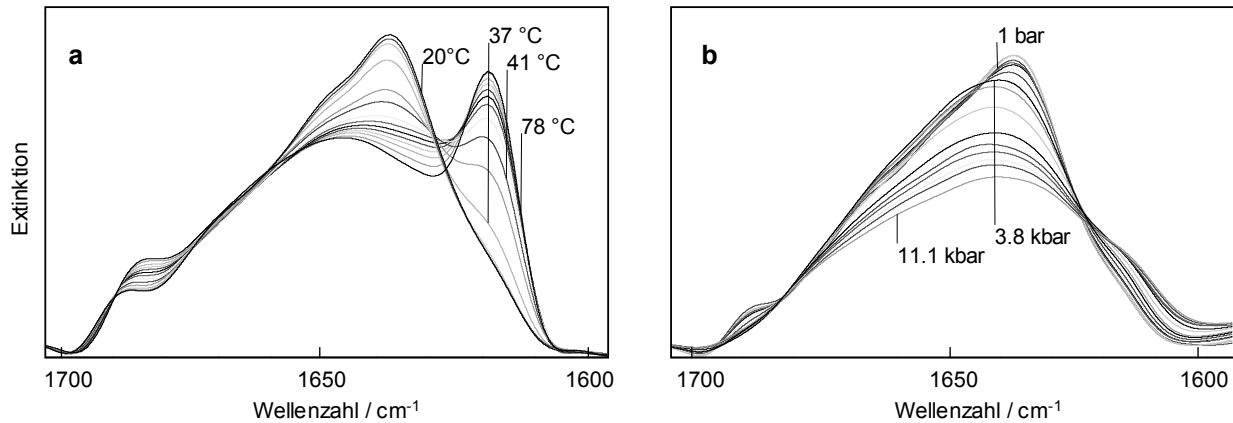
**Abbildung 76:** Röntgen-Kristallstruktur von  $\alpha$ -Chymotrypsin (Krigbaum 1968, PDB-Eintrag: 2cha).

### 6.3.2 Sekundärstruktur von $\alpha$ -Chymotrypsin in Lösung und in MO/Wasser

Die Sekundärstruktur und Stabilität von  $\alpha$ -Chymotrypsin in Lösung und in MO/Wasser wurde mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie untersucht. Wegen der starken Überlappung der Amid I'-Bande des Proteins ( $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) mit den Carbonyl-Banden von MO bei  $\sim 1740$  und  $1720 \text{ cm}^{-1}$  und einer relativ kleinen IR-Absorption von chym ist die quantitative Sekundärstruktur-Analyse hier nicht möglich. Daher wurden nur die Änderungen der Amid I'-Bande verfolgt und diskutiert.

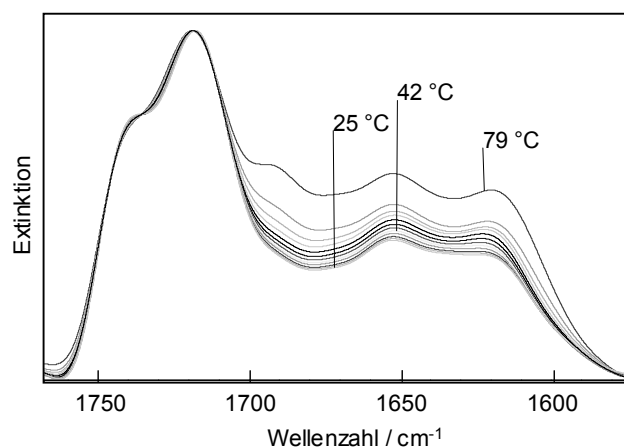
Die temperaturabhängigen Messungen wurden im Bereich von  $20$  bis  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgenommen. Die Spektren von chym in Lösung sind in Abbildung 77a als Funktion der Temperatur dargestellt. Natives chym zeigt ein Bandenmaximum bei  $\sim 1637 \text{ cm}^{-1}$ , typisch für Proteine mit einem hohen Anteil an intramolekularen  $\beta$ -Faltblatt- und ungeordneten Strukturen. Die Entfaltung zeichnet sich durch das Auftreten von zwei Banden bei  $1619$  and  $1683 \text{ cm}^{-1}$  aus, die typisch für intermolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblatt Strukturen sind und ein Indiz für Proteinaggregation sind. Die Entfaltungstemperatur  $T_{1/2}$  liegt bei  $\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Intensität der Hauptbande bei  $\sim 1637 \text{ cm}^{-1}$  nimmt während der Entfaltung ab und eine breite Bande bei  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  nimmt zu, was auf die Zunahme an ungeordneten Strukturen auf Kosten der  $\beta$ -Faltblätter hindeutet. Diese Umwandlung ist irreversibel. Das gleiche Verhalten wird auch für eine doppelt so hohe Protein-Konzentration ( $14 \text{ Gew.}\%$ ) beobachtet (hier nicht gezeigt). Somit kann eine durch zu hohe Konzentration induzierte Präzipitation des Proteins ausgeschlossen werden.

In MO/chym Systemen mit einer geringen Protein-Konzentration ( $5, 7, 10 \%$  chym) entfaltet das Protein oberhalb von  $\sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$ , erkennbar durch die Zunahme der Intensität der Aggregations-Bande bei  $\sim 1619 \text{ cm}^{-1}$ . Bei höheren Konzentrationen ( $14 \text{ Gew.}\%$ ) findet die Aggregation bereits bei Raumtemperatur statt. Die Spektren von  $14 \%$  chym in MO sind in Abbildung 78 gezeigt. Die Form der Amid I'-Bande ist ähnlich zu der von aggregiertem Protein in Lösung. Man erkennt eine Bande bei  $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ , die charakteristisch für intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ist, sowie ein Bandenmaximum bei  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ . Die Amid I'-Bande verändert sich mit weiter steigender Temperatur nicht mehr. Das Protein ist bereits bei niedrigen Temperaturen entfaltet und ändert seine Struktur nicht mehr.



**Abbildung 77:** Temperatur- und druckinduzierte Entfaltung von  $\alpha$ -Chymotrypsin in Lösung. FT-IR Spektren von  $\alpha$ -Chymotrypsin im Bereich von 1705 bis 1595 cm<sup>-1</sup> als Funktion der Temperatur (a) und des Druckes (b) (7 Gew.%, pD 7.0).

Die druckinduzierte Entfaltung von  $\alpha$ -Chymotrypsin wurde im Bereich von 1 bar bis 11 kbar bei 35 °C untersucht. In Abbildung 77b sind die Spektren von chym als Funktion des Druckes dargestellt. Die Entfaltung setzt oberhalb von 3.8 kbar ein und ist von charakteristischen Änderungen im Amid I'-Bereich begleitet. Die Breite und Intensität der Hauptbande nehmen dabei ab und das Maximum verschiebt sich zu höheren Wellenzahlen. Offensichtlich nimmt hier der Anteil an ungeordneten Strukturen auf Kosten der nativen  $\beta$ -Faltblätter zu. Darüber hinaus beobachtet man eine Zunahme der Banden-Intensität bei  $\sim 1615$  cm<sup>-1</sup>, ein Anzeichen dafür, dass unter Druck nicht-native  $\beta$ -Faltblätter gebildet werden (Meersman 2005).



**Abbildung 78:** Temperaturinduzierte Entfaltung von  $\alpha$ -Chymotrypsin in MO/Wasser. Amid I'-Bande von  $\alpha$ -Chymotrypsin und die Carbonyl-Bande von MO als Funktion der Temperatur (MO/7 Gew.% chym, 20 Gew.% Wasser, pD 7.0).

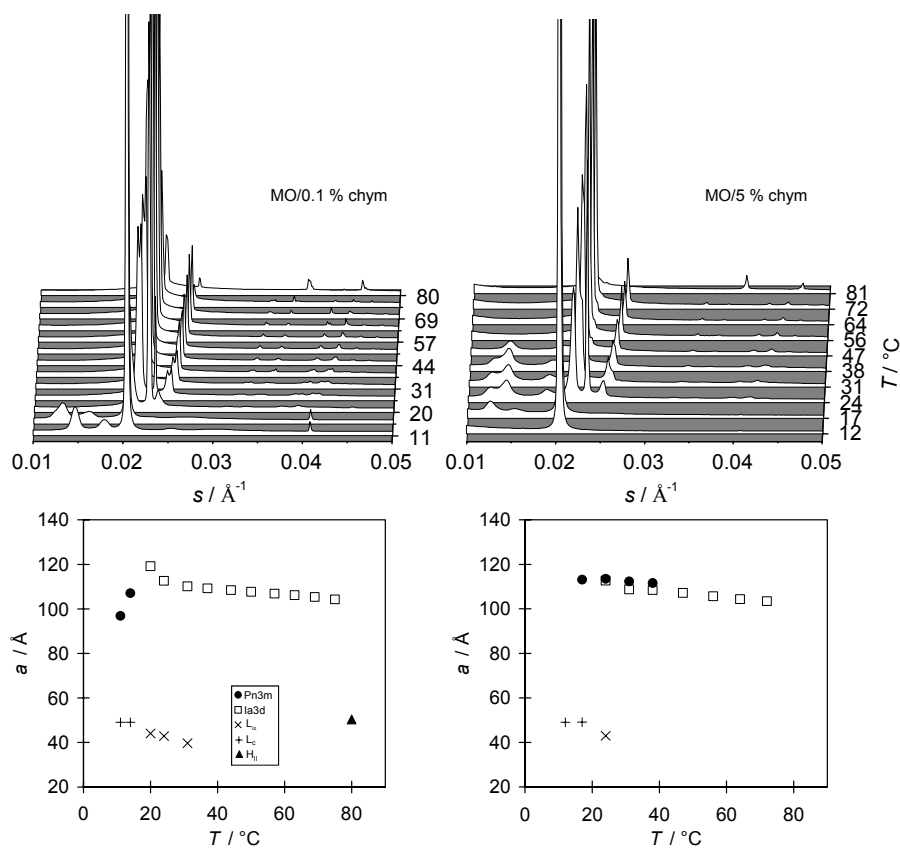
### 6.3.3 Phasenverhalten von MO/Chymotrypsin Systemen - SAXS Untersuchungen

Die temperaturabhängigen SAXS Experimente wurden im Bereich von 10 bis  $\sim 80$  °C mit einer Heizrate von 20°C/h durchgeführt. Die druckabhängigen Experimente fanden im Bereich von 1 bis 4000 bar bei 35 °C statt (Rate  $\sim 2$  kbar/h). Soweit nicht anders angegeben, beträgt die Abweichung der kubischen Gitterkonstante  $\pm 1$  Å und der lamellaren  $\pm 0.5$  Å. Es wurden MO/chym Systeme mit 0.1 bis 14 Gew.% Protein untersucht und mit dem reinen MO/Wasser System verglichen. Im Folgenden werden nur ausgewählte charakteristische Diffraktogramme gezeigt.

In Abbildung 79 (links) sind die Röntgendiffraktogramme von MO/0.1 % chym als Funktion der Temperatur dargestellt. Bei tiefen Temperaturen erkennt man die ersten beiden (110) und (111) Reflexe der Pn3m Phase ( $a = 96.8$  Å) und die (001) und (011) Reflexe der kristallinen  $L_c$  Phase ( $a = 49.1$  Å). Der Phasenübergang  $L_c/Pn3m \rightarrow L_\alpha/Ia3d$  findet bei  $\sim 20$  °C statt. Bei dieser Temperatur erscheinen die ersten sechs Reflexe der Ia3d Phase, mit einem Verhältnis der Positionen von  $\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{14}:\sqrt{16}:\sqrt{20}:\sqrt{22}$ , sowie die ersten zwei Reflexe der lamellaren  $L_\alpha$  Phase. Die  $L_\alpha$  Phase verschwindet oberhalb von 31 °C und die reine Ia3d Phase verbleibt bis  $\sim 80$  °C ( $a(35^\circ\text{C}) = 109.3$  Å). Bei höheren Temperaturen erscheinen Reflexe mit einem Verhältnis der Positionen von  $1:\sqrt{3}:2$ , typisch für eine hexagonale Phase ( $a = 50.3$  Å). Das Phasenverhalten und die Strukturparameter dieses Systems sind mit dem reinen MO/Wasser System identisch. Geringe chym-Konzentrationen beeinflussen die Lipid-Matrix also nicht.

Der Einbau von höheren Protein-Konzentrationen vergrößert den Stabilitätsbereich der kubischen Pn3m Phase. Außerdem werden zwei neue, ungeordnetere Phasen induziert, die mit der ursprünglichen Ia3d Phase koexistieren. Charakteristische Röntgendiffraktogramme und Gitterkonstanten der beteiligten Strukturen sind für das System mit 5 % chym in Abbildung 79b dargestellt. Die  $L_c/Pn3m \rightarrow L_\alpha/Ia3d$  Umwandlung vollzieht sich bei denselben Temperaturen wie im reinen System, mit der Ausnahme, dass der Bragg-Reflex bei  $0.0126$  Å<sup>-1</sup> von der Pn3m Phase ( $a = 113$  Å) auch bei höheren Temperaturen neben den Reflexen der Ia3d Phase koexistiert. Die Pn3m Phase bleibt bis  $\sim 38$  °C unabhängig von der Proteinkonzentration (also in Systemen mit 2, 5, 10 und 14 % chym) beständig. Oberhalb von  $\sim 20$  °C erscheinen gleichzeitig mit der Ia3d Phase zwei neue breite Reflexe bei  $s = 0.01425$  und  $0.01876$  Å<sup>-1</sup>. Der laterale Netzebenenabstand  $d$  des ersten Reflexes nimmt mit steigender Temperatur mit einer Rate von  $-0.04$  Å/°C ab. Der Netzebenenabstand des zweiten Reflexes nimmt wesentlich schneller ab ( $dd/dT = -0.29$  Å/°C), was darauf hinweist, dass die beiden Peaks nicht korrelieren und von zwei verschiedenen, wahrscheinlich kubischen Pn3m, Strukturen induziert werden. Da keine weiteren Ordnungen detektierbar sind, ist eine Phasen-

Zuordnung leider nicht möglich. Interessanterweise verschwinden diese Phasen oberhalb von  $\sim 40$  °C, also wenn das Protein entfaltet und aggregiert (vgl. Abschnitt 6.3.2). Die Intensität dieser Reflexe ist in MO/5 % chym am stärksten, sie werden dagegen im System MO/14 % chym nicht mehr detektiert, wahrscheinlich weil das Protein bereits bei 20 °C entfaltet und aggregiert ist, wie FT-IR Ergebnisse zeigen. Allerdings kann die Röntgenbeugung keinen Aufschluss darüber geben, ob es zu einer Phasentrennung im System kommt oder ob der Einbau von Aggregaten in die kubische Ia3d Phase erfolgt.



**Abbildung 79:** Röntgendiffraktogramme (oben) und Gitterkonstanten der verschiedenen Strukturen (unten) von MO/0.1 % chym und MO/5 % chym als Funktion der Temperatur (pD 7.0, 20 Gew.% Wasser).

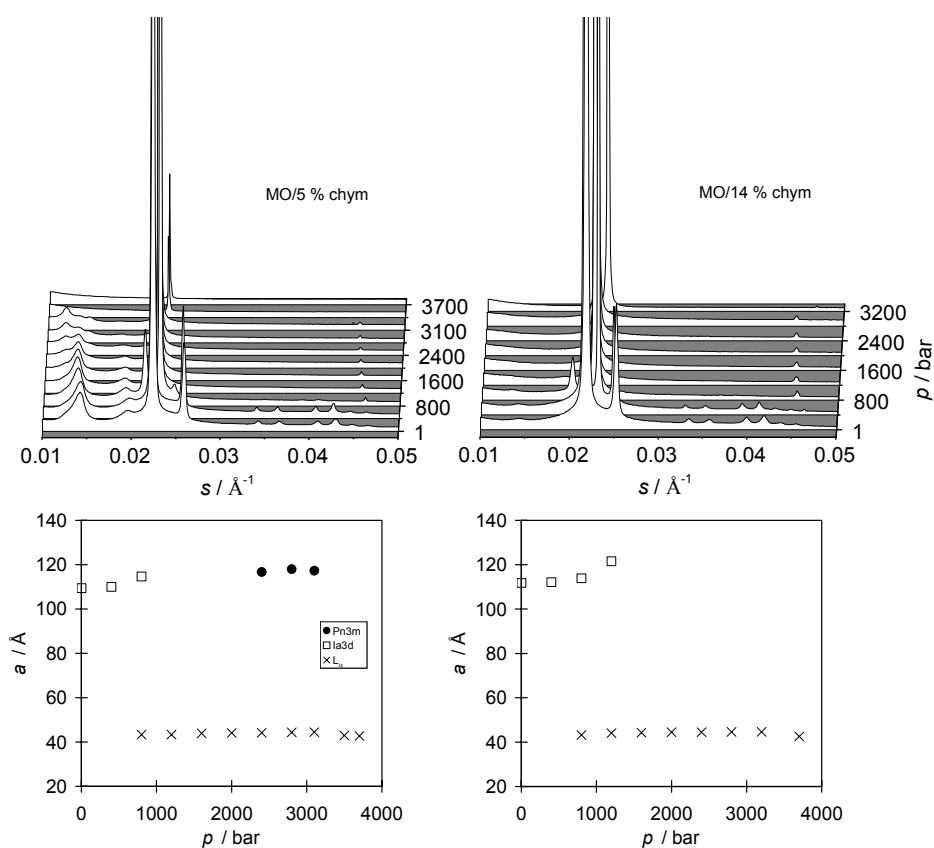
Die Gitterkonstante der koexistierenden kubischen Ia3d Phase nimmt mit steigendem Proteingehalt in der Probe etwas ab: Von 108.6 Å im reinen MO/Wasser System über 108.4 Å bei 5 % chym, 106.1 Å bei 10 % chym auf 104.4 Å bei 14 % chym ( $T = 37$  °C). Möglicherweise wird die Ia3d Phase durch den Einbau von chym dehydratisiert. Der Volumenanteil an Wasser in der Ia3d Phase kann aus der Lipidlänge  $l$  und der Gitterkonstante der Ia3d Phase berechnet werden (Gl. 18). Da die Lipidlänge nur für reine Phasen berechnet werden kann, also nur wenn das System sich in einem Einphasen-Gebiet befindet, wird hier näherungsweise die Lipidlänge des MO/Wasser Systems verwendet. Der Wasser-Anteil der Ia3d Phase nimmt mit

zunehmender Protein-Konzentration etwas ab, von nominal  $\phi_{w,\text{total}} = 0.17$  in dem reinen MO/Wasser System auf 0.15 in MO/14 % chym.

Bei den gegebenen Bedingungen kann das native  $\alpha$ -Chymotrypsin nicht im Exzess-Wasser gelöst vorliegen, da bei 20 Gew.% Wasser kein Wasser-Überschuss vorhanden ist. Die Kanäle der kubischen Ia3d Phase mit einem Durchmesser von  $\sim 20\text{-}21$  Å sind zu eng für das  $\alpha$ -Chymotrypsin-Molekül mit einem Durchmesser von  $\sim 36\text{-}40$  Å (PDB-Eintrag: 2cha). Infolge dessen wird das Protein in die kubischen Kanäle der Pn3m Phase eingebaut, die einen größeren lateralen Netzebenenabstand und größere Wasserkanäle aufweist als die Ia3d Struktur. Die Temperaturerhöhung führt zur Bildung von weiteren kubischen Strukturen (wahrscheinlich Pn3m), die Protein-Moleküle aufnehmen können.

Das druckabhängige Phasenverhalten der MO/chym Systeme mit 5, 10 und 14 % Protein wurde im Bereich von 1 bar bis  $\sim 3.5$  kbar bei 35 °C untersucht. In Abbildung 80 sind die Röntgendiffraktogramme und die Gitterkonstanten vier verschiedener Phasen als Funktion des Druckes dargestellt.

Der Ia3d  $\rightarrow$  L $_{\alpha}$  Phasenübergang findet bei  $1.0 \pm 0.2$  kbar statt, ähnlich wie im reinen System, und ist unabhängig von der Protein-Konzentration der Probe. Die Reflexe der neuen Struktur im Kleinwinkelbereich bleiben unbeeinflusst bis  $\sim 2.4$  kbar. Im System MO/5 % chym wandelt sich diese Struktur in die kubische Pn3m Phase ( $a = 117$  Å) um. Diese verschwindet oberhalb von  $\sim 3.1$  kbar und eine reine L $_{\alpha}$  Phase verbleibt. Offensichtlich hat die Pn3m Phase ein kleineres partielles Lipid-Volumen als die neue, wahrscheinlich auch kubische, Struktur und wird deswegen unter Druck bevorzugt gebildet. Zum Vergleich wird im reinen MO/Wasser System keine Pn3m Phase unter Druck gebildet. Wenn das Protein bereits entfaltet ist, wie im Fall von MO/14 % chym, wird keine Pn3m Struktur detektiert. Der Volumenanteil von Wasser in der L $_{\alpha}$  Phase nimmt oberhalb von 3.5 kbar um  $\sim 18$  % ab ( $\phi_w = 0.14$ ), wahrscheinlich als Folge der druckinduzierten Entfaltung von  $\alpha$ -Chymotrypsin, die oberhalb von 3.8 kbar stattfindet und Wasser für die Hydratation der größeren SASA benötigt.



**Abbildung 80:** Röntgendiffraktogramme (oben) und Gitterkonstanten der Ia3d,  $L_\alpha$  und Pn3m Phasen (unten) von MO/5 % chym und MO/14 % chym als Funktion des Druckes (pD 7.0, 20 Gew.% Wasser).

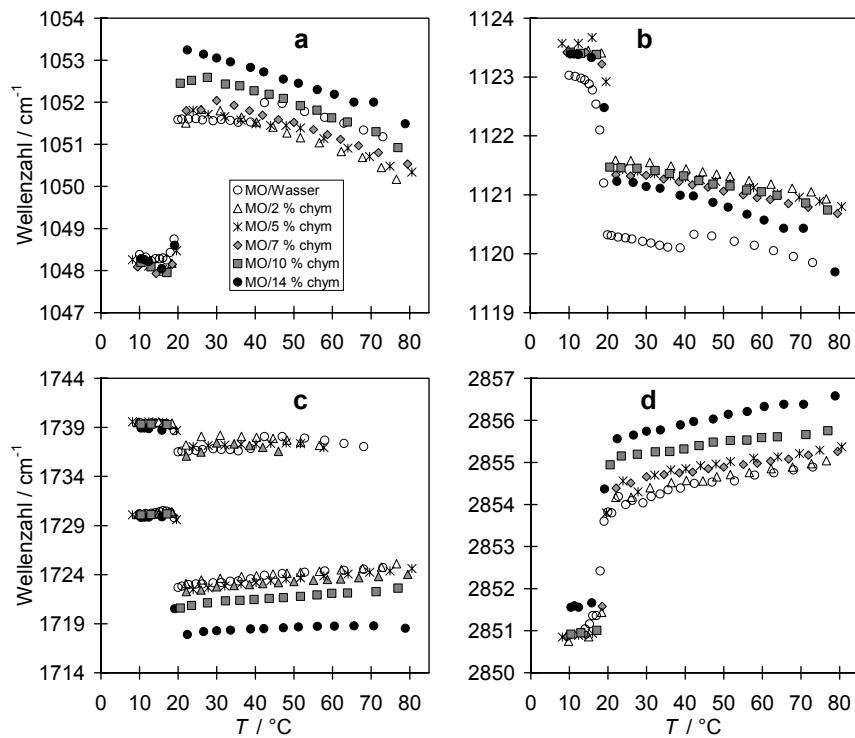
### 6.3.4 Lipidkonformation in MO/ $\alpha$ -Chymotrypsin Systemen - FT-IR Untersuchungen

Der Einfluss von  $\alpha$ -Chymotrypsin auf die Konformation von MO wird für die Systeme mit 2, 5, 7, 10 und 14 Gew.% Protein untersucht und mit dem reinen MO/Wasser System verglichen (vgl. Abschnitt 5.1.4). Temperaturabhängige Verschiebungen der Schwingungsfrequenzen der beiden Hydroxyl-Gruppen,  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$  und  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ , der Carbonyl-Gruppe  $\nu(\text{C=O})$  und der Methylen-Gruppe  $\nu_s(\text{CH}_2)$  von MO sind in Abbildung 81 dargestellt. Im Fall der terminalen C-OH Gruppe beobachtet man in Systemen mit 2-7 % chym, ähnlich wie im reinen System, eine Blau-Verschiebung der Wellenzahl von 1048 auf 1051.5  $\text{cm}^{-1}$  bei  $\sim 20^\circ\text{C}$ . Hier „schmilzt“ die kristalline  $L_c$  Phase, und es entsteht die flüssig-kristalline  $L_\alpha$  Phase mit einer weniger geordneten Packung. Die zunehmende Mobilität der Hydroxylgruppen führt zu einer Zunahme der repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Gruppen und folglich zu einer Zunahme der Schwingungsfrequenz. Der  $L_\alpha/\text{Ia3d} \rightarrow \text{Ia3d}$  Phasenübergang bei  $\sim 35^\circ\text{C}$  ist in den proteinhaltigen Systemen nicht detektierbar. Bei höheren Chymotrypsin-Konzentrationen (10, 14 %) beobachtet man eine signifikante Blau-Verschiebung der

Wellenzahl in der flüssig-kristallinen Phase. Offensichtlich wechselwirkt das Protein mit der Kopfgruppenregion von MO, was zu einer Zunahme der repulsiven Wechselwirkungen in diesem Bereich führt.

Die Wellenzahl der mittleren Hydroxyl-Gruppe verschiebt sich im reinen System von  $1123\text{ cm}^{-1}$  in der  $L_c/Pn3m$  auf  $1120\text{ cm}^{-1}$  in der  $L_\alpha/Ia3d$  Phase und anschließend auf  $1120.3\text{ cm}^{-1}$  in der  $Ia3d$  Phase. Diese Gruppe liegt in der Mitte der Kopfgruppenregion und reagiert deswegen anders auf eine strukturelle Umorganisation als die terminale Hydroxyl-Gruppe. In der kubischen  $Ia3d$  Phase wird das freie Volumen der mittleren Hydroxyl-Gruppe durch die Krümmung der Oberfläche eingeschränkt. Dadurch steigt die Polarität der Umgebung und die Schwingungsfrequenz nimmt ab. Darüber hinaus führt die Wasserpenetration in die Kopfgruppen-Region der Lipidschicht und die daraus resultierende Hydratisierung der vorher verborgenen C-OH Gruppen zu einer Abnahme der Schwingungsfrequenz. Der Einbau von Chymotrypsin führt allerdings zu einer Blau-Verschiebung der Wellenzahl im ganzen Temperaturbereich. Offensichtlich nehmen die repulsiven Wechselwirkungen auch im Bereich der mittleren Hydroxyl-Gruppe zu, ähnlich wie im Fall der terminalen C-OH Gruppe. Die temperatur- und proteinabhängige Verschiebung der Carbonyl-Banden bei  $\sim 1737$  („freie“ C=O Gruppe) und  $\sim 1723\text{ cm}^{-1}$  (hydratisierte C=O Gruppe) ist in Abbildung 80c gezeigt. Unabhängig von der Chymotrypsin-Konzentration beobachtet man eine Rot-Verschiebung der beiden Banden bei  $\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$  (Phasenübergang  $L_c/Pn3m \rightarrow L_\alpha/Ia3d$  bzw.  $L_c/Pn3m \rightarrow L_\alpha/Pn3m/Ia3d$ ), die darauf hindeutet, dass die Kopfgruppen stärker hydratisiert bzw. durch Wasserstoffbrücken-Bindungen stärker gebunden werden. Eine zunehmende Proteinkonzentration in MO/Wasser führt zu einer signifikanten Rot-Verschiebung der Bande bei  $\sim 1723\text{ cm}^{-1}$  um  $\sim 5\text{ cm}^{-1}$  für 14 Gew.% chym oberhalb von  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Offensichtlich werden dabei die Carbonyl-Gruppen zunehmend H-Brücken-gebunden. Allerdings kann hier nicht zwischen intramolekularen (C-OH $\cdots$ O=C) und intermolekularen (Protein-Lipid, Wasser-Lipid) Wasserstoff-Brückenbindungen unterschieden werden.

Die Konformation und Packung der Lipidketten kann anhand der Methylen-Streckschwingung untersucht werden (Abb. 81d). Im reinen MO/Wasser System nimmt die Wellenzahl der Schwingung von  $\sim 2851\text{ cm}^{-1}$  in der geordneten  $L_c/Pn3m$  Phase auf  $\sim 2854\text{ cm}^{-1}$  in der ungeordneten  $Ia3d$  Phase zu. Die zunehmende Anzahl an *dg*-Konformere in den Ketten der flüssig-kristallinen Phase führt zu steigenden repulsiven Wechselwirkungen in der hydrophoben Region der Lipid-Schicht und einer Zunahme der Schwingungsfrequenz. Der Einbau von chym führt zu einer Zunahme der Konformationsunordnung der Lipidketten, wie man an dem stetigen Anstieg von  $\tilde{\nu}_s(\text{CH}_2)$  beobachten kann.



**Abbildung 81:** Einfluss von  $\alpha$ -Chymotrypsin auf die hydrophile und hydrophobe Region von MO. Temperaturabhängige Verschiebung der Wellenzahl der Schwingungen: (a)  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$ , (b)  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ , (c)  $\nu(\text{C=O})$ , (d)  $\nu_s(\text{CH}_2)$ .

### 6.3.5 Zusammenfassung

Hier wurde die Wechselwirkung von  $\alpha$ -Chymotrypsin mit Monoolein untersucht. Dabei wurde das Enzym in die Wasser-Kanäle von MO eingebaut und das Phasenverhalten und die strukturellen Eigenschaften von MO mit Hilfe von SAXS und der FT-IR Spektroskopie studiert. Zusätzlich wurde die Stabilität und die Sekundärstruktur von  $\alpha$ -Chymotrypsin in der Lipid-Matrix FT-IR-spektroskopisch untersucht. Die SAXS-Daten zeigen, dass eine neue, wahrscheinlich kubische  $\text{Pn}3\text{m}$ , Phase entsteht, die die Protein-Moleküle einschließt und neben der ursprünglichen  $\text{Ia}3\text{d}$  Phase vorliegt. Der Vergleich der FT-IR Ergebnisse für die Kopfgruppen- und die Alkylkettenregion von MO/chym (oberhalb von 20  $^{\circ}\text{C}$ ) zeigt, dass die molekulare Struktur von MO durch den Einbau von  $\alpha$ -Chymotrypsin signifikant geändert wird. Die Carbonyl-Gruppen werden stärker Wasserstoffbrücken-gebunden, die Glycerol OH-Gruppen haben eine höhere Mobilität und die Ordnung der Alkylketten nimmt ab. Offensichtlich bindet das Protein an die Oberfläche von MO und restrukturiert die Lipid-Matrix. Das Protein wird dadurch ebenfalls beeinflusst. Bei hohen Chymotrypsin-Konzentrationen in MO/Wasser wird es destabilisiert und aggregiert schließlich.

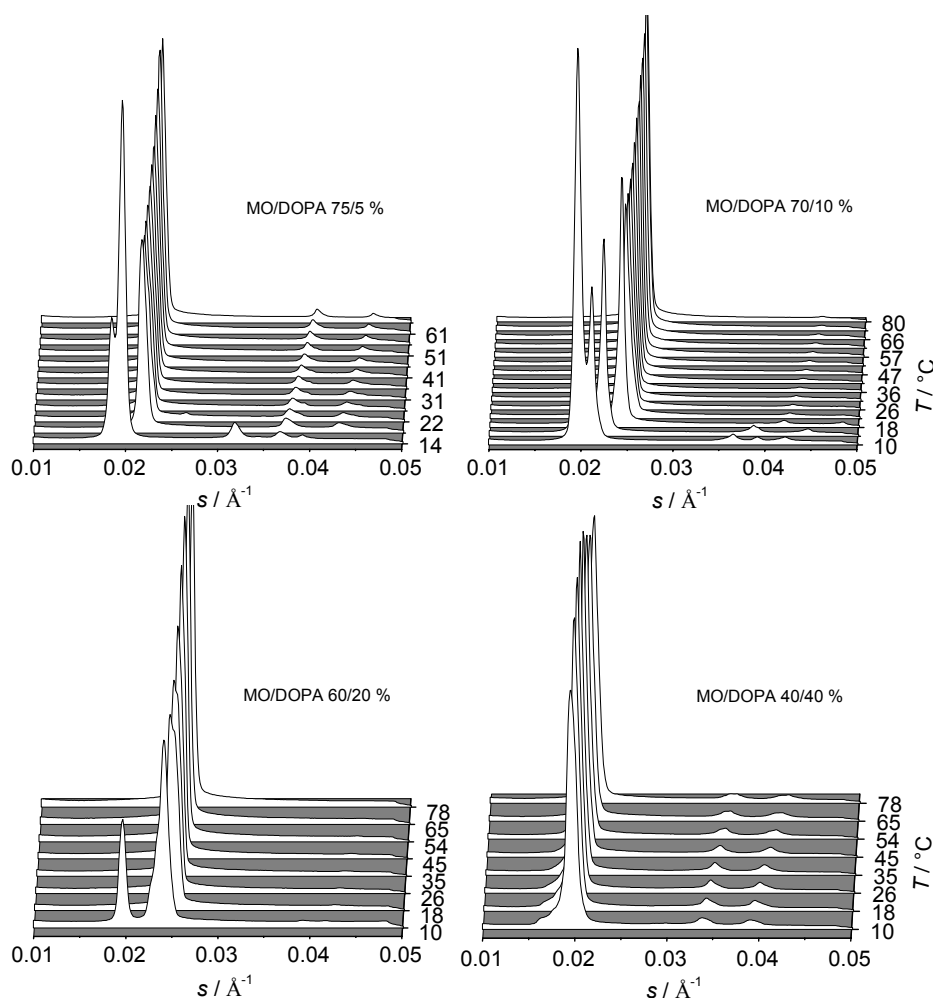
## 7 Das MO/DOPA/Wasser System

In diesem Kapitel wird der Einfluss von 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphat ( $\text{Na}^+$ -Salz) (DOPA) auf das Phasenverhalten und die strukturellen Eigenschaften von MO untersucht. DOPA ist ein positiv geladenes (bei pH 7) Phospholipid, das wegen seiner Struktur (zwei ungesättigte Oleoyl-Ketten, kleine Kopfgruppe) packungsfrustriert ist. Wässrige DOPA-Dispersionen bilden daher spontan eine invertiert hexagonale Phase  $H_{II}$  bis ~50 Gew.% Wasser, und eine lamellare  $L_{\alpha}$  Phase ab ~50 Gew.% Wasser. Kubische Phasen können durch Zugabe verschiedenartiger Lipide modifiziert und sogar zerstört werden. Das kann gewollt passieren, wie z. B. in den pharmazeutischen Formulierungen, oder ungewollt, z. B. bei der Protein-Kristallisation (Chupin 2003, Ai 2000). Das Verhalten von MO/DOPA Systemen mit 5, 10, 20 und 40 Gew.% DOPA (Molverhältnis MO:DOPA = 30, 14, 6 und 2) und einem konstanten Wassergehalt von 20 Gew.% wurden mit Hilfe von SAXS und FT-IR Methoden untersucht und mit dem reinen MO/Wasser System verglichen (Kap. 5.1).

### 7.1.1 Phasenverhalten von MO/DOPA - SAXS Untersuchungen

In Abbildung 82 sind Röntgendiffraktogramme von MO/DOPA Systemen mit 5, 10, 20 und 40 Gew.% DOPA als Funktion der Temperatur dargestellt. Im reinen MO/Wasser System liegen unterhalb von ~20 °C zwei Phasen vor: Die lamellare  $L_c$  und die kubische  $Pn3m$  Phase. Oberhalb von ~20 °C bildet sich die kubische  $Ia3d$  Struktur neben der lamellaren  $L_{\alpha}$  Phase. Im Temperaturbereich zwischen ~35 und 80 °C liegt eine reine  $Ia3d$  Phase vor, die oberhalb von 80 °C in die hexagonale Phase ungewandelt wird. Die Anwesenheit von bereits 5 % DOPA im System verändert drastisch das Phasenverhalten von MO. Bei tiefen Temperaturen (unterhalb von ~20 °C) beobachtet man in Systemen mit 5, 10 und 20 % DOPA die (001) und (011) Reflexe der lamellaren  $L_c$  Phase bei  $s = 0.0196$  und  $0.0392 \text{ \AA}^{-1}$  sowie die (10), (11) und (20) Reflexe der hexagonalen Phase  $H_{II}$  bei  $s \approx 0.0216, 0.0373$  und  $0.0430 \text{ \AA}^{-1}$ . Oberhalb von ~20 °C verschwindet die lamellare Struktur und die Reflexe der hexagonalen Phase verschieben sich zu größeren Winkeln. Die hexagonale Gitterkonstante  $a_{HII}$  beträgt 53 Å in MO/5 % DOPA und 47 Å in MO/10 % und 20 % DOPA (bei 22 °C). Mit steigender Temperatur nimmt die Gitterkonstante aufgrund der wachsenden Anzahl an *gauche*-Konformere in den Kohlenwasserstoffketten etwas ab ( $da/dT = -0.06 \text{ \AA}/^{\circ}\text{C}$ ). Alle hexagonalen Gitterkonstanten und die daraus berechneten Wasserkanal-Radien sind in Tabelle 22 für 22, 35 und 50 °C aufgelistet. Das MO/40 % DOPA System liegt bereits bei 10 °C in der hexagonalen Phase mit einer Gitterkonstante  $a_{HII} = 59.2 \text{ \AA}$  vor. Mit steigender Temperatur

nimmt die Gitterkonstante etwas ab, ähnlich wie in den anderen MO/DOPA Systemen ( $da/dT = -0.07 \text{ \AA}/^\circ\text{C}$ ). In keinem der Systeme wird eine kubische oder lamellare  $L_\alpha$  Struktur gebildet. Das ist eher ungewöhnlich, da die starken elektrostatischen Abstossungskräfte in der Kopfgruppenregion von MO/DOPA die lamellare  $L_\alpha$  Phase stabilisieren und den Phasenübergang  $Ia3d \rightarrow L_\alpha$  induzieren sollten. Offensichtlich reichen schon 3 mol% DOPA im Lipid aus, um eine hexagonale Phase zu stabilisieren. Wahrscheinlich wird die Ladung durch die intermolekularen Wechselwirkungen (H-Brückenbindungen zwischen der Phosphat-Gruppe von DOPA und den C-OH Gruppen von MO) geschwächt, und die Krümmungsfrustration der Alkylketten von DOPA kann schließlich in der invertiert hexagonalen Phase relaxieren.



**Abbildung 82:** Röntgendiffraktogramme von MO/DOPA Systemen mit 5, 10, 20 und 40 Gew.% DOPA (pD 7.0, 20 Gew.% Wasser).

**Tabelle 22:** Hexagonale Gitterkonstanten und Wasserkanal-Radien von MO/DOPA Systemen bei 22, 35 und 50 °C (Wassergehalt 20 Gew.%, Abweichung der Gitterkonstante und der Radien  $\pm 0.5 \text{ \AA}$ ).

System		22 °C		35 °C		50 °C	
MO/DOPA (Gew.%)	MO:DOPA (mol/mol)	$a_{\text{HII}} / \text{\AA}$	$r_w / \text{\AA}$	$a_{\text{HII}} / \text{\AA}$	$r_w / \text{\AA}$	$a_{\text{HII}} / \text{\AA}$	$r_w / \text{\AA}$
75/5	30	53.1	11.6	52.1	11.4	51.2	11.2
70/10	14	47.3	10.4	46.0	10.1	45.0	9.9
60/20	6	47.1	10.4	46.0	10.1	44.9	9.9
40/40	2	58.6	13.0	57.4	12.7	56.0	12.4

### 7.1.2 Lipidkonformation in MO/DOPA - FT-IR Untersuchungen

Die strukturellen Eigenschaften, wie die Konformation und Ordnung der Alkylketten und die Hydratation und Konformation der Kopfgruppen der MO/DOPA/Wasser Systeme wurden FT-IR-spektroskopisch untersucht. Die temperaturabhängigen Messungen wurden in einem Temperaturbereich zwischen 10 und 85 °C durchgeführt.

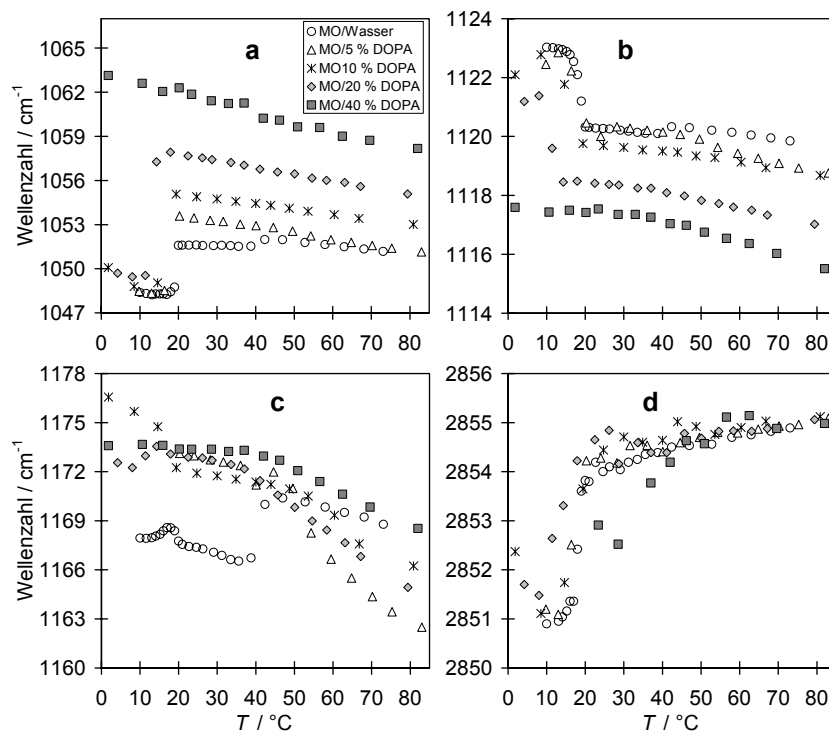
Die temperatur- und DOPA-abhängige Verschiebung der Schwingungsfrequenzen der beiden Hydroxyl-Gruppen  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$  und  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ , der Ester-Gruppe  $\nu_{as}(\text{CO-O})$ , und der Methylen-Gruppe  $\nu_s(\text{CH}_2)$  von MO sind in Abbildung 83 dargestellt. Die terminale Hydroxyl-Gruppe von MO wird durch die Anwesenheit von DOPA drastisch beeinflusst. Die Wellenzahl der Schwingung verschiebt sich kontinuierlich zu höheren Werten mit steigender DOPA-Konzentration; von  $\sim 1051 \text{ cm}^{-1}$  im reinen MO/Wasser System auf  $\sim 1062 \text{ cm}^{-1}$  in MO/40 % DOPA (20 °C). Im Fall der mittleren C-OH Gruppe beobachtet man eine Rot-Verschiebung der Wellenzahl von  $\sim 1120 \text{ cm}^{-1}$  in reinem MO/Wasser System auf  $\sim 1117 \text{ cm}^{-1}$  in MO/40 % DOPA. Die terminale Hydroxyl-Gruppe von MO erfährt in der hexagonalen Phase starke repulsive Wechselwirkungen, die viel stärker sind als in der kubischen Ia3d Phase. Wahrscheinlich wechselwirken die C-OH Gruppen mit der Phosphat-Gruppe von DOPA und ändern dadurch ihre Konformation.

Die Schwingungsfrequenz der Ester-Gruppe nimmt im ganzen Temperaturbereich stark zu, und zwar unabhängig von der DOPA-Konzentration. Offensichtlich nimmt der Anteil der *dg*-Konformere in der Nähe der Kopfgruppenregion zu, was charakteristisch für die hexagonale Phase ist.

Die Analyse der C=O Streckschwingung wird herangezogen, um die Hydratisierung der Carbonyl-Gruppen zu untersuchen. Die Wellenzahl der C=O Gruppe, die nicht wasserstoffgebunden ist, liegt in MO/DOPA Systemen bei  $\sim 1742$  („freie“ C=O Gruppe) und die der wasserstoffgebunden Gruppe liegt bei  $\sim 1723 \text{ cm}^{-1}$  (hydratisierte C=O Gruppe). Die

Banden werden mit zwei Gauß-Lorenz-Funktionen angepasst und die Flächenanteile der beiden Komponenten bestimmt. In Tabelle 23 sind die Flächenanteile der Bande bei  $\sim 1723 \text{ cm}^{-1}$  in verschiedenen MO/DOPA Systemen bei 22, 35 und 50 °C aufgelistet. Mit zunehmender DOPA-Konzentration werden zunehmend weniger C=O Gruppen durch Wasserstoffbrücken-Bindungen gebunden. In MO/40 % DOPA sind nur noch  $\sim 67$  % der Carbonyl-Gruppen hydratisiert. Das ist 8 - 10 % weniger als im reinen MO/Wasser System. Die stärkere Oberflächen-Krümmung und kleinere Querschnittsfläche der Kopfgruppen in der hexagonalen Phase verhindert wahrscheinlich die Wasserpenetration in die polare Region von MO/DOPA. Darüber hinaus werden die C=O Gruppen durch die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen der Phosphat-Gruppe von DOPA und den Hydroxyl-Gruppen von MO weitgehend abgeschirmt.

Eine quantitative Betrachtung der Ketten-Konformation wird durch Analyse der Methylen-Kippschwingung,  $\omega(\text{CH}_2)$ , ermöglicht. In MO/DOPA ist die Schwingung in drei Banden, bei 1368, 1355 und 1341  $\text{cm}^{-1}$ , aufgespaltet, die den *kink* (*gtg*), *double-gauche* (*dg*) und *end-gauche*  $\text{CH}_2$ -Konformeren zugeordnet werden können. Diese Banden werden mit gemischten Gauß-Lorenz-Funktionen angepasst und die Flächenanteile ermittelt. Zur Normierung wird die Intensität der konformationsunabhängigen *umbrella*  $\delta(\text{CH}_3)$ -Schwingung bei 1378  $\text{cm}^{-1}$  verwendet. In Tabelle 24 sind die Anteile von *dg*-Konformeren in der Alkylkette bei 22, 35 und 50 °C für alle MO/DOPA Systeme aufgelistet. Bei 22 °C nimmt der Anteil von 23 % in reinem System auf  $\sim 37$  % in MO/DOPA Systemen zu. Bei 35 und 50 °C liegt der *dg*-Anteil auf dem selben Niveau wie im reinen MO/Wasser System in der kubischen Ia3d Phase ( $\sim 44$  bzw. 46 %). Die Ordnung der Ketten in der hexagonalen Phase ist also ähnlich wie in der kubischen Ia3d Phase. Der temperaturabhängige Verlauf der Methylen-Schwingung bei  $\sim 2855 \text{ cm}^{-1}$  (Abb. 83d) bestätigt diese Beobachtung. Die Schwingungsfrequenz bleibt oberhalb von 20 °C nahezu konstant für alle Systeme, was darauf hinweist, dass der Anteil der *dg*-Konformere in der Alkylkette in der hexagonalen Phase ähnlich ist wie in der kubischen Ia3d Phase.



**Abbildung 83:** Einfluss von DOPA auf die hydrophile und hydrophobe Region von MO. Temperaturabhängige Verschiebung der Wellenzahl der Schwingungen: (a)  $\nu_s(\text{C-OH } sn3)$ , (b)  $\nu_s(\text{C-OH } sn2)$ , (c)  $\nu_{as}(\text{CO-O})$ , (d)  $\nu_s(\text{CH}_2)$ .

**Tabelle 23:** DOPA-Einfluss auf die hydrophile Region von MO. Flächenanteile hydratisierter ( $1722 \text{ cm}^{-1}$ ) C=O Gruppen in verschiedenen MO/DOPA Systemen (Wassergehalt: 20 Gew.%, Abweichung:  $\pm 0.02$ ).

System	Hydratisierung bei		
	22 °C	35 °C	50 °C
MO/0 % DOPA	0.76	0.73	0.73
MO/5 % DOPA	0.72	0.72	0.71
MO/10 % DOPA	0.71	0.71	0.71
MO/20 % DOPA	0.69	0.70	0.70
MO/40 % DOPA	0.68	0.67	0.66

**Tabelle 24:** DOPA-Einfluss auf die hydrophobe Region von MO. Anteile der *dg*-Konformere in der Alkylkette in verschiedenen MO/DOPA Systemen (Wassergehalt: 20 Gew.%). Die Anteile stellen normierte integrale Intensitäten der  $1355 \text{ cm}^{-1}$  Bande dar und wurden durch die Analyse der  $\omega(\text{CH}_2)$  Absorptionsbande von MO bestimmt (Abweichung:  $\pm 0.04$ ).

System	<i>dg</i> -Anteil bei 22 °C	<i>dg</i> -Anteil bei 35 °C	<i>dg</i> -Anteil bei 50 °C
MO/0 % DOPA	0.23	0.43	0.46
MO/5 % DOPA	0.35	0.45	0.42
MO/10 % DOPA	0.37	0.44	0.48
MO/20 % DOPA	0.39	0.44	0.48
MO/40 % DOPA	0.37	0.42	0.46

### 7.1.3 Zusammenfassung

Die kubische Struktur von MO/Wasser wird bereits durch Zugabe von 5 Gew.% DOPA (Molverhältnis MO:DOPA = 30) zerstört. Wahrscheinlich wird die Ladung von DOPA durch die intermolekulare Wechselwirkungen mit den Kopfgruppen der MO-Moleküle abgeschirmt und die Krümmungsfrustration der Alkylketten von DOPA relaxiert bei der Bildung einer invertiert hexagonalen Phase. Durch die Wechselwirkungen mit der Phosphat-Gruppe von DOPA werden die Eigenschaften der Kopf-Gruppen von MO stark beeinflusst, die Mobilität der Hydroxyl-Gruppen drastisch eingeschränkt und die Hydratisierung der Carbonyl-Gruppen herabgesetzt. Die Konformations-Unordnung der Alkylketten bleibt in der hexagonalen Phase, ähnlich wie in der kubischen Ia3d Phase, bestehen.

## 8 Zusammenfassung der Arbeit

Die Protein-Protein-, Lipid-Lipid- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen in biologischen Systemen sind sehr komplex und vorwiegend symbiotisch. Das zentrale Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, zum verbesserten Verständnis solcher Interaktionen beizutragen.

Die Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden in Hinblick auf die pathogene Protein-Aggregation am Beispiel eines Prion-Proteins, an Transthyretin und Insulin untersucht. Dabei wurden unterschiedliche physikalische und physiologische Bedingungen, wie z. B. der Einfluss des Milieus, von Mutationen, der Temperatur und des Druckes auf die Stabilität des Proteins und auf die Tendenz zur Amyloidbildung mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie untersucht und der mögliche Mechanismus der Aggregation diskutiert.

Im Fall der Prionenkrankheiten liegt der pathologische Effekt darin, dass das fehlgefaltete Protein Aggregatsablagerungen bildet und so seine schädliche Wirkung im Gehirn ausübt. Dem Krankheitsausbruch geht die Umwandlung des Prion-Proteins von seiner natürlichen, zellulären Form in eine krankhafte Form voraus. Im Unterschied zu anderen Amyloidosen treten diese auch als infektiöse Formen auf. In Rahmen dieser Arbeit wurden Szenarien der thermisch- und druckinduzierten Aggregation des *wild-type* Prion-Proteins PrP<sup>23-231</sup> und seiner N-terminal trunkeierten Mutanten PrP<sup>Δ51-90</sup> und PrP<sup>Δ32-121</sup> untersucht und verglichen. Die aggregierte Form des Proteins PrP<sup>Sc</sup> zeichnet sich durch einen extrem hohen Anteil an nicht-nativen  $\beta$ -Faltblättern aus, die bei der temperaturinduzierten Entfaltung aus  $\alpha$ -Helices und ungeordneten Strukturen gebildet werden. Dabei ist die Morphologie von  $\beta$ -Faltblättern zeitabhängig: Ältere Aggregate weisen eine wesentlich dichtere Packung mit wenigen internen Kavitäten auf. Die Stabilität von PrP nimmt mit Verkürzung des N-Terminus ab. Der Beitrag der  $\alpha$ -helikalen Strukturen an der Bildung von  $\beta$ -Faltblättern nimmt dabei zu, da durch die Trunkierung der Anteil der ungeordneten Strukturen im nativen Protein kleiner wird. Die druckinduzierte Entfaltung von Mutanten unterscheidet sich stark von *wild-type* PrP, was auf Unterschiede in der Packung und Hydratation zurückzuführen ist. Überraschenderweise aggregieren Mutanten rasch nach der druckinduzierten Entfaltung im Unterschied zu *wild-type* PrP. Offensichtlich stabilisiert der ungeordnete N-Terminus die globuläre C-Domäne von PrP, möglicherweise durch schwache Wechselwirkungen mit der Protein-Oberfläche und durch eine Art sterische Abschirmung. PrP bildet außerdem Komplexe mit DNA-Fragmenten, wobei seine Struktur und Stabilität beeinflusst werden kann und die Aggregation katalysiert wird. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Sequenz-

unspezifische Bindung der C-terminalen Domäne und um eine spezifische Bindung am N-Terminus.

Transthyretin ist ebenfalls ein amyloidogenes Protein, das in seiner aggregierten Isoform eine degenerative Wirkung im Organismus ausübt. In dieser Arbeit wurden die Änderungen der Sekundärstruktur von *wild-type* TTR während der druck- und temperaturinduzierten Entfaltung und Aggregation bei unterschiedlichen pD-Werten studiert. Die Ergebnisse zeigen, dass während der thermischen Entfaltung ein Teil der nativen intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter in nicht-native intermolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblätter umgewandelt wird, die allerdings keine fibrilläre Morphologie aufweisen. Bei der druckinduzierten Entfaltung entsteht ein partiell entfaltetes Intermediat, das nach der Rückkehr zu Normaldruck unter Bildung von parallelen  $\beta$ -Faltblättern aggregiert. Die Aggregation ist stark pH- und temperaturabhängig. Am schnellsten und intensivsten findet die Aggregation bei 37 °C und pD 5.0 statt, während bei 5 °C das Intermediat bestehen bleibt. Ein Teil von Transthyretin muss also seine Tertiär- und Sekundärstruktur verlieren, damit es intermolekulare Kontakte ausbilden kann, die die Bildung von Amyloid-Fibrillen ermöglichen.

Insulin ist ein Hormon, das in seiner nativen Form das Glucose-Niveau im Organismus reguliert und unter bestimmten Umständen in eine aggregierte (fehlgefaltete) Isoform umgewandelt wird, die keine biologische Aktivität aufweist und an der Amyloidose beteiligt sein kann. Die beobachteten Änderungen der Sekundärstruktur von Insulin während der temperaturinduzierten Entfaltung und Aggregation zeigen, dass während der Aggregation ein Großteil der nativen  $\alpha$ -Helices in nicht-native intermolekulare parallele  $\beta$ -Faltblätter umgewandelt wird. Diese Umwandlung wird durch steigende Protein-Konzentration beschleunigt. Im ersten Schritt der Umwandlung findet eine Änderung der Tertiärstruktur statt, die ohne Änderungen der Sekundärstruktur verläuft und eine konzentrationsunabhängige Kinetik aufweist. Möglicherweise findet zunächst eine Dissoziation der Insulin-Dimere statt. Im nächsten Schritt erfolgt dann die Bildung eines partiell entfaltetes Intermediats, das über intermolekulare (hydrophobe) Kontakte  $\beta$ -Faltblätter ausbildet. Interessanterweise wird dieser Schritt durch moderate Drücke von etwa 300 bar gehemmt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Mechanismen von Phasenumwandlungen in Lipidmembranen mit Hilfe der Röntgenbeugung und FT-IR Spektroskopie untersucht. Besonderes Interesse galt dabei kubischen Lipid-Phasen. Monoolein/Wasser-Dispersionen stellen gute Modelle dar, an denen der Mechanismus der Phasenübergänge zwischen kubischen und lamellaren Strukturen, die z. B. für das Verständnis der Membranfusion

wichtig sind, studiert werden kann. Dies ist möglich, da Monoolein eine Tendenz zur Ausbildung von nicht-lamellaren Strukturen besitzt. Die Kinetik und der Mechanismus der Entstehung der kubischen Lipidstruktur Ia3d wurde hier mit Hilfe der Drucksprungtechnik in Kombination mit der Synchrotron-Röntgenbeugungsmethode untersucht. Phasenübergänge wurden durch Sprünge von 1500 auf 1 bar bei 35 und 50 °C induziert. Interessanterweise kann sich die kubische Struktur, die als eine geordnete Anreihung von Fusionsporen aufgefasst werden kann, direkt ohne geordnete Zwischenstufen aus der lamellaren Phase bilden.

Der Einfluss von anionischen Lipiden auf die kubische Struktur von MO/Wasser wurde am Beispiel des Modellsystems MO/DOPA/Wasser studiert. Die kubische Ia3d Phase von MO/Wasser wird bereits durch Zugabe von 5 Gew.% DOPA zerstört und in eine invertiert hexagonale Struktur umgewandelt. Durch die Wechselwirkungen mit der Phosphat-Gruppe von DOPA werden die Eigenschaften der Kopfgruppe von MO stark beeinflusst, die Mobilität der Hydroxyl-Gruppen drastisch eingeschränkt und die Hydratisierung der Carbonyl-Gruppe herabgesetzt. Die Unordnung der Ketten bleibt in der hexagonalen Phase, ähnlich wie in der kubischen Ia3d Phase, bestehen.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden an verschiedenen Modellsystemen untersucht. Dabei wurden unterschiedlich große Proteine, Insulin, Cytochrom c und  $\alpha$ -Chymotrypsin, in die kubischen Wasser-Kanäle von Monoolein/Wasser Dispersion eingebaut. Das temperatur-, druck- und zeitabhängige Phasenverhalten und die konformationellen Eigenschaften der Lipid-Matrix wurden im Detail mit Hilfe der Röntgenbeugung und FT-IR Spektroskopie studiert. Kinetische Experimente wurden mit Hilfe der Drucksprung-Technik in Kombination mit Röntgen-Kleinwinkelstreuung durchgeführt. Zusätzlich wurde die Stabilität und Sekundärstruktur der *in cubo* eingeschlossenen Proteine mit Hilfe der FT-IR Spektroskopie analysiert.

Zuerst wurde das Protein Insulin in die kubischen Kanäle von MO/Wasser eingebaut. Die Sekundärstruktur und Aggregationskinetik von Insulin *in cubo* unterscheidet sich von der in Lösung. Das Phasenverhalten der Lipid-Matrix wird durch den Einbau von Insulin ebenfalls beeinflusst. Das Lipid wird dehydratisiert und die lamellare Phase stabilisiert. Die kubische Ia3d Phase wird erst bei ~35 °C aus der  $L_{\alpha}$  Phase gebildet, also bei einer um ~15 °C höheren Temperatur als im reinen System. Das native dimere Protein wird in die Domänen einer neuen, wahrscheinlich kubischen, Phase eingebaut. Bei höheren Temperaturen dissoziiert das dimere Insulin und Monomere werden in die Kanäle der kubischen Ia3d Phase

eingeschlossen. Oberhalb von  $\sim 60$  °C entfalten die Insulin-Moleküle und fangen an zu aggregieren. Die Zahl der an der Aggregation beteiligten Moleküle nimmt mit der Zeit zu, während die Größe der Aggregate kaum ansteigt. Dies unterscheidet sich von der Aggregation von Insulin in Lösung, bei der Insulin sehr große und zunächst ungeordnete Agglomerate bildet, deren Größe in Laufe der Zeit stark zunimmt. Der Mechanismus der Aggregation (Bildung von parallelen  $\beta$ -Faltblättern auf Kosten von  $\alpha$ -helikalen und ungeordneten Strukturen) wird dagegen durch die Lipid-Umgebung nicht beeinflusst. Allerdings wird diese Umwandlung durch den Einbau in MO/Wasser etwas beschleunigt. Die strukturellen Eigenschaften von MO in der flüssig-kristallinen Phase, wie die Konformation der Kopfgruppen und der Kohlenwasserstoffketten, werden durch Insulin nur wenig beeinflusst. Offensichtlich wechselwirkt die Protein-Oberfläche kaum mit der Kopfgruppenregion des Lipids.

Ein weiteres Modellsystem besteht aus dem kleinen Protein Cytochrom c, das in die kubische Ia3d Phase von MO/Wasser eingebaut wurde. Die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den beiden Komponenten wurden hier im Detail untersucht. Besonderes Interesse richtet sich dabei auf den Einfluss des Proteins auf die Kinetik der Phasenübergänge und dem Mechanismus des Einbaus von cyt c in die Lipid-Kanäle. Die Ia3d Struktur von MO/Wasser wird durch das Protein signifikant beeinflusst. Die Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen Protein-Oberfläche und den Lipid-Kopfgruppen führt zu einer Zunahme der Krümmung der Lipid-Schicht und der Bildung einer neuen Struktur, einer kubisch-mizellaren P4<sub>3</sub>32 Phase (Q<sup>212</sup>). Die cyt c-Moleküle sind dabei in inversen Mizellen platziert. Der Anteil der P4<sub>3</sub>32 Phase steigt auf Kosten der kubischen Ia3d Phase wenn die cyt c-Konzentration im System zunimmt. Dagegen verschwindet die Phase, wenn das Protein oberhalb von 60 °C entfaltet. Die P4<sub>3</sub>32 Phase zeigt eine enorme Druck-Stabilität. Erst bei 2-3 kbar wird diese Struktur in die kubische Phase Pn3m umgewandelt. Im reinen MO/Wasser System ist dagegen die Pn3m Phase oberhalb von  $\sim 20$  °C nicht mehr beständig. und unter Druck wird die Pn3m Struktur nicht gebildet. Die Lipidkonformation wird durch den Einbau von Cytochrom c wesentlich verändert. Ein steigender Proteingehalt hat zur Folge, dass unabhängig von der Temperatur etwa 2/3 aller Carbonyl-Gruppen hydratisiert werden und die Ordnung der Lipidketten herabgesetzt wird. Die Sekundärstruktur von cyt c wird durch den Einbau nicht beeinflusst, allerdings kommt es bei der Entfaltung des Lysin-reichen Proteins zu Wechselwirkungen mit den Kopfgruppen des Lipids. Kinetik und Mechanismus der Phasenübergänge wurden in MO/Wasser/cyt c Systemen mit 2 und 5 Gew.% cyt c durch unterschiedliche Druck-Sprünge untersucht. Der Übergang L<sub>α</sub>/P4<sub>3</sub>32 → Ia3d/P4<sub>3</sub>32 wurde

durch einen Drucksprung von 1500 auf 1 bar bei 50 °C induziert. In beiden MO/cyt c Systemen entsteht die kubische Ia3d Phase aus der lamellaren Phase innerhalb von ~1 s nach dem Drucksprung. Die koexistierende proteinhaltige P4<sub>3</sub>32 Phase bleibt dabei unbeeinflusst. Derselbe Drucksprung bei tieferer Temperatur (35 °C) induziert zwei Übergänge: Von der L<sub>α</sub> in die Ia3d Phase, und von der Pn3m in die P4<sub>3</sub>32 Phase. Die L<sub>α</sub> → Ia3d Umwandlung geschieht hier wesentlich langsamer (nach ~12 s bei MO/5 % cyt c und nach ~7 s bei MO/2 % cyt c), als bei 50 °C. Die Umwandlung im reinen Lipid-System bei 35 °C beträgt allerdings nur ~2.5 s, ist also wesentlich schneller wenn keine Lipid-Domänen mit eingebautem Protein neben der Ia3d Phase vorliegen. Die P4<sub>3</sub>32 Phase entsteht extrem langsam aus der kubischen Pn3m Phase, wahrscheinlich auf einer Zeitskala von Minuten. Die Umorganisation und der Transport von Lipid und Wasser innerhalb der Dispersion bei der Entstehung der neuen kubisch-mizellaren Struktur ist ein komplexer Prozess mit langen Relaxationszeiten, anders als die lamellar → kubisch Ia3d Umwandlung in den proteinfreien Domänen.

Die Übergänge L<sub>α</sub> → Ia3d und Pn3m → P4<sub>3</sub>32 wurden bei 50 °C auch mit einem größeren Drucksprung von 4000 auf 1 bar untersucht. Die kubische Ia3d Phase bildet sich, wie bereits beobachtet, aus der L<sub>α</sub> Phase. Die Kinetik bei 50 °C ist, wie erwartet, schneller als bei 35 °C. Der Übergang ist innerhalb von 2-4 s vollzogen. Die P4<sub>3</sub>32 Phase erscheint erst nach ~7 s, und bildet sich langsam aus der Pn3m Phase. Es erfolgt also keine direkte Bildung der kubisch-mizellaren Struktur aus der lamellaren L<sub>α</sub> Phase. Durch den Sprung von 4000 auf 1 bar bei 35 °C wurde der Übergang L<sub>α</sub> → Ia3d/P4<sub>3</sub>32 induziert. Interessanterweise entsteht die P4<sub>3</sub>32 Phase nicht direkt aus der lamellaren Phase, sondern über mehrere Intermediate. Die planare Topologie der lamellaren Struktur kann hier nur über ein kubisches Intermediat Pn3m, das wiederum über zwei lamellare Intermediate aus der L<sub>α</sub> Phase gebildet wird, in die mizellare Struktur umgewandelt werden. Die P4<sub>3</sub>32 Phase entsteht langsam nach ~8 s aus der Pn3m Phase. Höhere cyt c-Konzentrationen verlangsamen diese Umwandlung.

Schließlich wurde das verhältnismäßig große Enzym α-Chymotrypsin in die MO-Matrix eingebaut. Die Ergebnisse zeigen, dass dabei eine neue, wahrscheinlich kubische Pn3m, Phase entsteht, die die Protein-Moleküle einschließt und neben der ursprünglichen Ia3d Phase vorliegt. Die molekulare Struktur des Lipids wird durch den Einbau von α-Chymotrypsin signifikant geändert. Die Carbonyl-Gruppen werden stärker durch Wasserstoffbrücken-Bindungen gebunden, die Glycerol-Gruppen werden mobiler und die Ordnung der Alkylketten wird herabgesetzt. Durch die Wechselwirkung des Proteins mit der Lipid-Oberfläche wird nicht nur die Lipid-Matrix beeinflusst, sondern auch die Stabilität von α-Chymotrypsin herabgesetzt.

## 9 Literatur

- Ai, X., Caffrey, M., *Bioph. J.* (2000) 79, 394.
- Anderson, D. M., Gruner, S. M., Leibler, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 5364.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. D., Smith, J. A., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1993).
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Salnikov, V. V., Baskakov, I. V. *Biochemistry* (2005) 44, 6776.
- Brange, J., Andersen, L., Laursen, E. D., Meyn, G., Rasmussen, E. *J. Pharm. Sci.* (1997) 86 517.
- Briggs, J., Chung, H., Caffrey, M. *J. Phys. II* (1996) 6, 723.
- Brown, D. R., Qin K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H. *Nature* (1997) 390, 684.
- Bushnell, G. W., Louie, G. V, Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.* (1990) 214, 585.
- Caffrey, M., Chung, H. *Biophys. J.* (1994) 66, 377.
- Caughey, B., Raymond, G. J., Ernst, D., Race, R. E. *J. Virol.* (1991) 65, 6597.
- Celej, M. S., D'Andrea, M. G., Campana, P. T., Fidelio, G. D., Bianconi, M. L. *Biochem. J.* (2004) 378, 1059.
- Chernomordik, L. V., Kozlov, M. M. *Annu. Rev. Biochem.* (2003) 72, 175.
- Chernomordik, L. V., Kozlov, M. M., Zimmerberg, J. *J. Membr. Biol.* (1995a) 146, 1.
- Chupin, V., Killian, J. A., Kruijff, B. *Bioph. J.* (2003) 84, 2373.
- Cullis, P. R., Hope, M. J., Kruijff, B., Verkleij, A. J., Tilcock, C. P. in *Phospholipids and Cellular Recognition*, J. F. Kuo (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL (1985) 1.
- Cullis, P. R., Hope, M. J., Tilcock, C. P. S. *Chem. Phys. Lipids* (1986) 40, 127.
- Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D., Silva, J. L. *J. Biol. Chem.* (2001) 276, 49400.
- Cozzone, A., in *Encyclopedia of life sciences* (2002) Nature Publishing Group, 1.
- Czeslik, C., Reis, O., Winter, R., Rapp, G. *Chem. Phys. Lipids* (1998) 91, 135.
- Deleault, N. R., Lucassen, R. W., Supattapone, S. *Nature* (2003) 425, 717.
- Deng, Y. *J. Struct. Biol.* 127 (1999) 231.
- Dobson, C. M. *Trends Biochem. Sci.* (1999) 24, 329.
- Dodson, G. G., Steiner, D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1998) 8, 189.
- Dong, A., Huang, P., Caughey, W. S. *Biochemistry* (1990) 29, 3303.
- Drummond, C. J., Fong, C. *Curr. Opin. Colloid In.* (1999) 4, 449.

- Dzwolak, W., Ravindra, R., Lendermann, J., Winter, R. *Biochemistry* (2003) 42, 11347.
- Ellens, H., Siegel, D. P., Alford, D., Yeagle, P. L., Boni, L., Lis, L. J., Quinn, P. J., Bentz, J. *Biochemistry* (1989) 28, 3692.
- Epand, R. M. *Chem. Phys. Lip.* (1990) 52, 227.
- Epand, R. M., Lemay, C. T. *Chem. Phys. Lip.* (1993) 66, 181.
- Ferrão-Gonzales, A. D., Souto, S. O., Silva, J. L., Foguel, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, 6445.
- Ferrão-Gonzales, A. D., Palmieri, L., Valory, M., Silva, J. L., Lashuel, H., Kelly, J. W., Foguel, D. *J. Mol. Biol.* (2003) 328, 963.
- Filosa, A., Ismail, A. A., English, A. M. *JBIC* (1999) 4, 717.
- Filosa, A., English, A. M. *JBIC* (2000) 5, 448.
- Foguel, D., Silva, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1994) 91, 8244.
- Foguel, D., Suarez, M. C., Ferrão-Gonzales, A. D., Porto, T. C., Palmieri, L., Einsiedler, C. M., Andrade, L. R., Lashuel, H. A., Lansbury, P. T., Kelly, J. W., Silva, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003) 100, 9831.
- Gompper, G., Zschocke, S. *Phys. Rev. A* (1992) 46, 4836.
- Graner, E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Forlenza, O. V., Cabral, A. L., Veiga, S. S., Juliano, M. A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V. R., Brentani, R. *Mol. Brain Res.* (2000) 76, 85.
- Grossman, A., Zeiler, B., Sapirstein, V. *Neuroch. Res.* (2003) 28, 95.
- Hyde, S. T., Andersson, S., Larsson, K., Blum, Z., Landh, T., Lidin, S., Ninham, B. W. *The language of shape. The role of curvature in condensed matter: physics, chemistry and biology* Elsevier, Amsterdam (1997).
- Hammarstrom, P., Jiang, X., Hurshman, A. R., Powers, E. T., Kelly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99, 16427.
- Harper, P. E., Gruner, S. M. *Eur. Phys. J. E* 2 (2000) 217.
- Hörnberg, A., Eneqvist, T., Olofsson, A., Lundgren, E., Sauer-Eriksson, A. E. *J. Mol. Biol.* (2000) 302, 649.
- Huang, Z., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. *Fold. Des.* (1996) 1, 13.
- Hurshman, A. R., White, J. T., Powers, E. T., Kelly J. W. *Biochemistry* (2004) 43, 7365.
- Ismail, A. A., Mantsch, H. H., Wong, P. T. T. *Biochim. Biophys. Acta.* (1992) 1121, 183.
- Jansen, R., Dzwolak, W., Winter, R. *Biophys. J.* (2005) 88, 1344.
- Jimenez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., Saibil, H. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99, 9196.

- Jung, C. *J. Mol. Recognit.* (2000) 13, 325.
- Kauppinen, J. K. „Fourier Self-Deconvolution in Spectroscopy“ in: G. A. Vanasse (Ed.), *Spectrometric Techniques*, Academic Press, New York (1983) 199.
- Kerppola, T. K., in *Encyclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group (2002), 1.
- Köhling, R., Woenckhaus, J., Klyachko, N. L., Winter, R. *Langmuir* (2002) 18, 8626.
- Kozlovsky, Y., Kozlov, M. M. *Biophys. J.* (2002), 82, 882. (a)
- Kozlovsky, Y., Kozlov, M. M. *Biophys. J.* (2002), 83, 2634. (b)
- Krigbaum, W. R., Godwin, R. W. *Biochemistry* (1968) 7, 3126.
- Krimm S., Bandekar J. *Adv. Protein Chem.* (1986), 38, 181.
- Kruijff, B., Cullis, P. R., Verkleij, A. J., Hope, M. J., van Echteld, C. J. A, Taraschi, T. F. in *The Enzymes of Biological Membranes*, 2nd edition, A. N. Martinosi (Ed.), Plenum, New York (1985) 131.
- Lai, Z., Colon, W., Kelly, J. W. *Biochemistry* (1996) 35, 6470.
- Landau, E. M., Rosenbusch, J. P. *J. Struct. Biol.* (1998) 12, 182.
- Landau, E., Rosenbusch, J. P. *Biophysics* (1996) 93, 14532.
- Larsson, K. *J. Phys. Chem.* (1989) 93, 7304.
- Lee, K. S., Magalhães, A. C., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R., Prado, M. A. *J. Neurochem.* (2001) 79, 79.
- Lindblom, G., Rilfors, L. *Biochim. Biophys. Acta* (1989) 988, 221.
- Liu, K., Cho, H. S., Hoyt, D. W., Nguyen, T. N., Olds, P., Kelly, J. W., Wemmer, D. E. *J. Mol. Biol.* (2000) 303, 555.
- Liu, K., Kelly, J. W., Wemmer, D. E. *J. Mol. Biol.* (2002) 320, 821.
- Luzzati, V., Delacroix H., Gulik A., Gulik-Ktzywicki, T., Mariani P., Vargas R. in *Lipid Polymorphism and Membrane Properties*, R. M. Epand (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, (1997) 3.
- Mangé, A., Crozet, C., Lehmann, S., Béranger, F. *J. Cell Science* (2004) 117, 2412.
- Mariani, P., Luzzati, V., Delacroix, H. *J. Mol. Biol.* (1988) 204, 165.
- Martins, V. R., Linden, R., Prado, M. A., Walz, R., Sakamoto, A. C., Izquierdo, I., Brentani, R. R. *FEBS Lett.* (2002) 512, 25.
- Mayo, D. W., Miller, F. A., Hannah, R. W. „Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra“, Wiley-Interscience, New Jersey (2004).
- Meersman, F., Dirix, C., Shipovskov, S., Klyachko, N. L., Heremans, K. *Langmuir* (2005) 21, 3599.
- Misquitta, Y., Caffrey, M. *Biophys. J.* (2003) 85, 3084.

- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C. *Proteins* (1996) 24, 81.
- Nandi, P. K., Nicole, J. C. *J. Mol. Biol.* (2004) 344, 827.
- Nettleton, E. J., Tito, P., Sunde M., Bouchard, M., Dobson, M. C., Robinson, C. V. *Biophys. J.* (2000) 79, 1053.
- Nielsen, L., Frokjaer, S., Brange, J., Uversky, V. N., Fink, A. L. *Biochemistry* (2001) 40, 8397. (a)
- Nielsen, L., Frokjaer, S., Carpenter, J. F., Brange, J. *J. Pharm. Sci.* (2001) 90, 29. (b)
- Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., Uversky, V. N., Fink, A. L. *Biochemistry* (2001) 40, 6036. (c)
- Nielsen, L. S., Schubert, L., Hansen, J. *Eur. J. Pharm. Sci.* (1998) 6, 231.
- Nollert, P., Qui, H., Caffrey, M., Rosenbusch, J. P., Landau, E. M. *FEBS Letters* (2001) 504, 179.
- Olofsson, A., Ippel, J. H., Wijmenga, S. S., Lundgren, E., Ohman, A. *J. Biol. Chem.* (2004) 279, 5699.
- Owens, D. R. *Nature Rev. Drug Discov.* (2002) 1, 529.
- Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90, 10962.
- Pearl, F. M. G., Orengo, C. A., Thornton, J. M. in „Encyclopedia of life sciences“ Nature Publishing Group (2001) 1.
- Pertinhez, T. A., Bouchard, M., Tomlinson, E. J., Wain, R., Ferguson, S. J., Dobson, C. M., Smith, L. J. *FEBS Lett.* (2001) 495, 184.
- Phillips, W. C., Stewart, A., Stanton, M., Naday, I., Ingersoll, C. *J. Synchrotron Radiat.* (2002) 9, 36.
- Portmann, M., Landau, E. M., Luisi, P. L. *J. Phys. Chem.* (1991) 95, 8437.
- Priola, S. A., Caughey, B. *Mol. Neurobiol.* (1994) 8, 113.
- Privalov, P. L. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* (1990) 25, 281.
- Prusiner, S. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1998) 95, 13363.
- Qinglong, C., Huizhou, L., Jiayong, C. *Biochim. Biophys. Acta* (1994) 1206, 247.
- Riek, R. *FEBS Letters* (1997) 413, 282.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., Wuthrich, K. *Nature* (1997) 382, 180.
- Rummel, G., Hardmeyer, A., Widmer, C., Chiu, M. L., Nollert, P., Locher, K. P., Pedruzzi, I., Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P., Landau E. M. *Science* (1997) 277, 1676.
- Sadhale, Y., Shah, J. C. *Int. J. Pharm.* (1999) 191, 51.

- Saraiva, M. J. *Hum. Mutat.* (2001) 17, 493.
- Schwarz, U. S. *Langmuir* 17 (2001) 2084
- Schwarz, U. S. *Acta Polonica B* (1998) 6, 29.
- Schwarz, U. S. Gompper, G. *Phys. Rev. Letters* (1999) 59, 5528.
- Schwarz, U. S., Gompper, G. *Phys. Rev. Letters* (2000) 85, 1472.
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A., Weissmann, C. *Cell* (1998) 93, 203.
- Seddon, J. M. *Biochim. Biophys. Acta* (1990) 1031, 1.
- Seddon, J. M., Squires, A., Ces, O., Templer, R., Woenckhaus, J., Winter, R., „Time-Resolved Diffraction Studies of Inverse Cubic Phases and Phase Transitions of Lipids“ in: *Self-Assembly*, Robinson B. H. (Ed.), IOS Press (2003) 212.
- Shah, J. C., Sadhale, Y., Chilukuri, D. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2001) 47, 229.
- Sharp, J. S., Forrest, J. A., Jones, R. A. L. *Biochemistry* (2002) 41, 15810.
- Siegel, D. P. *Biophys. J.* (1993) 65, 2124.
- Siegel, D. P. *Biophys. J.* (1999) 76, 291.
- Siegel, D. P., Burns, J. L., Chestnut, M. H., Talmon, Y. *Biophys. J.* (1989) 56, 161.
- Siegel, D. P., Green, W. J., Talmon, Y. *Biophys. J.* (1994) 66, 402.
- Siegel, D. P., Epand, R. M. *Biophys. J.* (1997) 73, 3089.
- Silva, J. L., Weber, G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* (1993) 44, 89.
- Siminovitch, D. J., Wong, P. T. T., Mantsch, H. H. *Biochemistry* (1987) 26, 3277.
- Sluzky, V., Tamada, J. A., Klibanov, A. M., Langer, R. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88, 9377.
- Smeller, L. *Bioch. et Biophys. Acta* (2002) 11, 1595.
- Sousa, M. M., Saraiva, M. J. *Prog. Neurobiol.* (2003) 71, 385. Squires, A. M., Templer, R. H., Seddon, J. M., Woenckhaus, J., Winter, R., Finet, S., Theyencheri, N. *Langmuir* (2002) 18, 7384.
- Susi, H. *Meth. Enzym.* XXVI (1972) 455.
- Tycko, R. *Curr. Opin. Struc. Biol.* (2004) 14, 96.
- Uversky, V. N., Fink, A. L. *Bioch. et Biophys. Acta* (2004) 1698, 131.
- Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E., Dyson H. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 2042.
- Westermarck, P., E. Wilander, *Diabetologia* (1983) 24, 342.

- 
- Westermark, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D. W., O'Brien, T. D., Johnson, K. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1987) 84, 3881.
- Whittingham, J. L., Scott, D. J., Chance, K., Wilson, A., Finch, J., Brange, J., Dodson, G. G. *J. Mol. Biol.* (2002) 318, 479.
- Winter, R., Czeslik, C. *Z. Kristallogr.* (2000) 215, 454.
- Winter, R., Köhling, R. *J. Phys.: Condens. Mat.* (2004) 16, 327.
- Winter, R., Noll, F. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner-Verlag (1998).
- Woenckhaus, J., Köhling, R., Winter, R., Thiyagarajan, P., Finet, S. *Rev. Sci. Instrum.* (2000), 71, 3895.
- Wong, P. T. T., Moffatt, D. J., Baudis, F. L. *Appl. Spectrosc.* (1985) 39, 733.
- Yang, L., Huang, H. W. *Science* (2002) 297, 1877.
- Zahn, R., von Schrötter, C., Wüthrich, K. *FEBS Lett.* (1997) 417, 400.

## Publikationen

- J. Lendermann, R. Winter, "Interaction of Cytochrome c with Cubic Monoolein Mesophases under Limited Hydration Conditions: The Effects of Concentration, Temperature and Pressure", *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2003) 5, 1440.
- J. Lendermann, R. Winter, "Barotropic Behaviour of Monoolein Cubic Mesophases Embedding Cytochrome c" in *Advances in high pressure bioscience and biotechnology II*, Ed. R. Winter, Springer, Berlin, 2003.
- W. Dzwolak, R. Ravindra, J. Lendermann, R. Winter, "Aggregation of Bovine Insulin Probed by DSC/PPC Calorimetry and FTIR Spectroscopy", *Biochemistry* (2003) 42, 11347.
- Y. Cordeiro, J. Kraineva, R. Ravindra, L. M. T. R. Lima, M. P. B. Gomes, D. Foguel, R. Winter, J. L. Silva, "Hydration and Packing Effects on Prion Folding and  $\beta$ -Sheet Conversion: High-pressure Spectroscopy and Pressure Perturbation Calorimetry Studies", *J. Biol. Chem.* (2004) 279, 32354.
- J. Kraineva, R. Narayanan, E. Kondrashkina, P. Thiyagarajan, R. Winter, "Kinetics of Lamellar-to-Cubic and Intercubic Phase Transitions of Pure and Cytochrome c Containing Monoolein Dispersions Monitored by Time-Resolved Small-Angle X-ray Diffraction", *Langmuir* (2005) 21, 3559.
- Y. Cordeiro, J. Kraineva, L. M. T. R. Lima, R. Winter, J. L. Silva, "Volume and Energy Folding Landscape of Prion-Protein Revealed by Pressure", *Braz. J. of Medical and Biological Research* (2005) 38, 1195.
- Y. Cordeiro, J. Kraineva, M. P. B. Gomes, M. H. Lopes, V. R. Martins, L. M. T. R. Lima, D. Foguel, R. Winter and J. L. Silva, "The Amio-Terminal PrP Domain is Crucial to Modulate Prion Misfolding and Aggregation", *Biophys. J.* (2005) 89, 2667.
- A. Gabke, J. Kraineva, R. Köhling, R. Winter, "Using pressure in combination with x-ray and neutron scattering techniques for studying the structure, stability and phase behaviour of soft condensed matter and biomolecular systems" *J. Phys.: Condens. Mat.* (2005) 17, 3077.
- Y. Cordeiro, J. Kraineva, M. C. Suarez, A. G. Tempesta, R. Winter, J. W. Kelly, J. L. Silva, D. Foguel, "FT-IR spectroscopy provides a fingerprint for the tetramer and for the amyloid fibril of TTR: A thermal- and pressure-denaturation study" *Biophys. J.* (2006), eingereicht.
- J. Kraineva, C. Nicolini, P. Thiyagarajan, E. Kondrashkina, R. Winter, "Incorporation of  $\alpha$ -chymotrypsin into the 3D channels of bicontinuous cubic lipid mesophases" *Bioch. et Biophys. Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* (2005), im Druck.
- J. Kraineva, R. Winter, S. Funari "Confinement-controlled aggregation of insulin" *Langmuir* (2006), in Vorbereitung.

---

C. Nicolini, J. Kraineva, M. Khurana, N. Periasamy, S. Funari, R. Winter, "Temperature and Pressure Effects on Structural and Conformational Properties of POPC/SM/Cholesterol Model Raft Mixtures", *Bioch. et Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes* (2006), im Druck.